

RAFAEL JOSÉ MARQUES PEIXOTO

‘Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* em *Bacteroides fragilis*.’



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO  
OUTUBRO DE 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Peixoto, Rafael

Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* no *Bacteroides fragilis* / Rafael José Marques Peixoto – Rio de Janeiro, 2009

LXIII, 63

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Referências bibliográficas: 49-57

1. *Quorum Sensing* 2 *Bacteroides fragilis*. 3. Sistema LuxS/AI-2 4. Proteína S-ribisilcisteinase 6. *LuxS* I. Domingues, Regina. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* no *Bacteroides fragilis*

Rafael José Marques Peixoto

**Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* no *Bacteroides fragilis***

Rio de Janeiro, 1 de outubro de 2009

---

(Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues, Ph.D, UFRJ)

---

(Sergio Eduardo Longo Fracalanza, Ph.D, UFRJ)

---

(Walter Martins Oelemann, Ph.D, UFRJ)

---

(Lucio de Souza Gonçalves, Ph.D, UES)

---

(Ana Paula Vieira Colombo, Ph.D, UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia de Anaeróbios, Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues.

“Ninguém é tão grande que  
não possa aprender, nem tão  
pequeno que não possa  
ensinar”.  
(Píndaro, poeta romano)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao criador, que tornou possível que um conjunto de átomos fosse capaz de desenvolver uma dissertação.

A todos do Laboratório Biologia dos Anaeróbios.

Agradeço a Regina, Lili e Renato, por terem sido mais que orientadores, mais que amigos, exemplos a serem seguidos de serenidade, respeito, caráter e trabalho incessante em prol da ciência.

Ao Dr. Edson Rocha, professor do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Brody School of Medicine na East Caroline University.

Aos demais professores e orientadores, que contribuíram e contribuem na minha formação acadêmica.

Aos meus familiares, que foram os responsáveis mais que diretos pela minha formação acadêmica, social e moral. Em especial aos meus pais, por tudo aquilo que fizeram por mim e pelos meus irmãos.

À Camila e a sua família sensacional, por serem sempre pessoas mais que especiais.

Aos meus amigos e amigas, que foram sempre presentes na alegria e tristeza, nos estudos e nas farras. Não deixando de citar o Mauro, Rafael, Nelson, Nicolas, Anderson, Henrique e Bárbara.

Aos financiadores Faperj, CNPq e PRONEX, por financiarem a nossa alquimia.

E por todos aqueles que de alguma forma escreveram frases, parágrafos, versos poéticos ou capítulos completos no livro da minha vida.

## RESUMO

Rafael José Marques Peixoto

**Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* no *Bacteroides fragilis***

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Quorum sensing é um mecanismo de sinalização celular baseado na concentração populacional, envolvendo a produção e resposta a moléculas similares a hormônios microbianos chamados auto-indutores (AI). Um dos sistemas mais bem estudados foi denominado AI-2, e sua biossíntese requer a enzima codificada pelo gene *luxS*. Nosso grupo descreveu anteriormente, pela primeira vez, que algumas espécies de *Bacteroides* são capazes de sintetizar moléculas do tipo AI-2 ativas. Neste estudo, o objetivo foi detectar do gene *luxS* e verificar sua atividade como produtora de AI-2 em espécies *Bacteroides*. As cepas de *Bacteroides fragilis* B3b e *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482 foram selecionados com base em fenótipos positivo para AI-2 e pela presença de um gene *luxS* putativo no genoma, respectivamente. Foram realizadas estratégias de clonagem e expressão heteróloga em cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  deficientes para *luxS* e em cepa *E. coli* Roseta como cepas hospedeiras. Foi observado, no entanto, que ambas as cepas de *Bacteroides* contêm genes *LuxS* ortólogos funcionais capazes de complementar a produção de AI-2 em *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Palavras-chave: Quorum Sensing, *Bacteroides fragilis*, Sistema LuxS/AI-2, Proteína S-ribisilhomocisteinase, LuxS.

Rio de Janeiro  
Outubro de 2009

## ABSTRACT

Rafael José Marques Peixoto

**Caracterização e análise de expressão do gene *luxS* do Sistema LuxS/Auto-indutor 2 de *Quorum Sensing* no *Bacteroides fragilis***

Orientadora: Regina Maria Cavalcanti Pilotto Domingues

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Quorum sensing is a cell-cell signaling mechanism based on cell density that involves the production of hormone-like molecules called autoinducers (AI). One of the most studied AIs has been termed AI-2, and its biosynthesis requires the enzyme encoded by *luxS* gene. We have previously described for the first time that *Bacteroides* species can produce molecules with AI-2 activity. In this study, we focus on the detection of *luxS* and its activity as the AI-2 synthase in *Bacteroides* species. The strains *Bacteroides fragilis* B3b and *Bacteroides vulgatus* ATCC8482 were selected based on a positive phenotype for AI-2 production and the presence of a putative *luxS* in the genome, respectively. In order to identify the *luxS* gene, cloning and heterologous expression strategies were utilized using the *luxS*-deficient *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and *E. coli* Roseta as host strain. We demonstrate that both strains contain functional *luxS* orthologs that can complement AI-2 production in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Keywords: *Quorum Sensing*; *Bacteroides fragilis*; LuxS/AI-2 System; S-ribosylhomocysteinase;

Rio de Janeiro

Agosto de 2009

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1.</b> Tabela das cepas selecionadas para o estudo e suas respectivas características.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para detecção e clonagem, respectivamente.....	<b>29</b>
<b>Figura 1.</b> Sistemas QS de comunicação intra-espécies. (a) Sistema do tipo LuxI presente na maioria das bactérias Gram-negativas. Molécula Acil Homoserina Lactona (AHL) em círculos; (b) Sistema do tipo Auto-Indutor Peptídico presente na maioria das bactérias Gram-positivas. Molécula (oligopeptídeo) em bastões (XAVIER & BASSLER, 2003). .....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> (a) Moléculas AI-1 de bactérias Gram-negativas; (b) Moléculas AI-1/AIP de bactérias Gram-positivas (Adaptado de WATERS & BASSLER, 2005). .....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Moléculas de AI-2. (a) <i>V. harveyi</i> (S-THMF-borato), e de (b) <i>S. typhimurium</i> (R-THMF), em negrito (WATERS & BASSLER, 2005) .....	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b> Via metabólica da molécula AI-2 de <i>V. harveyi</i> (SUN <i>et al.</i> , 2004).....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa físico do vetor de clonagem e expressão pET26b+ (Nonagen).....	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Avaliação do fenótipo AI-2 das culturas das cepas de <i>B. fragilis</i> , <i>B. vulgatus</i> e <i>E. coli</i> . Os sobrenadantes das culturas foram testados quanto à atividade do autoindutor-2 pelo bioensaio de autoindução com a cepa repórter <i>V. harveyi</i> BB170. Atividade da molécula AI-2	

no sobrenadante da cepa selvagem *V. harveyi* BB120 (**BB120**), *B. vulgatus* ATCC 8482 (**Bv 8482**), *B. fragilis* B3b (**Bf B3b**) e o controle usando BHI estéril (**Controle**).

.....35

**Figura 7.** Pesquisa do gene *luxS* em *B. Fragilis*. Eletroforese da reação de PCR utilizando os iniciadores confeccionados para a região interna dos genes *luxS* do *B. vulgatus* ATCC 8482. Linha 1: Padrão de tamanho molecular 1Kb; Linha 2: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. vulgatus* ATCC 8482 (388pb); Linha 3: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. fragilis* B3b (~388pb).....36

**Figura 8.** Alinhamento das sequencias de aminoácidos *S*-ribosilhomocisteinase *B. fragilis* B3b, *B. vulgatus* ATCC8482 (Numero de acesso GenBank ABR38590.1) and *P. gingivalis* W83 (Numero de acesso GenBank AAQ65692.1). A sequência encontrada na cepa *B. fragilis* B3b apresentou alta similaridade com domínios conservados das proteínas da família LuxS.

.....37

**Figura 9.** Amplificação do gene *luxS*. Eletroforese da reação de PCR utilizando os iniciadores confeccionados para as regiões que flanqueiam o gene *luxS* do *B. vulgatus* ATCC 8482. Linha 1: Padrão de tamanho molecular 1Kb; Linha 2: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. vulgatus* ATCC 8482 (507pb); Linha 3: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. fragilis* B3b (~507pb); Linha 4: Controle negativo da reação.

.....38

**Figura 10.** Fenótipo AI-2. Atividade da molécula AI-2 nos sobrenadantes das cepas transformadas *E. coli* Dh5 $\alpha$  / pET26b+ - luxSbf (**luxS<sup>Bf</sup>**) *E. coli* Dh5 $\alpha$  / pET26b+ - luxSbv (**luxS<sup>Bv</sup>**). Além das cepas selvagens *V. harveyi* BB120 (**BB120**) e *E. coli* K12 (**K12**) como

controles positivos e da cepa não transformada *E. coli* Dh5 $\alpha$  (**Dh5 $\alpha$** ) e o LB estéril (**Controle Negativo**).

.....**39**

**Figura 11.** SDS-PAGE com a análise das proteínas totais da cepa *E. coli roseta* com o vetor pET26b+ ligada ao gene *luxS*. Demonstra a indução da expressão da proteína S-ribosilhomocisteinase na cepa *E. coli roseta* com IPTG (linha 2) quando comparada com a mesma cepa porém sem indução (linha 1); Linha 3: Perfil da proteína total da cepa *E. coli roseta*; Controle positivo sem indução (linha 4) e Controle positivo com indução (linha 5).

.....**40**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AB	<i>Autoinducer BioAssay</i>
Acil-ACP	Proteína Carreadora de Acil – Acil
AE	<i>Attaching and Effacing</i>
AHL	Acil Homoserina Lactona
AI	Auto-indutor
AI-1	Auto-indutor – 1
AI-2	Auto-indutor – 2
AI-3	Auto-indutor – 3
AIP	Auto-indutor Peptídico
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BFT	Toxina do <i>Bacteroides fragilis</i> ( <i>Bacteroides fragilis toxin</i> )
BHI	Caldo de infusão de cérebro e coração ( <i>Brain Heart Infusion</i> )
CPC	Complexo Polissacarídeo Capsular
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DO	Densidade ótica
DPD	4,5-dihidroxi-2,3-pentanodione
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EHEC	<i>Enterohaemorrhagic Escherichia coli</i>
ETBF	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigênica ( <i>Enterotoxigenic Bacteroides fragilis</i> )
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>
HAI-1	Homoserina Auto-Indutor - 1
HLA-B27	Antígenos Leucocitários Humanos – B27
g/L	Gramas por litro
h	Hora
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
Kb	Kilobase

KDa	kilodalton
LB	<i>Luria Broth</i>
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LM	<i>Luria Marine</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
mg/L	Miligrama por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mv	Milivolt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Eletrforese em Gel de Poliacrilamida ( <i>Polyacrilamide gel electro phoresis</i> )
Pb	Par de bases
PBS	Tampão fosfato ( <i>Phosphate buffer saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PRAS	Pré-reduzido e esterilizado em anaerobiose ( <i>Pre-Reduced Anaerobically Sterilized</i> )
QS	<i>Quorum Sensing</i>
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Sodium dodecyl sulphate

SRF	S-ribosil-homocisteína
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
V	Volt
Zn	Zinco
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Grau Celsius
Xg	Força Gravitacional

## ÍNDICE

---

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SISTEMAS <i>QUORUM SENSING</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. SISTEMAS INTRA-ESPÉCIES.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.1. BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1.2. BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2. SISTEMAS INTER-ESPÉCIES.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2. GÊNERO <i>BACTEROIDES</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. CEPAS UTILIZADAS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. CEPAS TESTADAS.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. ENSAIO FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DO AI-2.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.1. ENSAIO DE AUTO-INDUÇÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE <i>LUXS</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>LUXS</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (POLIMESASE CHAIN REACTION - PCR)..</b>	<b>30</b>
<b>3.4.4. SEQUENCIAMENTO.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE <i>LUXS</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO EM CEPAS <i>E. COLI ROSETA</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE ELETROFORÉTICA.....</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA PARA AI-2.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2. PESQUISA DO GENE <i>LUXS</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3. PRESENÇA DE UM GENE <i>LUXS</i> ORTÓLOGO EM <i>B. FRAGILIS</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE <i>LUXS<sup>BV</sup></i> E <i>LUXS<sup>BF</sup></i>.....</b>	<b>37</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. SISTEMAS *QUORUM SENSING*

A propriedade de comunicação que os seres vivos em geral apresentam é vista como um fator essencial no comportamento existente em diferentes relações presentes na natureza. Recentemente, estudos realizados por alguns grupos de pesquisa demonstraram que essa propriedade não se restringe somente aos reinos mais complexos (WINANS & BASSLER, 2002).

No reino das bactérias, a comunicação célula-célula tem se revelado uma rica e complexa linguagem através de sinais moleculares. As bactérias possuem a capacidade tanto de produzir um extenso repertório de metabólitos secundários, que podem atuar como reguladores de expressão gênica, quanto de responder a estímulos químicos em seu ambiente (KELLER & SURETTE, 2006), o que pode ocorrer através de um mecanismo associado à densidade celular chamado *Quorum Sensing* (QS) (FUQUA, WINANS & GREENBERG, 1994).

O primeiro sistema QS descrito foi encontrado na bactéria marinha *Vibrio fischeri* (NEALSON & HASTINGS, 1979) e é considerado um paradigma para a maioria das bactérias Gram-negativas. A espécie *V. fischeri* vive em simbiose com hospedeiros marinhos em órgãos chamados “órgãos luz”. O exemplo mais conhecido é o da lula havaiana *Euprymna scolopes* (VISICK *et al.* 2000; WATERS & BASSLER, 2005). Na interação com esse hospedeiro, o *V. fischeri* se multiplica até atingir uma concentração populacional, passando a expressar o complexo enzimático da luciferase, codificado pelo operon *luxCDABEGH*, responsável pela emissão de bioluminescência. A transcrição do operon *lux* e subsequente produção de luz

ocorrem apenas em alta densidade celular, sendo reprimida quando o número celular é baixo (KAPER & SPERANDIO, 2005).

Desde a primeira descrição em *V. fischeri*, o QS tem sido detectado como responsável pela regulação de várias características em diversas espécies bacterianas, incluindo transferência plasmidial e indução de tumor em *Agrobacterium tumefaciens*; produção de antibiótico em *Erwinia carotovora*; formação de biofilme e expressão de genes de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*; esporulação e competência em *Bacillus subtilis*; competência em *Streptococcus pneumoniae* e expressão de genes de virulência em diversos patógenos incluindo *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* (KIEVIT & IGLEWSKI, 2000; MILLER & BASSLER, 2001; TAGA & BASSLER, 2003; KAPER & SPERANDIO, 2005). Além da modulação da expressão de funções específicas, que é mais bem arquitetada quando em população, o QS também está relacionado com a capacidade das bactérias de limitar o crescimento populacional de acordo com o que o ambiente é capaz de suportar (XAVIER & BASSLER, 2003).

A definição clássica do que seria QS se restringia apenas na relação entre concentração celular limite e regulação gênica, induzida por auto-indutores liberados pela própria massa celular (NEALSON, PLATT & HASTINGS, 1970; KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). Em outras palavras, uma baixa densidade populacional determina uma concentração de auto-indutores muito baixa para serem detectados, porém, quando uma alta concentração celular é alcançada, uma concentração limite de auto-indutor é também obtida, de forma que tais bactérias passam a “sentir” sua densidade populacional e, conseqüentemente, a ativar ou reprimir genes específicos (KIEVIT & IGLEWSKI, 2000).

Em uma conferência realizada em Utah, em julho de 2001, pela Sociedade Americana de Microbiologia, intitulada “Cell-Cell communication in Bacteria”, cientistas de diferentes áreas

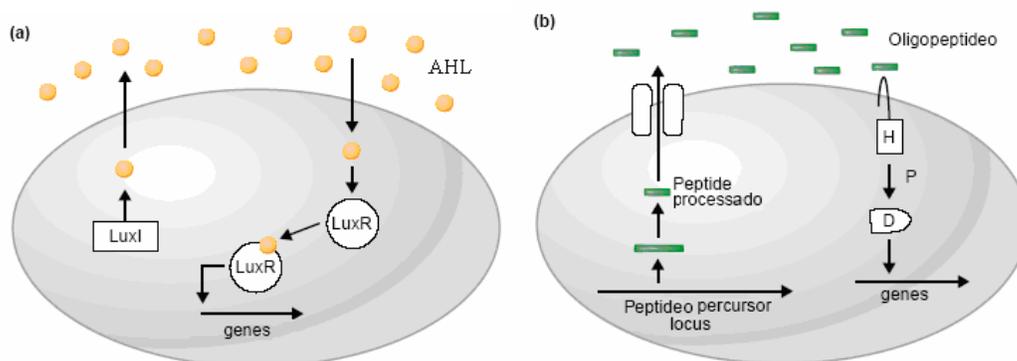
de atuação, se reuniram com o intuito de compartilhar dados não publicados e opiniões a respeito de seus respectivos estudos em comunicação bacteriana. O tema central discutido foi em relação ao fato das bactérias utilizarem os sistemas de comunicação célula-célula para ter acesso ao número da população em que se encontram, associando diretamente a concentração externa de sinalizadores ao crescimento celular, permitindo as bactérias sentirem o *quorum* atingido. Os cientistas concluíram que o *quorum* deveria conter a quantidade suficiente de bactérias para tornar possível um processo que necessitasse da cooperação de um grande número de células para ser eficiente. Desta forma, uma única bactéria se beneficiaria da atividade de toda a assembléia (WINANS & BASSLER, 2002).

Vários conferencistas sugeriram, no entanto, que a definição clássica para explicar QS poderia estar demasiadamente simples, não abrangendo todas as formas de comunicação. Foi então conjecturado que as bactérias poderiam requerer um *quorum* para efetivamente mandar e receber sinais, porém, o conteúdo da informação poderia ser por um propósito ao invés de apenas um diálogo sensorial (WINANS & BASSLER, 2002). Isso poderia explicar porque alguns microrganismos possuem múltiplos sistemas de sinalização, pois se as funções desses sistemas fossem apenas para detectar o número celular, múltiplos sistemas de sinalização seriam aparentemente redundantes. Por outro lado, se esses sinais comunicassem outras informações e se uma alta concentração fosse necessária para que essas informações fossem transmitidas, então o QS seria bem sucedido e os sistemas serviriam para diferentes fins (WINANS & BASSLER, 2002).

Dentre os sistemas QS descritos até os dias de hoje, podemos classificar em três as principais formas de relacionamentos: (1) A primeira é encontrada tanto no grupo das bactérias Gram-negativas quanto no grupo das bactérias Gram-positivas, onde a principal característica é ser basicamente uma forma de comunicação intra-espécie; (2) A segunda forma de

relacionamento tem sido proposta como uma forma universal de comunicação ou mais comumente chamada de comunicação inter-espécies, onde tanto o grupo das bactérias Gram-negativas quanto o das bactérias Gram-positivas apresenta alguma forma de interagir com esse tipo de sistema (KAPER & SPERANDIO, 2005); (3) A terceira forma foi descrita recentemente e é menos conhecida. Autores têm atribuído a algumas moléculas uma participação na comunicação inter-reinos (SPERANDIO *et al*, 2003).

O sistema QS de comunicação intra-espécie em bactérias Gram-negativas utiliza a molécula Acil-Homoserina Lactona (AHL) como mediadora auto-indutora, sendo esta chamada de Auto-Indutor do tipo 1 (AI-1) (Fig. 1A). Já no sistema intra-espécie das bactérias Gram-positivas, a molécula mediadora do QS é chamada de Auto Indutor Peptídico (AIP), e muitas vezes é referida como AI-1 das Gram-positivas (Fig. 1B).



**Figura 1:** Sistemas QS de comunicação intra-espécies. (a) Sistema do tipo LuxI presente na maioria das bactérias Gram-negativas. Molécula Acil Homoserina Lactona (AHL) em círculos; (b) Sistema do tipo Auto-Indutor Peptídico presente na maioria das bactérias Gram-positivas. Molécula (oligopeptídeo) em bastões (XAVIER & BASSLER, 2003).

No sistema universal, a molécula auto-indutora é chamada de Auto Indutora do tipo 2 (AI-2). Em *Vibrio harveyi*, o AI-2 foi caracterizado por Bassler, em 2002, como (2S, 4S)-2-metil-2, 3, 3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato (S-THMF-borato). Em 2004, Miller e colaboradores caracterizaram na espécie *Salmonella typhimurium* a molécula de AI-2 como (2R, 4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (R-THMF) (MILLER *et al.*, 2004).

Existem várias revisões a respeito desses vários sistemas de QS (PARSEK *et al.*, 1999; SCHAUDER & BASSLER, 2001a; BASSLER, 2002; FUQUA & GREENBERG, 2002; TAGA & BASSLER, 2003; XAVIER & BASSLER, 2003). Esses sistemas serão revisados adiante, porém, será dada especial ênfase para o sistema universal ou sistema AI-2, por se tratar exatamente do foco de estudo do presente trabalho.

Além desses sistemas, o mais recentemente descrito, como já mencionado e conseqüentemente o menos conhecido é o sistema chamado de sistema inter-reinos ou sistema de sinalização do auto-indutor do tipo 3 (AI-3)/epinefrina/norepinefrina, no qual as principais características estão na comunicação inter-espécies e inter-reinos, por apresentar sinalização cruzada entre o AI-3 e hormônios eucarióticos (SPERANDIO *et al.*, 2003).

### **1.1.1. SISTEMAS INTRA-ESPÉCIES**

#### **1.1.1.1. BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS**

Considerado o paradigma para o QS em bactérias Gram-negativas, o sistema LuxI/LuxR utiliza a proteína LuxI (ou um homólogo) para sintetizar o AI-1 e a proteína LuxR (ou um homólogo) como o regulador que interage com o auto-indutor, modulando a expressão gênica (FUQUA, PARSEK & GREENBERG, 2001).

Por mais de 10 anos, o circuito do sistema QS LuxI/LuxR foi considerado um exemplo isolado de comunicação bacteriana desenvolvida para um propósito específico de colonização de hospedeiros. Porém, atualmente já se tem o conhecimento de mais de 70 espécies Gram-negativas que se comunicam usando circuitos de sinalização homólogos ao sistema LuxI/LuxR de *V. fischeri* (PARSEK & GREENBERG, 2000; FUQUA, PARSEK & GREENBERG, 2001; KIEVIT *et al.*, 2001).

Semelhante ao que é descrito em outros sistemas QS, a concentração do auto-indutor no meio extracelular aumenta em função do crescimento populacional bacteriano, porém, nos sistemas de sinalização mediados por AI-1, a comunicação é predominantemente intra-específica devido à especificidade que existe entre a proteína do tipo LuxR e seu respectivo auto-indutor específico (WATERS & BASSLER, 2005).

A molécula AI-1 produzida pelo sistema LuxI/LuxR é uma AHL, a qual possui uma porção Homoserina Lactona comum a todas as moléculas auto-indutoras expressas em bactérias Gram-negativas, e uma outra porção com radicais N-acil variáveis. A função da proteína LuxI é ligar o grupamento acil do ácido graxo da proteína carreadora de acil-acil (Acil-ACP), que deriva da via metabólica de lipídios, ao grupamento homocisteína, derivada do metabólito secundário S-adenosilmetionina (SAM) (MORE *et al.*, 1996, PARSEK *et al.*, 1999).

A variação no radical N-acil incorporado à molécula AHL é a diferença crucial para a especificidade do sinal (FUQUA & GREENBERG, 2002) (Fig. 2). Além desta característica de variação da molécula, estudos estruturais da proteína do tipo LuxI indicam que cada enzima possui um encaixe preciso ao seu respectivo grupamento N-acil (WATSON *et al.*, 2002; GOULD *et al.*, 2004). Essa característica estrutural aparentemente confere uma especificidade com alta fidelidade à molécula produzida (WATERS & BASSLER, 2005). O mesmo pode ser observado quanto à estrutura da proteína do tipo LuxR, pois estudos relativos à sua estrutura

indicam que essas proteínas também possuem sítios de interação específicos a porção acil de sua molécula AHL específica (VANNINI *et al.*, 2002).

Uma característica interessante em relação aos sistemas intra-espécie encontrados em Gram-negativos é como a célula deixa de responder a um auto-indutor endógeno que acabou de ser produzido. Existem mecanismos que previnem a ativação de proteínas do tipo LuxR, já que ambos, sinal e detector, são sintetizados e interagem no citoplasma celular. Um mecanismo que evidencia uma estratégia para que não ocorra uma sinalização precipitada é encontrado em uma proteína do tipo LuxR, a TraR, expressa em *Agrobacterium tumefaciens*. Na ausência do auto-indutor, a proteína TraR possui um tempo de vida de poucos minutos, porém, na presença do AHL o tempo de vida da TraR aumenta para mais de trinta minutos (ZHU & WINANS, 1999). Somente quando a AHL aumenta a concentrações significativas, tanto dentro quanto fora da célula, a proteína TraR recebe o sinal, se estabiliza e inicia a cascata de sinalização do seu respectivo sistema QS (ZHU & WINANS, 2001).

Em geral essa logística de entrada e saída das moléculas sinalizadoras é característica da maioria das espécies Gram-negativas, quando uma concentração limite é atingida e a proteína do tipo LuxR reconhece o auto-indutor cognato em sua porção amino-terminal, passando então a atuar como ativador transcripcional através do seu domínio carboxi-terminal (HANZELKA *et al.* 1997).

Além de *V.fischeri*, uma variedade de espécies de bactérias Gram-negativas possui o sistema intra-espécie mediado pela molécula AHL (LERAT & MORAN, 2004).

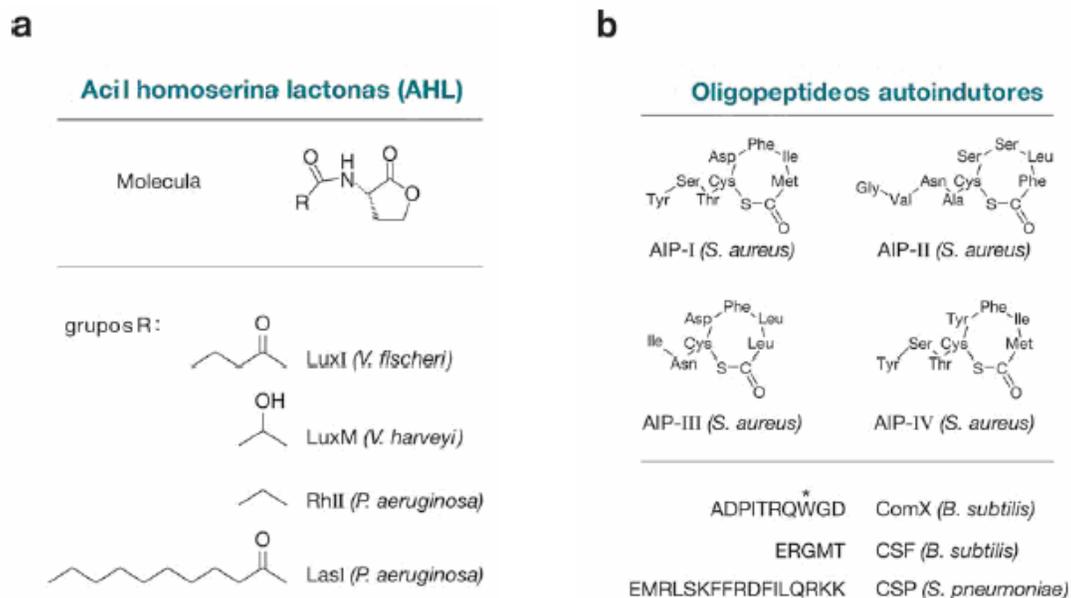
A primeira observação de que as bactérias poderiam se comunicar através de múltiplos sistemas QS ocorreu em estudos com *Vibrio harveyi*. Os sistemas QS nesta espécie consistem de três AIs diferentes e três receptores cognatos que funcionam em paralelo e compartilham a mesma via de sinalização (WATERS & BASSLER, 2005). Dentre esses três sistemas, um é

coordenado por um sistema intra-específico mediado pela molécula auto-indutora AHL chamada HAI-1 (3OHC40-homoserina lactona) (CÃO & MEIGHEN, 1989; WATERS & BASSLER, 2005). Essa molécula é sintetizada pela enzima LuxM, a qual não apresenta homologia com o LuxI de *V. fischeri*, porém catalisa a mesma reação bioquímica e produz um tipo de AHL (BASSLER *et al.* 1993; HANZELKA *et al.*, 1999). O AI HAI-1 se liga ao receptor membranar (LuxN), semelhante ao sensor encontrado em bactérias Gram-positivas (BASSLER *et al.* 1993; FREEMAN *et al.*, 2000), favorecendo uma cascata de desfosforilação que passa pelas proteínas LuxU, LuxO e LuxR (que não apresenta homologia com LuxR de *V. fischeri*) antes de ativar a expressão da bioluminescência (BASSLER, WRIGHT & SILVERMAN, 1994b; FREEMAN & BASSLER 1999 a; b; FREEMAN *et al.*, 2000). Essa mesma via de sinalização é ativada pelos outros dois circuitos, sendo um mediado pelo AI-2 e o outro ainda não totalmente identificado, chamado de CAI-1 (HENKE & BASSLER 2004).

Assim como em vibrios, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresenta diferentes sistemas QS com múltiplos AIs. *P. aeruginosa* é um microrganismo comum da microbiota do solo, mas também se apresenta como um notório patógeno oportunista (EBERL & TUMMLER, 2004). Essa espécie possui um grande número de fatores de virulência codificado por genes cuja expressão depende da densidade celular (WHOOLEY & MCLOUGHLIN, 1983), e que são essenciais, por exemplo, para o estabelecimento de infecções respiratórias crônicas, por meio do controle da adesão, formação de biofilme e expressão de toxinas (SMITH & IGLEWSKI, 2003).

O QS de *P. aeruginosa* consiste de dois circuitos do tipo LuxI/R, chamado de LasI/LasR e RhII/RhIR (GAMBELLO & IGLEWSKI 1991, OCHSNER *et al.*, 1994). O gene *lasI*, um homólogo de *luxI*, produz um auto-indutor AHL (3OC12-homoserina lactona) que é reconhecido por LasR (PEARSON *et al.*, 1994) (Fig. 2A). LasR também influencia na

expressão do RhIR e RhII que são responsáveis pelo segundo circuito QS de *P. aeruginosa* (PEARSON *et al.*, 1995).



**Figura 2:** (a) Moléculas AI-1 de bactérias Gram-negativas; (b) Moléculas AI-1/AIP de bactérias Gram-positivas (Adaptado de WATERS & BASSLER, 2005).

### 1.1.1.2. BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS

Diversos sistemas QS têm sido detectados em um grande número de bactérias Gram-positivas. Diferentemente do sistema intra-específico dos microrganismos Gram-negativos, que utilizam AHLs como molécula básica, as espécies de bactérias Gram-positivas expressam pequenas moléculas de natureza peptídica provenientes de um processo pós-transcricional (KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). Essas moléculas são normalmente produtos de um grande precursor peptídico, que é clivado e/ou modificado, através da adição de anéis de lactona, tiolactona, lantionina ou grupos de isoprenil, antes de ser exportado por transportadores membranares (BOOTH *et al.*, 1996; MAYVILLE *et al.*, 1999; NAKAYAMA *et al.*, 2001; ANSALDI *et al.*, 2002). A comunicação em bactérias Gram-positivas se utiliza de dois diferentes sensores histidina-quinase como receptores membranares, ativando uma cascata de fosforilação que influencia a atividade da proteína de regulação gênica referente a cada espécie. De forma semelhante ao sistema LuxI/R, encontrado em bactérias Gram-negativas, cada célula expressa sinais específicos para os seus receptores cognatas, estritamente sensíveis a estrutura da molécula sinalizadora. Em geral, muitas espécies Gram-positivas se comunicam com múltiplos peptídeos em combinação com diferentes tipos de sinais QS (WATERS & BASSLER, 2005).

Dentro do grupo das bactérias Gram-positivas, a espécie *S. aureus* é a que apresenta seus sistemas QS melhor elucidados. Essa espécie é um dos comensais Gram-positivos mais comumente encontrado no organismo humano, sendo também frequentemente associada a diversos tipos de processos infecciosos, dentre estes, pneumonia, endocardites, osteomielites e diversas infecções de pele (TENOVER & GEYNES, 2000). Seus sistemas QS estão frequentemente associados à virulência e sua atuação em uma infecção está relacionada a um

comportamento de duas fases. Em baixa densidade, a bactéria expressa proteínas de superfícies envolvidas no processo de aderência ao epitélio e na defesa frente ao sistema imune do hospedeiro, favorecendo a colonização. Quando a alta concentração celular é alcançada no sítio de infecção, a expressão das proteínas de superfície é reduzida e a secreção de toxinas e proteases requeridas para disseminação bacteriana passa a ser favorecida (NOVICK, 2003). Essa troca de programação na expressão de genes é regulada pelo sistema AGR. Esse sistema consiste na síntese de AIP codificado pelo gene *agrD* (JI *et al.*, 1995). A enzima codificada pelo gene *agrB*, adiciona anéis de thiolactona ao peptídeo e o exporta para o ambiente extracelular (SAENZ *et al.*, 2000). O AIP é reconhecido por seu receptor cognato, AgrC, que é um sensor quinase, provocando uma fosforilação do AgrA. O AgrA fosforilado induz então a expressão de um RNA regulador (RNA III) que reprime a expressão de fatores de adesão e induz outros fatores de virulência (NOVICK *et al.*, 1993). O AgrA fosforilado também induz a expressão do operon *agrBDCA*, resultando em um aumento do nível de AIP criando um *feedback* positivo, para que toda a população troque de um estado de baixa para alta densidade (NOVICK *et al.*, 1995).

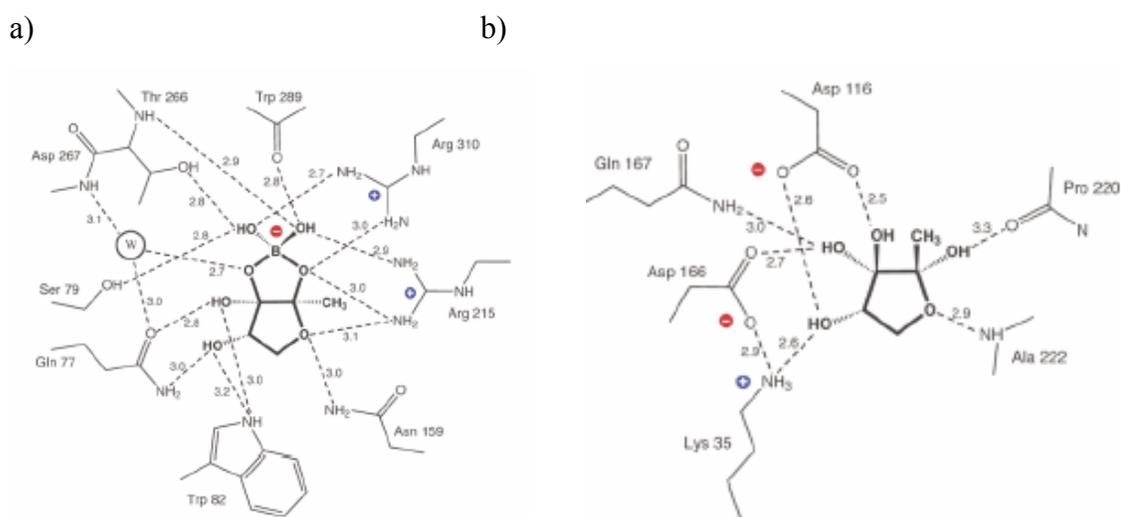
Dentro da espécie *S. aureus* existem grupos (I a IV) com variações nas moléculas AIPs (Fig. 2B). Esses grupos são classificados de acordo com a seqüência básica do AIP. Até 2005, estavam descritos quatro diferentes AIPs, classificados em quatro grupos, sendo cada AI capaz de ativar seu respectivo receptor *agrC* cognato, e de inibir a ativação de todos os demais por competição do receptor não-cognato. Em outras palavras, cada AIP inibe a expressão de fatores de virulência dos outros três grupos de *S. aureus* (LYON *et al.*, 2002). Desta forma, uma co-infecção com dois grupos de *S. aureus* resulta em uma competição intra-espécie. Mayville e colaboradores (1999) verificaram que o AIP II purificado era capaz de atenuar a virulência de grupo I de *S. aureus* em uma infecção em modelo animal.

### 1.1.2. SISTEMAS INTER-ESPÉCIES

Em contraste com os sistemas QS intra-específicos, o sistema inter-específico AI-2/LuxS está presente em uma variedade de espécies, tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, e em todos os casos, a produção do sinal requer uma enzima chamada LuxS (XAVIER & BASSLER, 2003). Ao contrario do que ocorre para os auto-indutores AHL e oligopeptídeos, na biossíntese da molécula AI-2 os intermediários são idênticos em todas as bactérias já estudadas. O que levou os pesquisadores a considerarem a molécula AI-2 como um sinal universal (MILLER & BASSLER, 2001). O início das investigações quanto à natureza da molécula AI-2 ocorreu a partir da descoberta de uma propriedade detectada no sobrenadante das culturas de diferentes espécies bacterianas. Através de um ensaio de auto-indução (bio-ensaio), o sobrenadante era capaz de ativar a expressão de genes responsáveis pela bioluminescência em cepas repórter de *V. harveyi* (MILLER & BASSLER, 2001). Posteriormente, estudos moleculares em *V. harveyi*, *E.coli* e *S. typhimurium* revelaram que um mesmo gene era responsável por essa propriedade (SURETTE, MILLER & BASSLER, 1999). Análises moleculares de cepas com os genes *luxS* mutados, paralelamente a ensaios fenotípicos, permitiram a identificação dos genes *luxS* em uma variedade de espécies que ainda não haviam sido seqüenciadas. Em todos os casos, se a bactéria produzia o AI-2, ela apresentava o gene *luxS* e sua inativação inviabilizava a produção do AI-2 (XAVIER & BASSLER, 2003).

Schauder e colaboradores, em 2001, descreveram então a via biossintética da molécula auto-indutora, revelando que a proteína LuxS é uma enzima envolvida tanto no metabolismo da S-adenosilmetionina (SAM) quanto no metabolismo da metionina, convertendo S-ribosilhomocisteína (SRF) em homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodione (DPD). Devido a sua

instabilidade, o DPD reage com a água tornando-se uma molécula cíclica e formando diferentes furanos (SCHAUDER *et al.*, 2001; WINZER *et al.*, 2002; SPERANDIO *et al.*, 2003), sendo um deles o precursor da molécula AI-2 (SCHAUDER *et al.*, 2001). Somente em 2002, a estrutura da molécula AI-2 do *V. harveyi* e, posteriormente em 2004, a estrutura do AI-2 da *S. typhimurium* foram elucidadas, revelando um (2S,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano-borato (S-THMF-borato) e um (2R,4S)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahydrofurano (R-THMF), respectivamente para as espécies (TAGA, SEMMELHACK & BASSLER, 2001; CHEN *et al.* 2002; MILLER *et al.*, 2004) (Fig.3).

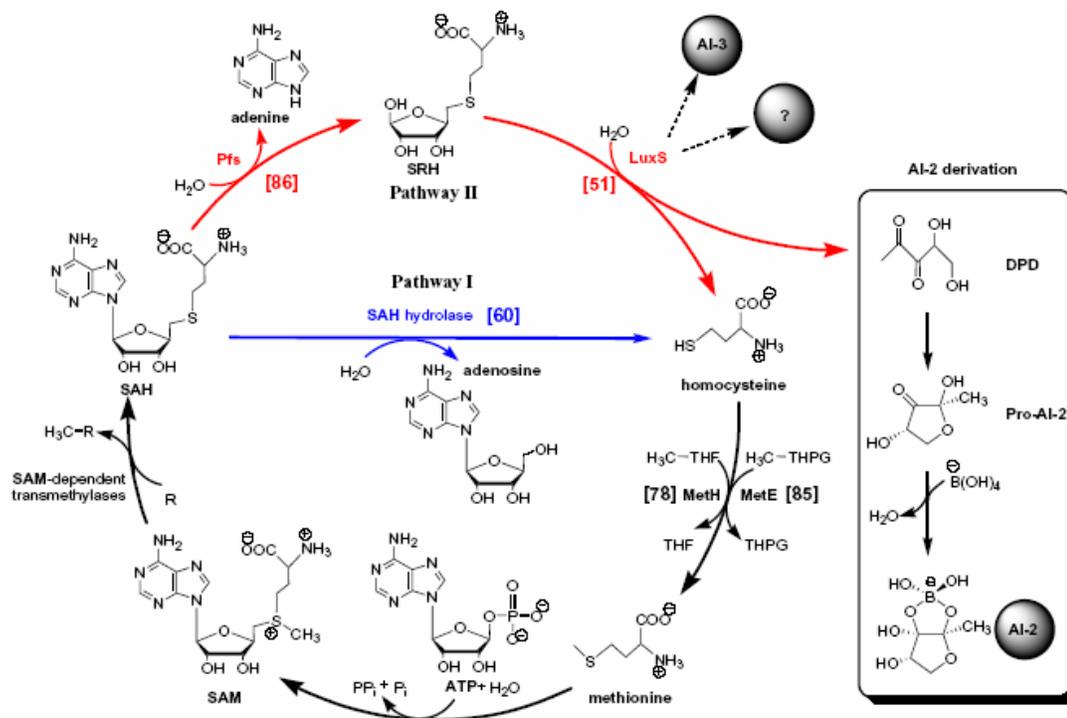


**Figura 3:** Moléculas de AI-2. (a) *V. harveyi* (S-THMF-borato), e de (b) *S. typhimurium* (R-THMF), em negrito (WATERS & BASSLER, 2005).

A molécula AI-2 é produzida a partir da SAM, a qual é um cofator essencial para processos metabólicos tais como a síntese de proteínas, RNA e DNA (XAVIER & BASSLER, 2003). A molécula de SAM é um doador de radical metil e produz o intermediário tóxico S-adenosilhomocisteína (SAH) que é hidrolisado a SRH e adenina pela enzima Pfs (5'

metiltioadenosina/S-adenosilhomosisteína nuclease). A combinação *in vitro* das proteínas Pfs e LuxS purificadas com a molécula SAH levam a uma alta atividade de AI-2 (SCHAUDER *et al.*, 2001). A presença do átomo do boro na molécula do AI-2 de *V. harveyi* foi vista como uma surpresa, pois pouco se sabe da função desse átomo em sistemas biológicos (XAVIER & BASSLER, 2003). Algumas evidências sugerem que para formar a molécula de AI-2 de *V. harveyi*, o boro seria adicionado em um dos furanos derivados do DPD (CHEN *et al.*, 2002) (Fig. 4).

Xavier e colaboradores, em 2003, sugeriram que a adição do boro poderia ser fruto de uma reação espontânea. Porém também seria possível que alguma enzima estivesse catalisando essa reação *in vivo*. Ou até mesmo o próprio LuxP, que poderia exercer tanto a função de sensor do AI-2 quanto a da enzima responsável pela adição do boro a molécula (XAVIER & BASSLER, 2003).



**Figura 4:** Via metabólica da molécula AI-2 de *V. harveyi* (SUN *et al.*, 2004).

Diferentes funções têm sido atribuídas a mensagens passadas pela molécula AI-2 em diferentes espécies bacterianas. A expressão de fatores de virulência em *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (FONG *et al.*, 2001), *Clostridium perfringens* (OHTANI, HAYASHI & SHIMIZU, 2002), *Neisseria meningitidis* (WINZER *et al.*, 2002), *Porphyromonas gingivalis* (CHUNG *et al.*, 2001; FONG *et al.*, 2001; BURGESS *et al.*, 2002), pode ser citada, sendo que em quase todos os casos, o sinal do AI age em conjunto com outros fatores de regulação.

Estudos comparativos, envolvendo cepas selvagens e mutantes, revelaram uma associação do gene *luxS* com a expressão de fatores de virulência (secreção do tipo III e expressão de flagelo) de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). No entanto, ao serem testados AI-2 purificados e sintéticos, pode-se observar que esses fatores de virulência não eram regulados por este auto-indutor (SPERANDIO *et al.* 2003). O AI responsável por essa regulação dependia do gene *luxS* para ser sintetizado, porém, diferia do AI-2 por apresentar padrões distintos quando analisado por espectrometria de massa. Pois se trata de uma molécula que contém um composto aromático a sua estrutura e que não apresenta um esqueleto de açúcar, passando então a ser designado auto-indutor do tipo 3 (AI-3) (SPERANDIO *et al.* 2003).

Esses resultados sugeriram que alguns dos fenótipos atribuídos ao sinal do AI-2 necessitam ser revistos, já que o *luxS* não é um enzima responsável somente pela produção do AI-2, mas também uma enzima envolvida na síntese do aminoácido metionina. Conseqüentemente, uma alteração em sua expressão, por mutação, por exemplo, poderá afetar a expressão de outros genes não necessariamente associados ao sistema QS (WALTERS & SPERANDIO, 2006). O acúmulo de S-ribosil-homocisteína dentro da célula e a não conversão a homocisteína, que está diretamente associado à síntese da metionina, leva a célula a alterar suas vias metabólicas. É possível que essa mudança possa ser responsável pelo bloqueio da atividade de AI-3, não

sendo necessariamente a proteína LuxS responsável pela biossíntese de AI-3 (WALTERS & SPERANDIO, 2006). A atividade de ambos os sinais pode ser diferenciada utilizando-se testes biológicos específicos para cada tipo de sinal. Por exemplo, AI-3 não apresenta atividade no ensaio de auto-indução do *V. harveyi* (SURETTE & BASSLER, 1998; SPERANDIO *et al.*, 2003), enquanto que o AI-2 não interfere na transcrição dos fatores de virulência de EHEC (SPERANDIO *et al.*, 2003). Foi através desses ensaios que Sperandio e colaboradores revelaram que, além das cepas de EHEC, outras espécies também eram capazes de produzir a molécula AI-3, atuando na regulação de toda a comunidade bacteriana, ou seja, uma regulação com caráter de relacionamento inter-específico.

Além da atividade de comunicação entre espécies de bactérias, o sistema de comunicação que envolve a molécula AI-3 também tem apresentado uma atividade entre as células bacterianas e as células eucarióticas do hospedeiro, chamada de comunicação inter-reinos (SPERANDIO *et al.*, 2003). A molécula AI-3 apresenta uma sinalização cruzada com hormônios de células eucariontes, a epinefrina e a norepinefrina (SPERANDIO *et al.*, 2003). Ambos estão presentes no trato gastrointestinal. Esse sistema de sinalização hormonal é responsável pela transcrição de diversos genes de virulência em EHEC (READING & SPERANDIO, 2006). A EHEC reconhece o AI-3 (produzido pela microbiota do intestino) e a epinefrina/norepinefrina (produzidas pelo hospedeiro), ativando a expressão da ilha de patogenicidade LEE, responsável por vários fatores de virulência (SPERANDIO *et al.*, 2003). A sinalização AI-3/Epinefrina/Norepinefrina está presente dentro de várias espécies bacterianas como *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *Erwinia carotovora*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Coxiella burnetti*, *Yersinia* spp., *Francisella tularensis* e *Ralstonia solacearum*, demonstrando

que essa sinalização cruzada inter-reinos não se limita apenas a *E. coli* (READING & SPERANDIO, 2006).

## 1.2. GÊNERO *BACTEROIDES*

O intestino humano é colonizado por uma densa e complexa comunidade microbiana, sendo grande parte dessa comunidade composta por bactérias anaeróbias, as quais podem exceder  $10^{11}$  células por grama de fezes (WEXLER, 2007).

A atividade desses microrganismos apresenta seu maior impacto na nutrição e na manutenção da saúde do hospedeiro (WEXLER, 2007). Os estudos relativos à diversidade microbiana da comunidade anaeróbia presente no cólon humano têm se baseado, nas últimas décadas, em técnicas de biologia molecular, como análise de homologia de DNA (JOHNSON, 1978), hibridização de DNA-RNA ribossomal 16S (JOHNSON & HARICH, 1986), além de análise comparativa de RNA ribossomal 16S (PASTER *et al.*, 1984), revelando dois principais grupos bacterianos dominantes. Dentre as bactérias Gram-positivas, o maior representante é o grupo dos clostrídeos e dentre as bactérias Gram-negativas, o gênero *Bacteroides* é o que se destaca (SUAU *et al.*, 1999; HOLD *et al.*, 2002).

As bactérias anaeróbias da microbiota anfibiótica podem estar envolvidas em uma variedade de infecções endógenas (FINEGOLD, 1977). Mais de 1/3 de todos os anaeróbios isolados de espécimes clínicos inclui membros do gênero *Bacteroides* (REDONDO *et al.*, 1995; DIBASE, J.K.; 2008) e a terapia antimicrobiana é muitas vezes limitada devido a grande e crescente resistência apresentada por esse grupo de microrganismos (FALAGAS & SIAKAVELLAS, 2000; SNYDMAN *et al.*, 2003).

Como o próprio nome diz, a relação anfibiótica deriva de um dualismo de comportamento. Apesar de se tratar de um grupo frequentemente encontrado em um complexo comensal, o gênero *Bacteroides* é responsável por aproximadamente 65% das infecções originárias de desequilíbrios na microbiota intestinal (WEXLER 2007). Originalmente, esse gênero era representado por mais de 40 espécies, classificadas quanto a sua morfologia como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios estritos, sacarolíticos e não formadores de esporos (HOLDEMAN, KELLY & MOORE, 1984). Em função de uma grande heterogeneidade quanto à morfologia e demais atividades sacarolíticas e proteolíticas, essa classificação passou a ser considerada insatisfatória. Em 1989, Shah e Collin propuseram que o gênero fosse restrito ao então chamado “grupo *Bacteroides fragilis*”, sendo este composto por microrganismos sacarolíticos, bile-resistentes, não-pigmentados, capazes ou não de hidrolisar a esculina e de formar ácido succínico e acético a partir da glicose. O gênero *Bacteroides* passou naquele momento a ser representado por dez espécies: *Bacteroides caccae*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthi*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis* e *Bacteroides vulgatus* (LIU *et al.*, 2003). No entanto, atualmente existem 28 espécies válidas publicadas e mais 8 com posições indefinidas. Recentemente, as espécies *Bacteroides distasonis* e *Bacteroides merdae* passaram a compor o gênero *Parabacteroides* (SONG *et al.*, 2005; OLSEN & SHAH, 2008).

O gênero *Bacteroides*, incluindo o *Bacteroides fragilis*, merece especial atenção pela sua alta frequência em infecções anaeróbias e pelo seu perfil de resistência a antimicrobianos (KOETH *et al.*, 2004). A espécie *B. fragilis* é considerada um patógeno oportunista, em parte devido aos seus fatores de virulência, mas também à sua resistência a antimicrobianos e também ao seu comportamento em infecções polimicrobianas (ANTUNES *et al.*, 2005).

A espécie *B. fragilis* constitui apenas 4 a 13 % das cepas isoladas da microbiota fecal de uma pessoa saudável, porém, está presente em 60 a 80 % das infecções associadas ao gênero. Em contraste, a espécie *B. thetaiotaomicron* compreende de 15 a 29 % das cepas isoladas da microbiota normal, e apenas 13 a 17% das cepas isoladas derivão de infecções (CERDENO-TARRAGA *et al.*, 2005).

Acredita-se que essa prevalência da espécie *B. fragilis* se dê principalmente devido a sua versatilidade no relacionamento com o hospedeiro, ora como um componente da microbiota comensal, ora como patógeno expressando atributos de virulência (ONDERDONK *et al.*, 1977; 1990; WEXLER 2007). Seus fatores de virulência incluem fatores de adesão, aerotolerância, produção de enzimas extracelulares, além de fatores de resistência tanto a antibióticos quanto ao sistema imune do hospedeiro (PATRICK, 2002). Dentre os fatores de virulência, dois merecem especial destaque: uma protease secretada pela espécie, denominada *Bacteroides fragilis toxin* – BFT e o complexo polissacarídeo capsular (CPC) (WEXLER 2007).

Em 1984, Myers & Shoop, descreveram pela primeira vez a BFT como um fator enterotóxico expresso por cepas de *B. fragilis* isoladas de diarreia de carneiros neonatos, sendo estas então chamadas de *Bacteroides fragilis* enterotoxigênicas (*Enterotoxigenic Bacteroides fragilis* – ETBF). Esta toxina é capaz de induzir uma resposta secretória, verificada através de ensaios em alça intestinal ligada de ovelhas e bezerros (WEIKEL *et al.*, 1992). O CPC, além de proteger *B. fragilis* contra a fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos, e induzir a formação de abscessos (KRINOS *et al.*, 2001; TZIANABOS *et al.*, 1993), tem um importante papel na adesão às células mesoteliais (GIBSON III *et al.*, 1998). Este complexo é composto por polissacarídeos com diferentes propriedades antigênicas. Acredita-se que cada

polissacarídeo presente seja composto de distintas unidades oligossacarídicas repetidas e que possua um balanço entre grupamentos de cargas positivas e negativas. Esta estrutura “zwitteriônica” é proposta como fundamental para a indução dos abscessos (SAERS, 2009; TZIANABOS *et al.*, 1993).

Além da espécie *B. fragilis*, a espécie *Bacteroides vulgatus* também apresenta uma importância bastante significativa em patologias causadas por anaeróbios estritos no intestino. Por exemplo, a espécie *B. vulgatus* tem sido frequentemente relacionada ao agravamento da colite ulcerativa (ONDERDONK *et al.*, 1984), uma doença de origem ainda não muito bem definida, além de ser o segundo patógeno mais importante no grupo *Bacteroides* em infecções intestinais e extra-intestinais. No entanto, experimentos realizados em camundongos transgênicos HLA-B27 com uma mistura de seis espécies de microrganismos anaeróbios facultativos e estritos, incluindo a espécie *B. vulgatus*, demonstraram que a colite se torna muito mais ativa quando comparada com a administração dessa mistura sem *B. vulgatus* (RATH 2003).

O cólon humano é um sítio altamente susceptível a transferência horizontal de genes, sendo as bactérias da microbiota consideradas os reservatórios de uma variedade de elementos genéticos móveis (SHOEMAKER *et al.*, 2001). Em espécies de *Bacteroides*, a transferência horizontal de genes envolve principalmente a transferência de genes responsáveis pela resistência a antibióticos através de transposons conjugativos. Shoemaker e colaboradores, em 2001, sugeriram que outros genes também podem ser transferidos pelos mesmos mecanismos de conjugação (SHOEMAKER *et al.*, 2001). Além disso, estudos revelaram que a maquinaria necessária para algumas sinalizações de Quorum Sensing (QS) parece estar associada a mecanismos de transferência horizontal de genes (LERAT & MORAN., 2004).

Na microbiota intestinal, os microrganismos predominantes são os anaeróbios, e aproximadamente 90% são representados por espécies do filo *Bacteroidetes* (WEXLER 2007). Esta estatística significativa representa claramente que além da capacidade de sobrevivência e adaptação às adversidades do ambiente, mostra também seu importante papel como mantenedora do equilíbrio ecológico no ambiente gastrointestinal. Essas diferentes funções e seu comportamento sinérgico em infecções mistas, além da patogenicidade apresentada por algumas espécies do gênero *Bacteroides* levou Antunes e colaboradores em 2005 a sugerirem que algumas dessas características pudessem estar relacionadas a algum sistema QS. Os autores foram então os primeiros a fazer uma associação do gênero *Bacteroides* ao sistema de comunicação AI-2/LuxS. Neste trabalho os autores revelaram que o fenótipo de sinalização mediado pela molécula AI-2, analisado através da estimulação da bioluminescência em *V. harveyi*, estaria presente em algumas cepas pertencentes às espécies *B. fragilis* e *B. vulgatus* (ANTUNES *et al.*, 2005).

A partir desses resultados diferentes estratégias, que não obtiveram êxito, foram tomadas com a finalidade de se detectar o gene *luxS* que estaria associado à produção do autoindutor. Foi só então em 2007 que o banco de seqüências da Universidade de Washington apresentou o seqüenciamento completo do genoma da cepa de *B. vulgatus* ATCC 8482, contendo uma seqüência provável para uma ORF *luxS downstream* a uma ORF *pfs*. A presença do operon *luxS - pfs* levou a crer que um sistema de comunicação inter-espécies pudesse estar presente. No entanto, é importante mencionar que foi nessa mesma época que o fenótipo AI-3 foi encontrado em culturas de microrganismos intestinais, incluindo espécies gênero *Bacteroides* (WALTERS & SPERANDIO, 2006), além de um estudo realizado por Pumbwe e colaboradores ter associado a formação de biofilme e multi-resistência ao sistema do tipo 1 do QS em *B. fragilis* (PUMBWE, SKILBECK & WEXLER, 2008).

Considerando então, em primeiro lugar, todos esses aspectos associando o gênero *Bacteroides* a diversos sistemas de QS, além da relevância dos *Bacteroides*, não só na parte clínica, mas também pelo seu papel na manutenção do equilíbrio da microbiota gastrointestinal, em segundo lugar, a importância gene *luxS*, por se apresentar como um ponto de intersecção dos principais sistemas QS, além de que esses sistemas estão intimamente associados a patogenicidade em espécies que habitam o mesmo ambiente gastrointestinal que os *Bacteroides* fazem parte, a proposta desse estudo foi em uma primeira etapa, detectar e descrever a sequência do gene *luxS* em uma cepa de *B. fragilis* já descrita previamente como produtora de AI - 2, e em uma segunda etapa, associar o gene detectado ao fenótipo AI-2.

## 2. OBJETIVO;

- Caracterização do gene *luxS* em cepas de *B. fragilis* produtoras do auto-indutor 2 (AI-2) através da detecção do referido gene por PCR seguido de reações de sequenciamento.
- Correlacionar a presença do gene *luxS* à expressão do AI-2 através de expressão heteróloga em cepas de *Escherichia coli*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

**3.1. CEPAS UTILIZADAS** - Foram utilizadas três cepas de *Vibrio harveyi* (Tabela 1), gentilmente cedidas pela Dra. Bonnie Bassler (Princeton University – Princeton, USA). As cepas foram cultivadas nos meios “L- Marine”(LM), descrito por Bassler, Wright & Silverman (1994a) para o seu crescimento em meio sólido, e o meio “Auto-inducer Bioassay”(AB), descrito por Greenberg, Hastings & Ulitzur (1979) para os ensaios de auto-indução. As condições de cultivo consistiram na incubação das placas ou tubos a 25-30°C, em ambiente de aerobiose sob agitação. As cepas foram estocadas em meio AB contendo 30% de glicerol à -80°C. A cepa de *Vibrio harveyi* BB120 é uma cepa selvagem e possui os dois sistemas QS descritos nessa espécie, sendo capaz de produzir e responder aos AIs 1 e 2. A cepa BB170 é um mutante de BB120 (*LuxN::Tn5*) que só é capaz de responder ao AI-2, sendo essa cepa usada como cepa repórter para AI-2. A cepa BB152 é também um mutante da *V. harveyi* BB120 (*LuxM::Tn5*) apenas capaz de produzir o AI-2 (BASSLER, WRIGHT & SILVERMAN, 1994a; BASSLER, GREENBERG & STEVENS, 1997). As cepas BB120 e BB152 foram utilizadas como controles positivos dos experimentos.

Além das cepas de *V. harveyi*, outras duas cepas de *E. coli* foram utilizadas na etapa de expressão heteróloga do AI-2 do trabalho (Tab. 1). Uma pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia dos Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, denominada *E. coli* K12 que serve como controle positivo para o fenótipo AI-2, e outra cepa denominada *E. coli* DH5 $\alpha$ , derivada da cepa K12, porém com o gene *luxS* não funcional, gentilmente cedida pelo Dr Edson Rocha (East Carolina University). Em uma segunda etapa do trabalho foi utilizada a cepa *E. coli* *Roseta* com o objetivo de confirmar a funcionalidade do sistema de expressão. Estas cepas

foram utilizadas para a clonagem com o vetor plasmidial pET26b<sup>+</sup> mais o produto de amplificação dos iniciadores LuxSNdeIF e LuxSXhoIR. As cepas K12, DH5 $\alpha$  e *Roseta* (life Technology, Invitrogen) foram cultivadas em Luria-Bertani (LB) caldo e ágar a 37 °C, sendo as cepas DH5 $\alpha$  e *Roseta* utilizadas como hospedeiras para clonagem. A cepa DH5 $\alpha$  tem o gene *luxS* defeituoso e não é capaz de sintetizar AI-2, sendo utilizada para confirmar a funcionalidade do gene *luxS* de *Bacteroides* (SURETTE, MILLER & BASSLER, 1999).

**3.2. CEPAS TESTADAS** - Foram também utilizadas duas cepas do gênero *Bacteroides* (Tabela 1), sendo uma pertencente à espécie *B. fragilis*, proveniente da Coleção de Culturas do Laboratório de Biologia dos Anaeróbios do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes, categorizada previamente como produtora de AI-2 (B3b) (MIRANDA *et al.*, 2005), e outra cepa pertencente à espécie *B. vulgatus* ATCC 8482, proveniente da Coleção de Culturas do INCQS do Instituto Oswaldo Cruz, categorizada como possuidora de um possível gene *luxS* pelo programa de seqüenciamento da Universidade de Washington. As cepas foram cultivadas a 37°C em caldo Brain Heart Infusion, Pré-reduzido Esterilizado anaerobicamente (BHI-PRAS) (Difco) suplementado com hemina (5mg/mL), menadione (10 $\mu$ g/mL) e cisteína (0,5 g/L).

**Tabela 1:** Tabela das cepas selecionadas para o estudo e suas respectivas características.

Espécies	Cepa	Fenótipo*
<i>Vibrio harveyi</i>	BB120	AI 1/2 +, sensor AI 1/2 +
	BB170	AI 1/2 +, sensor AI 2 +
	BB152	AI 1 - / 2 +, sensor AI 1/2 +
<i>Bacteroides fragilis</i>	B3b	AI 2 +
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8482	AI 2 +
<i>Escherichia coli</i>	K12	AI 2 +
	DH5 $\alpha$	AI 2 -
	<i>Roseta</i>	-

ATCC – American Type Culture Collection

\*Ensaio de auto-indução, detecção da molécula AI-2 através da emissão de bioluminescência pela cepa repórter BB170.

### 3.3. ENSAIO FENOTÍPICO PARA DETECÇÃO DO AI-2

**3.3.1. ENSAIOS DE AUTO-INDUÇÃO** - Os ensaios de auto-indução foram realizados em uma primeira etapa para fim de confirmação da produção do AI-2 pelas cepas de *B.fragilis* B3b e para avaliação do fenótipo da cepa ATCC 8482 de *B.vulgatus*, além das cepas *E. coli* K12 e *E. coli* DH5 $\alpha$ . Os sobrenadantes do *B. fragilis* B3b, *B. vulgatus* ATCC 8482, *E. coli*

K12 e *E. coli* DH5 $\alpha$  foram testados para a atividade do AI-2 utilizando a cepa repórter *V. harveyi* BB170, que responde a molécula AI-2 produzindo bioluminescência, com o intuito de confirmar a expressão da molécula AI-2 pelas cepas de *Bacteroides* e *E. coli* K12, e a perda do fenótipo pela cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Em uma segunda etapa os ensaios foram realizados com o intuito de avaliar o restabelecimento da produção de AI-2 por parte da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada com os genes *luxS* dos *Bacteroides* estudados.

Para obtenção de sobrenadantes livres de células foi empregada a metodologia descrita por Greenberg, Hastings & Ulitzur (1979), com algumas modificações. As cepas de *V. harveyi* foram cultivadas em tubos contendo 10 mL de meio AB e incubadas a 25-30°C, sob agitação por 24 h. As cepas do gênero *Bacteroides* e as cepas de *E. coli* foram cultivadas em tubos contendo 10 mL de meio BHI-PRAS e LB, respectivamente, à 37°C por 24 h. As culturas foram então centrifugadas a 5.000x g a 5°C por 20 min. Os sobrenadantes foram então filtrados em membranas com poros de 0,22 $\mu$ m (Millipore – São Paulo, SP, Brasil), e então estocadas a -20°C e utilizadas dentro de um período máximo de um mês.

Para o preparo da cepa repórter, foi utilizada a metodologia descrita por Bassler, Wright & Silverman (1994b) nos ensaios de auto-indução. As cepas de *V. harveyi* foram cultivadas em 5mL de meio AB por 24 h a 25-30°C, sob agitação. Posteriormente, a cultura foi diluída (1:5000) em meio AB estéril e utilizada no ensaio de auto-indução.

Para a realização dos ensaios de auto-indução foi empregada a metodologia descrita por Chung e colaboradores, em 2001, com modificações. Em diferentes tubos plásticos de 1,5 mL, foram adicionados 50 $\mu$ L de cada sobrenadante testado. Nos controles positivos BB120 e Bb152, os quais foram denominados 1+ e 2+, respectivamente, e no controle negativo, que consiste no caldo BHI-PRAS, também foi colocado a mesma alíquota de 50 $\mu$ L. Posteriormente, 450 $\mu$ L da cultura da cepa repórter diluída (1:5000) foram adicionados aos

tubos e incubados a 25-30°C, sob agitação de 200 rpm. A leitura da bioluminescência emitida pela cepa repórter foi efetuada após 5 horas, utilizando-se um luminômetro (Luminometer TD-20/20 – Turner Designs). O valor de luminescência da cepa BB120 obtido na quinta hora após a adição da cepa repórter BB170 foi considerado como 100%. Sobrenadantes que estimularam a produção de bioluminescência pela cepa repórter BB170 em 10% ou mais do valor obtido com o sobrenadante da cepa BB120 foram considerados positivos para a presença de auto-indução do tipo 2 (FRIAS, OLLE & ALSINA, 2001). Devido à variabilidade inerente à técnica, todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.4. DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE *LUXS***

**3.4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE *LUXS*** - Primeiramente as cepas de *Bacteroides* foram submetidas a uma avaliação para a detecção do gene *luxS* através da utilização de um par de iniciadores confeccionado a partir da região interna do gene *luxS* encontrado no sequenciamento completo do genoma da cepa ATCC 8482 de *B. vulgatus* realizados na Universidade de Washington (LuxSF e LuxSR). Posteriormente, com o objetivo de caracterização, o gene *luxS* foi amplificados usando um segundo par de iniciadores confeccionados a partir das regiões que flanqueiam a ORF do suposto *luxS* (LuxSNdeIF e LuxSXhoIR). Ambos os iniciadores possuem sítios de corte por enzimas de restrição com intuito de direcionar a ligação no vetor de expressão pET26b+ no correto sentido de leitura: O iniciador *forward* possui um sitio de corte para a enzima *NdeI* e o iniciador *reverse* um sitio de corte para a enzima *XhoI* (Tabela 2).

**Tabela 2:** Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para detecção e clonagem, respectivamente.

Nome	Oligonucleotídeos	Fragmento esperado	T <sub>M</sub>
<b>LuxSF *</b>	5'- CCAGTTTTACCATTGACCAT- 3'	388 pb	50,4°C
<b>LuxSR *</b>	5'- ATAGGTAGGTCGTGAAGCAA- 3'		53,1°C
<b>LuxSNdeIF **</b>	5'- CGAATCATATGAAGACAATACCCAG - 3'	507 pb	53,4°C
<b>LuxSXhoIR **</b>	5'- CTGTTCTCGAGAATTACTCTTTAGTAG - 3'		52,7°C

\* Iniciadores confeccionados a partir da região interna do gene *luxS* de *Bacteroides vulgatus* ATCC8482.

\*\* Iniciadores confeccionados a partir de regiões que flanqueiam gene *luxS* de *Bacteroides vulgatus* ATCC8482.

**3.4.2. EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO** - A extração de DNA total das cepas de *Bacteroides* foi realizada através da utilização do método do isotiocianato de guanidina descrito por Pitcher, Saunders & Owen (1989), com algumas modificações. As cepas foram cultivadas em placas contendo ágar sangue suplementado com hemina (5µg/mL, Sigma Co.) e menadiona (10µg/mL, Sigma Co.) e incubadas por 48h a 37°C em anaerobiose. Posteriormente, foram passados para um caldo de BHI-PRAS e novamente incubados a 37°C

por 48h. Após centrifugação a 8.000Xg de 1,5 mL das culturas, foram adicionados 500µL de isotiocianato de guanidina a 5M. As soluções foram agitadas e em seguida, incubadas à temperatura ambiente por 5 a 10 min. Após resfriamento em gelo por 10 min 250µL de acetato de amônia 7,5M foram adicionados, e as soluções foram agitadas gentilmente e incubadas em gelo por mais 10 min. Em seguida, foram adicionados 500µL de clorofórmio:alcool-isoamilico (24:1), as soluções foram então agitadas e centrifugadas a 13.000x g por 10 min. A parte aquosa foi transferida para outro tubo estéril de 1,5mL, onde foram adicionados 430µL de isopropanol. Os tubos foram invertidos algumas vezes até que fosse possível a visualização de um precipitado fibroso branco. O material foi então centrifugado a 13.000x g por 5 min. Os precipitados foram lavados cinco vezes com 500µL de etanol a 70%. Após a lavagem, os tubos foram centrifugados a 11.000x g durante 10 min. Os tubos foram então deixados abertos à temperatura ambiente, para total evaporação do etanol. Após este período, 50µL de TE (Tris-EDTA, pH 8,0) foram adicionados e os tubos colocados em banho-maria à 55°C por aproximadamente 1 h. Posteriormente os tubos foram estocados à -20°C.

### **3.4.3. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (POLIMESASE CHAIN REACTION**

**- PCR)** - A mistura da reação de PCR foi realizada em 50µL contendo um volume final 1,25U de *Taq* polimerase, 50ng dos oligonucleotídeos, 25µM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão PCR (10mM Tris-HCl pH 8,3; 50mM KCl) e 100ng de DNA. As reações de amplificação seguiram a técnica do *Touchdown PCR*, com o seguinte programa: 94°C por 30 s para desnaturação inicial; 10 ciclos de 94°C por 30s para desnaturação, 50°C por 30s para anelamento e 72°C por 2 min para extensão, 10 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 45°C por 30 seg para anelamento, 72°C por 2 min para extensão, 15 ciclos de 94°C por 30 seg para desnaturação, 40°C por 30 seg para anelamento, 72°C por 2 min para

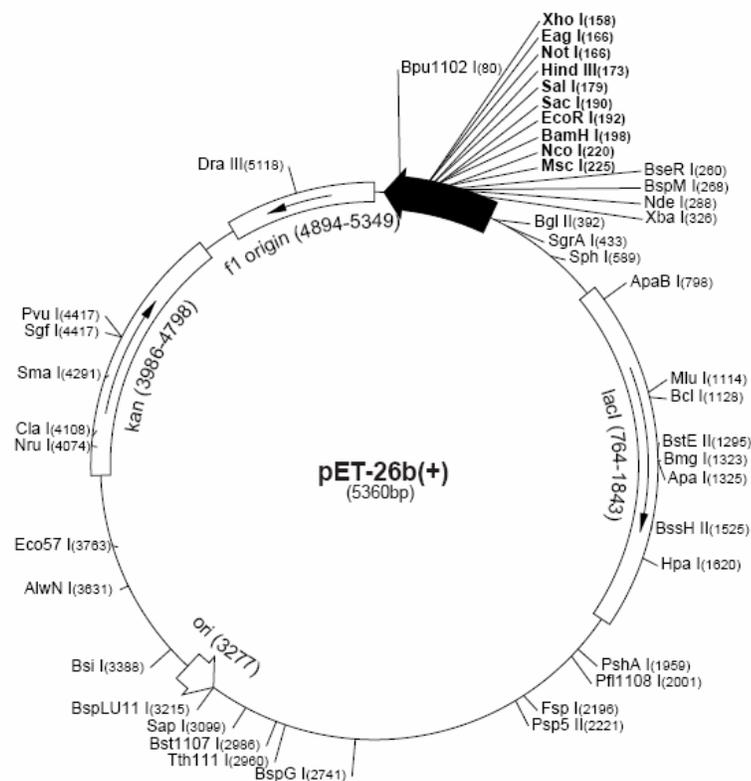
extensão e 72°C por 5 min para extensão final. Os produtos da amplificação de PCR, juntamente com o padrão de tamanho de DNA de 1Kb (DNA Ladder) foram analisados em gel de agarose a 0,7% e submetido a uma corrente elétrica de 100 volts por uma hora. O gel foi então corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografado pelo sistema *gel capture* sob luz ultravioleta.

**3.4.4. SEQUENCIAMENTO** - As amostras de DNA e uma alíquota do par de iniciadores utilizados foram enviadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano, no Instituto de Biociência, na Universidade de São Paulo para seqüenciamento. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE<sup>TM</sup>1000, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (com *Thermo Sequenase<sup>TM</sup> II DNA Polimerase*) e as seqüências foram analisadas pelo software *Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*. Após a obtenção das seqüências, a análise das mesmas foi realizada através do software *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.1.

**3.5. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE *LUXS*** - Os produtos obtidos nas reações de PCR a partir dos iniciadores LuxSNdeIF e LuxSXhoIR foram purificados com o kit (Qiagen) de purificação a partir do gel de agarose. Posteriormente, foram tratados com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* por 4 h à 37°C, e só então foram inseridos no vetor de clonagem pET26b+ (Novagen) (Fig. 5), também tratados com as mesmas enzimas de restrição citadas acima, seguindo as especificações do fabricante. A reação de inserção inclui a adição de 5 µL do 2x o tampão de ligação, 1 µL do vetor de clonagem, 3 µL do produto de amplificação e 1 µL da enzima T4 DNA ligase. Seguida de incubação por 24h a 4°C. A cepa *E. coli* DH5α foi transformada por eletroporação com 5 µL da reação de ligação e incubada

por 1 hora a 37°C em 1 mL de meio SOC (FERREIRA *et al.*, 2009 ). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB com 50µg/mL de canamicina e incubadas por 24h a 37°C. As células foram então selecionadas e seus respectivos plasmídios extraídos pelo Kit Qiagen. Um avaliação da clonagem foi realizada com o procedimento de digestão plasmidial utilizando 0,5 µL das enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Promega), 2 µL do tampão de reação da enzima, 15,5 µL de água pura e 2 µL da amostra plasmidial para verificar a correta inserção do amplicon. Foram então selecionados vinte clones para cada inserto na cepa *E. coli* DH5α para que fosse iniciado a avaliação quanto a restauração do fenótipo AI-2 através do ensaio de auto-indução. Após a obtenção dos clones que apresentaram os plasmídios com a correta inserção, foi realizada a indução de expressão. Os clones *E. coli* DH5α/luxS<sup>Bv</sup> e *E. coli* DH5α/luxS<sup>Bf</sup> foram cultivados em meio LB contendo 50µg/mL de canamicina e a cepa não transformada apenas em LB. As cepas foram então suplementadas com uma concentração final de 1 µM de isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) e incubadas sob agitação (200rpm) à 37°C por 18 horas. Os sobrenadantes foram então avaliados quanto à presença da molécula AI-2, como descrito anteriormente.

**Figura 5.** Mapa físico do vetor de clonagem e expressão pET26b+ (Nonagen).



### 3.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO EM CEPAS *E. COLI* ROSETA.

#### 3.6.1 CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE ELETROFORÉTICA

Por se tratar de uma cepa que já possuía o gene *luxS* antes da transformação, o objetivo dessa etapa foi verificar o aumento da expressão do gene para comprovar a eficiência do plasmídeo pET26b+, pois a cepa *E. coli roseta* é a hospedeira mais indicada a ser utilizada com esse vetor.

O plasmídeo da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ /luxSbf foi então extraído e re-submetido a uma confirmação quanto a presença do gene *luxS* por reação de PCR e só então 5  $\mu$ L da extração

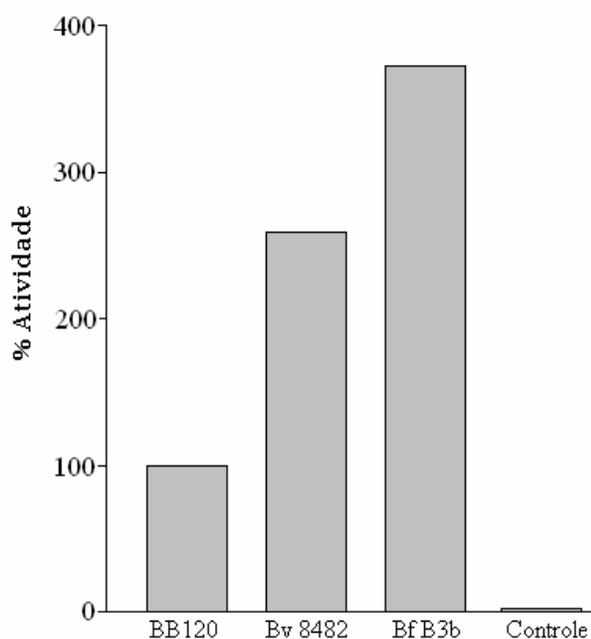
foi eletroporado na cepa *E. coli Roseta* e incubada por 1 hora a 37°C em 1 mL de meio SOC (FERREIRA *et al.*, 2009). As células transformadas foram plaqueadas em meio LB com 50µg/mL de canamicina e incubadas por 24h a 37°C. Seis clones foram então obtido. A cepa *E. coli roseta/luxS<sup>Bf</sup>B1* foi então cultivada em meio LB contendo 50µg/mL de canamicina, crescida por 24h e uma alíquota de 100µL foi adicionada a 10mL de LB 50µg/mL de canamicina e crescida sob agitação de 200 rpm até que a mesma atingisse a DO de 0,3-0,4 e só então adicionada uma concentração final de 1 µM de IPTG e incubadas sob agitação (200rpm) à 37°C por 4 horas.

A análise foi realizada através da extração de proteína total através da centrifugação de 1,5 mL das cultura e a lavagem do sedimento celular com 100µL de água destilada estéril e 100µL de tampão da amostra e fervida por 5 min.

As análises de SDS-PAGE foram realizadas segundo Laemmli, 1970 em géis descontínuos de Bis-acrilamida (4% empacotamento; 12% separação) em tampão de corrida Tris-glicina (Tris 0,1M Glicina 1M e 0,5% de SDS). Para verificar a concentração de proteínas nos extratos enriquecidos foi utilizado o método de Bradford (Quick Start Bradford Protein Assay; BioRad). As proteínas (1mg/mL) foram misturadas com um tampão de amostra (Tris HCl pH 6,8, 10% de SDS, 10% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol), fervidas (100°C) por 5 min e submetidas a eletroforese (90V). Como controle da corrida foi utilizado um padrão de peso molecular de proteínas (200 kDa até 6 kDa; Invitrogen). Os géis foram corados com Azul de Comassie brilhante R-250 e descorados com uma solução contendo 40% de metanol e 10% de ácido acético.

## 4. RESULTADOS

**4.1. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA PARA AI-2** - O sobrenadante da cultura do *B. fragilis* B3b foi capaz de produzir a molécula AI-2, ativando o fenótipo de bioluminescência da cepa repórter em 372,4%. O sobrenadante do *B. vulgatus* ATCC 8482, que apresenta o gene *luxS* em seu genoma, foi capaz de induzir a produção de bioluminescência com 258,3%. Como esperado, o sobrenadante da cultura de *E. coli* K12 induziu 73,50%, enquanto que a cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  não foi capaz de induzir a produção de luz pelo *V. harveyi* BB170 (Fig. 6 & 10).



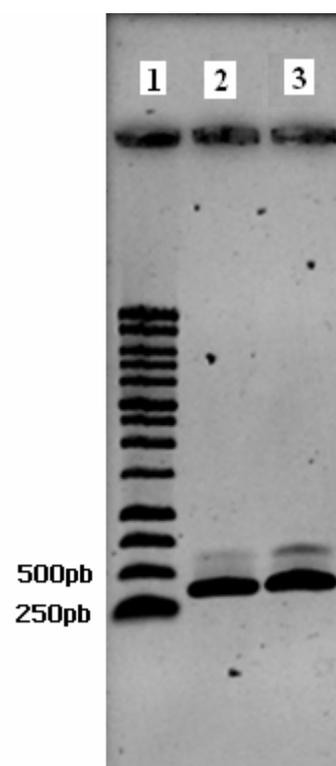
**Figura 6.** Avaliação do fenótipo AI-2 das culturas das cepas de *B. fragilis*, *B. vulgatus* e *E. coli*. Os sobrenadantes das culturas foram testados quanto a atividade do autoindutor-2 pelo bioensaio de autoindução com a cepa repórter *V. harveyi* BB170. Atividade da molécula AI-2 no sobrenadante da cepa selvagem *V. harveyi* BB120 (**BB120**), *B. vulgatus* ATCC 8482 (**Bv 8482**), *B. fragilis* B3b (**Bf B3b**) e o controle usando BHI estéril (**Controle**).

**4.2. PESQUISA DO GENE LUXS** - Após a detecção das cepas de *B. fragilis* B3b e *B. vulgatus* ATCC 8482 do fenótipo positivo para a molécula AI-2, o próximo passo foi fazer uma avaliação genotípica dessas mesmas cepas utilizando os iniciadores desenhados a partir de regiões internas do gene *luxS* do *B. vulgatus* ATCC 8482. A reação de

amplificação utilizando os iniciadores LuxSF / LuxSR resultou em fragmentos de DNA amplificados de aproximadamente 388 pb em ambas as cepas de *Bacteroides* (*B. vulgatus* ATCC8482 [Controle positivo] e *B. fragilis* B3b). Esses produtos amplificados apresentaram aproximadamente o mesmo tamanho que o esperado para *luxS* do *B. vulgatus*, indicando a presença de um possível *luxS* para a cepa de *B. fragilis* B3b (Fig. 7).

**Figura 7.** Pesquisa do gene *luxS* em *B. Fragilis*.

Eletroforese da reação de PCR utilizando os iniciadores confeccionados para a região interna dos genes *luxS* do *B. vulgatus* ATCC 8482. Linha 1: Padrão de tamanho molecular 1Kb; Linha 2: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. vulgatus* ATCC 8482 (388pb); Linha 3: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. fragilis* B3b (~388pb).



**4.3. PRESENÇA DE UM GENE *LUXS* ORTÓLOGO EM *B. FRAGILIS*** - Além da clonagem e expressão, uma análise por BLAST da seqüência de aminoácidos derivada da tradução do gene *luxS* de *B. fragilis* identificado nesse trabalho, pela base de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), revelou alta identidade com várias proteínas S-ribosilhomocisteinase. A seqüência do *B. fragilis* B3b exibiu 93% de identidade (121 de

129 resíduos de aminoácidos), com o S-ribosilhomocisteinase proteína de *B. vulgatus* ATCC8482. A seqüência também foi comparada a uma outra espécie bacteriana pertencente ao grupo dos *Bacteroidetes* (*Porphyromonas gingivalis* W83), que têm se mostrado funcional para a produção da molécula sinalizadora AI-2, apresentando 71% de identidade (92 de 129 resíduos de aminoácidos) e 80% de similaridade (104 de 129 resíduos de aminoácidos) (Fig. 8).

Bf B3b	<b>MKTIPSFTIDHIRSLRGIYVSRKDEVGGETVTTTFDIRMKEPNREPALGQG</b>	50
Bv ATCC8482	<b>MKTIPSFTIDHIRLLRGIYVSRKDEVGGETVTTTFDIRMKEPNREPALGQG</b>	50
Pg W83	<b>MEKIPSFQLDHIRLKRGIYVSRKDYIGGEVVTTTFDIRMKEPNREPVLGAP</b>	50
Bf B3b	<b>ALHTIEHLAATYLRNHPIWSDKIVYWGPWGCLTGNYLMLKGD LKSE DIVE</b>	100
Bv ATCC8482	<b>ALHTIEHLAATYLRNHPIWSDKIVYWGPWGCLTGNYLMLKGD LKSE DIVE</b>	100
Pg W83	<b>ELHTIEHLAATYLRNHPLYKDRIVFWGPMGCLTGNYFLMRGDYVSKDILP</b>	100
Bf B3b	<b>LMQETFRFVADFEERRSYPGAAPKDCRELLAS</b>	131
Bv ATCC8482	<b>LMQETFRFVADFEFE - VPGAAPKDCGN YLLH</b>	130
Pg W83	<b>LMQETFRFIRDFEFE - VPGTEPRDCGNCLLH</b>	130

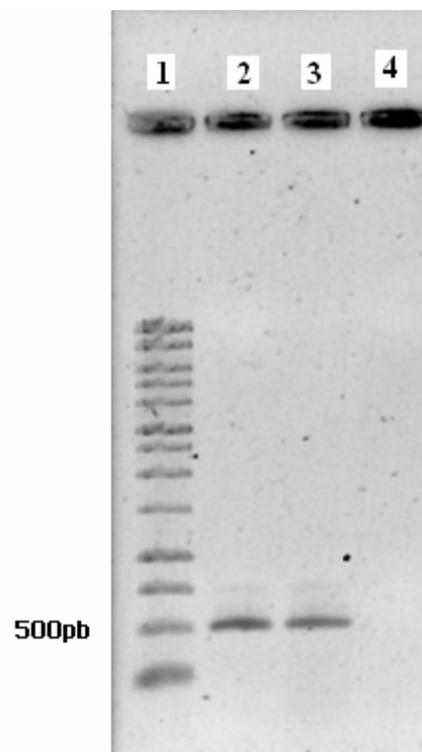
**Figura 8.** Alinhamento das sequencias de aminoácidos S-ribosilhomocisteinase *B. fragilis* B3b, *B. vulgatus* ATCC8482 (Numero de acesso GenBank ABR38590.1) and *P. gingivalis* W83 (Numero de acesso GenBank AAQ65692.1). A sequencia encontrada na cepa *B. fragilis* B3b apresentou alta similaridade com domínios conservados das proteínas da família LuxS.

#### 4.4. CLONAGEM E EXPRESSÃO DE LUXS<sup>BV</sup> E LUXS<sup>BF</sup>

Com o intuito de avaliar o papel dos genes putativos *luxS* de ambas as cepas (*B. vulgatus* ATCC8482 e *B. fragilis* B3b) foi realizada reação de amplificação utilizando os iniciadores LuxSNdeIF / LuxSXhoIR que flanqueiam o gene *luxS* da cepa *B. vulgatus* ATCC 8482. Os

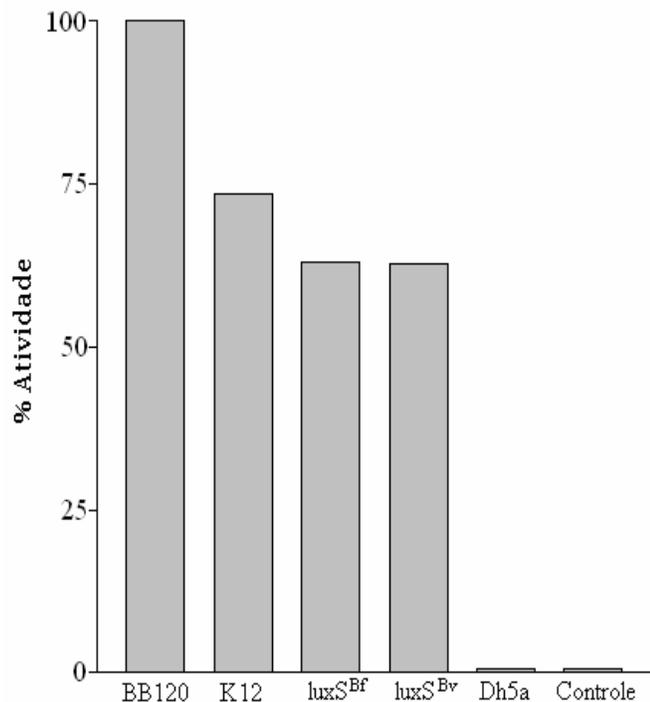
resultados apresentaram produtos amplificados de aproximadamente 507 pb em ambas as cepas de *Bacteroides* (Fig. 9).

**Figura 9.** Amplificação do gene *luxS*. Eletroforese da reação de PCR utilizando os iniciadores confeccionados para as regiões que flanqueiam o gene *luxS* do *B. vulgatus* ATCC 8482. Linha 1: Padrão de tamanho molecular 1Kb; Linha 2: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. vulgatus* ATCC 8482 (507pb); Linha 3: Amplificado obtido do DNA total da cepa *B. fragilis* B3b (~507pb); Linha 4: Controle negativo da reação.



Os fragmentos foram então clonados no vetor de expressão pET26b+. A cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que é incapaz de produzir AI-2, foi transformada com pET26b+ - luxS<sup>bv</sup> e pET26b+ - luxS<sup>Bf</sup>, com o objetivo de complementar a produção de AI-2 da *E. coli* DH5 $\alpha$  através da expressão heteróloga de genes de *luxS* dos *Bacteroides*. Os bioensaios de autoindução foram realizados em seguida, revelando que dos quarenta clones obtidos somente dois clones forma capazes de induzir do fenótipo de bioluminescência na cepa repórter *V. harveyi* BB170 de 63,1% pela *E. coli* DH5 $\alpha$ /luxS<sup>Bv</sup> e 62,7% pela *E. coli*

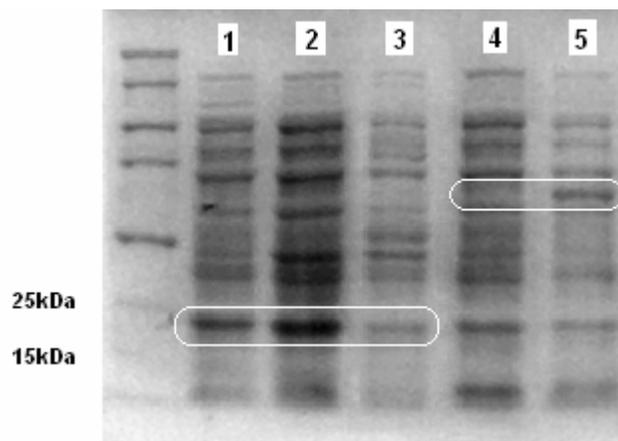
DH5 $\alpha$ /luxS<sup>Bf</sup>. Nenhuma indução de produção de luz foi observada quando o sobrenadante da *E. coli* DH5 $\alpha$  não transformada foi testado (Fig. 10).



**Figura 10.** Fenótipo AI-2. Atividade da molécula AI-2 nos sobrenadantes das cepas transformadas *E. coli* Dh5 $\alpha$  / pET26b+ - luxSbf (**luxS<sup>Bf</sup>**) *E. coli* Dh5 $\alpha$  / pET26b+ - luxSbv (**luxS<sup>Bv</sup>**). Além das cepas selvagens *V. harveyi* BB120 (**BB120**) e *E. coli* K12 (**K12**) como controles positivos e da cepa não transformada *E. coli* Dh5 $\alpha$  (**Dh5 $\alpha$** ) e o LB estéril (**Controle Negativo**).

A cepa de *E. coli roseta* luxS<sup>Bf</sup>B1 foi então avaliada quanto ao aumento da expressão da proteína LuxS após indução por IPTG em seu perfil de proteína total. Os resultados preliminares demonstraram um aparente aumento da expressão da proteína LuxS (Fig. 11).

**Figura 11.** SDS-PAGE com a análise das proteínas totais da cepa *E. coli roseta* com o vetor pET26b+ ligada ao gene *luxS*. Demonstra a indução da expressão da proteína S-ribosilhomocisteinase na cepa *E. coli roseta* com IPTG (linha 2) quando comparada com a mesma cepa porém sem indução (linha 1); Linha 3: Perfil da proteína total da cepa *E. coli roseta*; Controle positivo sem indução (linha 4) e Controle positivo com indução (linha 5).



## 5. DISCUSSÃO

O intestino humano tem se revelado um ambiente rico em interações de diferentes níveis, apresentando complexas formas de relacionamentos tanto entre os microrganismos como entre os microrganismos e seu hospedeiro. No entanto, essas interações podem se apresentar com uma incrível versatilidade de comportamento. Em alguns momentos, essas interações podem ser benéficas, quando ambas as partes envolvidas convivem pacificamente, e até mesmo cooperando entre si. Em outros momentos, podem se revelar extremamente prejudiciais, quando pelo menos um dos envolvidos é prejudicado de forma a estabelecer um desequilíbrio, dependendo do papel exercido por cada parte envolvida. As espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* estão se destacando bastante nos últimos anos exatamente por apresentarem essas alterações no seu comportamento. Podendo se comportar como comensais, ajudando na aquisição de nutrientes, ou em associação com o tecido linfóide (GALT) na maturação do sistema imune, e até mesmo auxiliando no desenvolvimento de resistência às infecções. No entanto, essas espécies também podem adquirir um papel patogênico na microbiota da qual fazem parte. Alterando sua regulação gênica, passam a expressar fatores de virulência como adesinas, proteases, evasinas e toxinas que causam desde infecções leves até infecções que podem levar ao óbito. Essa grande versatilidade revela a sua incrível capacidade de se adaptar e sobreviver a diferentes alterações do ambiente e a várias adversidades que o ambiente intestinal proporciona (WEXLER, 2007). A espécie *B. fragilis*, frequentemente isolada de espécimes clínicos, é considerada um patógeno oportunista, não somente devido aos seus fatores de virulência, mas também devido a seu comportamento em infecções polimicrobianas (ANTUNES *et al.*, 2005).

O comportamento de sinergismo sugere que algumas dessas características podem estar relacionadas a sistemas QS. Antunes e colaboradores foram os primeiros a associar o gênero *Bacteroides* ao sistema de comunicação AI-2/LuxS (ANTUNES *et al.*, 2005). A motivação para essa investigação se deu, principalmente, porque algumas das espécies do gênero são frequentemente associadas a infecções polimicrobianas que envolvem espécies como *P. aeruginosa* e *S. aureus* (BROOK, 1987), dois dos microrganismos mais bem definidos quanto ao envolvimento do QS na patogenicidade (KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). Em 2007, Pumbwe e colaboradores associaram a formação de biofilme e resistência múltipla a drogas a sistemas do tipo intra-específico na espécie *B. fragilis*. Segundo esses autores, moléculas do tipo AHL estariam sendo associados ao aumento da formação de biofilmes e atuando na regulação da expressão do gene *bmeB*, responsável pelo fenótipo das bombas de efluxo.

Muitos estudos têm demonstrado que diferentes sistemas de QS estão relacionados à coordenação da ativação de diferentes fatores de virulência em vários microrganismos patogênicos no ambiente intestinal (KAPER & SPERANDIO, 2005; KIEVIT & IGLEWSKI, 2000). O melhor exemplo já descrito é o patógeno humano *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), que coloniza o intestino grosso causando diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica-urêmica (KAPER & SPERANDIO, 2005). Sistemas de QS atuam na regulação da ilha de patogenicidade LEE, que são responsáveis pela formação da lesão *attaching and effacing* (AE). Inicialmente, foi sugerido que o AI-2 estava envolvido na regulação dos genes, uma vez que a inativação do gene *luxS* afeta a expressão de LEE. No entanto, investigações posteriores apontaram para uma molécula com características químicas distintas das encontradas na molécula AI-2, sugerindo então uma terceira molécula, chamada AI-3 (KAPER & SPERANDIO, 2005). Em 2003,

Sperandio e colaboradores utilizaram culturas anaeróbias de amostras da microbiota intestinal de voluntários saudáveis e demonstraram que ambos os AIs estavam presentes. Para obter maiores informações em relação à produção de AI-2 e AI-3 em microrganismos comensais e patogênicos, cepas isoladas de pacientes foram testados usando os bioensaios específicos para cada molécula. Foi observada a presença de ambos os auto-indutores tanto em EPEC, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., quanto em comensais como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. Esses dados indicaram que a produção do AI-3 não se limitava a EHEC, e que além do AI-2, o AI-3 também poderia estar envolvido na comunicação inter-espécies (WALTERS & SPERANDIO, 2006).

Frente a diferentes formas de interações, o gene *luxS* se apresenta como um importante alvo de estudo nas investigações de QS. Sua deleção tem um efeito direto sobre a produção do AI-2 e apresenta um efeito pleiotrópico sobre a produção do AI-3, sugerindo que alguns fenótipos associados à molécula AI-2 podem, na verdade, ser dependentes da sinalização efetuada pela molécula AI-3. Um trabalho associando sua inativação e a administração de moléculas sinalizadoras podem revelar informações importantes. Em um estudo anterior, o nosso grupo de pesquisa identificou várias cepas de *Bacteroides* que foram capazes de estimular a produção da bioluminescência em ensaios com o *V. harveyi*, demonstrando pela primeira vez que cepas de *Bacteroides* eram capazes de produzir AI-2 ativos (ANTUNES *et al.*, 2005).

Levando em consideração a associação existente entre a presença do AI-2 e o gene *luxS*, o próximo passo foi a busca pelo *luxS* ortólogo nas cepas que demonstraram atividade do AI-2. Muitas estratégias foram usadas para se pesquisar o gene, incluindo iniciadores confeccionados a partir de regiões conservadas das seqüências de nucleotídeos do *luxS* de várias espécies de diferentes grupos bacterianos, incluindo o grupo dos *Bacteroidetes*. Os

resultados, no entanto, não se mostraram satisfatórios, pois além de uma dificuldade em se estabelecer as concentrações necessárias dos reagentes e seus respectivos ciclos de reação, os fragmentos amplificados obtidos, quando seqüenciados, não demonstraram relação significativa com genes relacionados à sinalização, apenas com genes do metabolismo do *B. fragilis* e de cepas não cultiváveis. Foi apenas em 2007 que o genoma completo de *B. vulgatus* ATCC8482 foi descrito, revelando uma seqüência gênica que apresenta uma possível ORF de uma proteína com uma arquitetura semelhante às proteínas pertencentes à superfamília da S-ribosilhomocisteinase (XU *et al.*, 2007). A seqüência de aminoácidos, e não a seqüência de nucleotídeos, demonstrou áreas estruturalmente conservadas da proteína que poderiam ser classificadas como um LuxS putativo. Esses resultados demonstraram que as nossas tentativas anteriores, baseadas na confecção de iniciadores a partir de regiões conservadas de diferentes genes, de fato não representavam boas estratégias. Assim, se baseado no genoma seqüenciado do *B. vulgatus* ATCC 8482, foram confeccionados primeiramente iniciadores para amplificar regiões internas do gene *luxS* e, posteriormente, regiões que flanqueiam o gene. O primeiro par de iniciadores foi empregado somente para detectar um possível *luxS* em cepas produtoras de AI-2, enquanto que o segundo foi utilizado na clonagem e expressão heteróloga do gene. Os resultados de seqüenciamento dos amplificados obtidos demonstraram, em uma análise comparativa por BLAST, que a seqüência de aminoácidos do *B. fragilis* B3b apresenta uma identidade marcante com a S-ribosilhomocisteinase do *B. vulgatus* ATCC8482, assim como com a proteína LuxS do *P. gingivalis* W83 (CHUNG *et al.*, 2001) (Fig. 8). A proteína S-ribosilhomocisteinase do *P. gingivalis* W83 foi usada como parâmetro de comparação por se apresentar como a única espécie do grupo dos *Bacteroidetes* com o *luxS* já descrito como funcional e como

produtora da molécula AI-2, com importante função sinalizadora em seu sistema *Quorum Sensing*.

Embora não seja claro se a principal função das enzimas LuxS e Pfs está relacionada ao metabolismo (através da conversão de S-adenosylhomocysteine em DPD e homocisteína, uma molécula precursora AI-2) ou a sinalização populacional, estudos têm demonstrado um fato interessante encontrado na via biossintética do AI-2, mais precisamente na via de detoxificação da SAM encontrada em células eucariontes, arqueas e bactérias que não possuem o gene *luxS*. Depois da transferência do radical metila da molécula de SAM, o intermediário tóxico SAH é convertido em adenosina e homocisteína em apenas uma etapa de detoxificação catalisada pela enzima SAH hidrolase (WINZER *et al.*, 2002). No entanto, ao invés de apenas uma etapa de detoxificação, as espécies bacterianas que possuem o gene *luxS* apresentam um processo mais elaborado que envolve duas etapas para esse mesmo propósito. Existem apenas dois exemplos descritos na literatura científica de espécies bacterianas que apresentam as enzimas SAH hidrolase e LuxS, porém a aquisição de um dos genes dessas enzimas através de transferência horizontal (SUN *et al.*, 2004). Além desse aspecto, todas as bactérias que possuem o gene *luxS* também possuem o gene *pfs* (NCBI) e poucas apresentam apenas o gene *pfs*. Ambos os processos produzem dois produtos recicláveis, porém a vantagem da via na qual a proteína LuxS está presente é que um dos produtos é uma molécula que apresenta a propriedade sinalizadora (XAVIER & BASSLER, 2003).

A análise de alguns genomas completos de espécies pertencentes ao gênero *Bacteroides* revelou um aspecto interessante: os genomas de *B. fragilis* ATCC 25285 (NCTC 9343), *B. fragilis* YCH46 e *B. thetaiotaomicron* VPI-5482 apresentaram o gene da SAH hidrolase e ausência de *luxS*, enquanto que o de *B. vulgatus* ATCC8482 apresentou os

genes *luxS* e *pfs*, e ausência do gene das SAH hidrolases. Além disso, os resultados do presente estudo com *B. vulgatus* ATCC8482 demonstraram a sua capacidade de produzir AI-2, através do bioensaio (Fig. 6). Para testar a hipótese de que os genes putativos que apresentam domínios semelhante a um S-ribosilhomocisteinase eram os responsáveis pela produção de AI-2, foram identificados os possíveis genes *luxS* ortólogos nas cepas de *B. vulgatus* e *B. fragilis* produtoras de AI-2 através de expressões heterólogas em *E. coli* DH5 $\alpha$ . As expressões heterólogas de ambos *luxS* ortólogos foram capazes de restaurar o fenótipo AI-2 em *E. coli* DH5 $\alpha$  (pET26b + - *luxSbv* e pET26b + - *luxSbf*) (Fig. 10), sugerindo que os *luxS* das cepas *B. fragilis* B3b e *B. vulgatus* ATCC8482 apresentam as seqüências necessárias para que as respectivas enzimas sejam capazes de produzir a molécula AI-2, enquanto que a *E. coli* DH5 $\alpha$  não transformada é incapaz de sintetizar AI-2. Vale lembrar que esse trabalho está baseado em verificar se as cepas em questão apresentariam genes com seqüências íntegras, capazes de gerar proteínas funcionais. No entanto, é importante citar que essa expressão heteróloga não está levando em consideração a regulação que os respectivos promotores são submetidos quando em sua própria maquinaria celular, visto que os genes foram clonados em um vetor de expressão (pET26b+) sob a regulação de um promotor diferente do original e submetido à maquinaria celular de uma cepa de *E. coli*. Com o intuito de restabelecer a produção da molécula sinalizadora, o melhor hospedeiro que poderia ser utilizado era de fato a *E. coli* DH5 $\alpha$ , porém o vetor de expressão que se apresentou disponível para ser utilizado no momento não era o ideal, exatamente por se tratar de um vetor com regulação por promotor T7 e a célula *E. coli* DH5 $\alpha$ , por ser derivada da cepa selvagem *E. coli* K12, não apresentar o gene da RNAPolimerase III necessária para sua ativação. A expressão verificada, no entanto, se apresentou possível provavelmente pelo fato de que uma infecção por qualquer

bacteriófago do tipo  $\lambda$  facilmente restabelece a regulação pelo promotor T7. Para suprir essa carência metodológica o mesmo experimento de expressão do gene *luxS* ortólogo do *B. fragilis* B3b foi realizado, agora, porém com a cepa *E. coli roseta* própria para o vetor pET26b+. Pode-se verificar nesse ensaio preliminar o aumento da expressão de uma proteína da aproximadamente 18 kDa quando analisada por SDS-PAGE, condizente com o tamanho da proteína S-ribosilhomocisteinase do *B. vulgatus*, quando adicionado IPTG ao meio de cultura (Fig. 11).

## 6. CONCLUSÃO

Apesar da baixa frequência do gene *luxS* em espécies de *Bacteroides*, a descoberta de cepas que apresentam esse gene em seu genoma e sua capacidade de codificar enzimas funcionais que produzem moléculas de AI-2 viáveis nos permite ampliar nossos estudos sobre QS como um ponto de partida para elucidar os efeitos das moléculas AI-2 e AI-3 sobre a fisiologia das espécies do gênero *Bacteroides*. Logo, a construção de um mutante isogênico para *luxS* e seus respectivos efeitos é fundamental para se elucidar o papel funcional de ambas as moléculas na sinalização e regulação da expressão gênica em espécies do gênero *Bacteroides*.

Com isso, nossos resultados sugerem que algumas cepas de *Bacteroides* apresentam *luxS* ortólogo com a seqüência de aminoácidos estruturalmente conservada, se enquadrando perfeitamente dentro da superfamília das S-ribosilhomocisteína, além de ter se apresentado funcional e necessária para a biosíntese da molécula AI-2. Esses resultados possibilitaram a abertura de um amplo campo de investigação a respeito da influência das sinalizações mediada por sistemas QS nos mecanismos que envolvem a transição comportamental de

comensais a patógenos. Além de fornecer uma outra forma de se compreender a fisiologia geral das espécies do gênero *Bacteroides*.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANSALDI, M.; MAROLT, D.; STEBE, T.; MANDIC-MULEC, I. & DUBNAU, D. **Specific activation of the *Bacillus* quorum-sensing systems by isoprenylated pheromone variants.** Mol. Microbiol., 44, 1561–1573, 2002.

ANTUNES, L.C.; FERREIRA, L.Q.; FERREIRA, E.O.; MIRANDA, K.R.; AVELAR, K.E.S.; DOMINGUES, R.M.C.P. & FERREIRA, M.C.S. ***Bacteroides* species produce *Vibrio harveyi* autoinducer 2-related molecules.** Anaerobe., 11(5), 295-301, 2005.

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R.E. & SILVERMAN, M.R. **Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence.** Mol. Microbiol., 9, 773–786, 1993.

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M. & SILVERMAN, M.R. **Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*.** Mol. Microbiol., 12, 403-412, 1994a.

BASSLER, B.L.; WRIGHT, M.; & SILVERMAN, M.R. **Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of gene encoding a second sensory pathway.** Mol. Microbiol., 13, 273-286, 1994b.

BASSLER, B.L.; GREENBERG, E.P. & STEVENS, A.M. **Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*.** J. Bacteriol., 179, 4043-4045, 1997.

BASSLER, B. L. **Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria.** Cell., 109, 421–424, 2002.

BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; SAHL, H.G.; SIEZEN, R.J.; HATTER, K.L. & GILMORE, M.S. **Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic.** Mol. Microbiol., 21, 1175–1184, 1996.

BROOK, I. **Pathogenicity and therapy of anaerobic bacteria in upper respiratory tract infections.** The Pediatr Infect dis., 6, 1313-1316, 1987.

BURGESS, N.A.; KIRKE, D.F.; WILLIAMS, P.; WINZER, K.; HARDIE, K.R.; MEYERS, N.L.; ADUSE-OPOKU, J.; CURTIS, M.A. & CAMARA, M. **LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence.** Microbiology., 148, 763-772, 2002.

CAO, J.G. & MEIGHEN, E.A. **Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*.** J. Biol. Chem., 264, 21670–21676, 1989.

CERDENO-TARRAGA, A.M.; PATRICK, S.; CROSSMAN, L.C.; BLAKELY, G.; ABRATT, V.; LENNARD, N.; POXTON, I.; DUERDEN, B.; HARRIS, B.; QUAIL, M.A.; BARRON, A.; CLARK, L.; CORTON, C.; DOGGETT, J.; HOLDEN, M.T.; LARKE, N.; LINE, A.; LORD, A.; NORBERTCZAK, H.; ORMOND, D.; PRICE, C.; RABBINOWITSCH, E.; WOODWARD, J.; BARRELL, B. & PARKHILL, J. **Extensive DNA inversions in the *B. fragilis* genome control variable gene expression.** Science., 307(5714), 1463-1465, 2005.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A. & PELCZER, I, **Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron.** Nature., 415, 545–549, 2002.

CHUNG, W.O.; PARK, Y.; LAMONT, R.J.; MCNAB, R.; BARBIERI, B. & DEMUTH, D.R. **Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein.** J Bacteriol., 183, 3903-3909, 2001.

EBERL, L. & TUMMLER, B. ***Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation.** Int. J. Med. Microbiol., 294, 123–131, 2004.

DIBAISE, J.K. ZHANG, H. CROWELL, M.D. KRAJMALNIK-BROWN, R. DECKER, G.A. & RITTMANN, B.E. **Gut microbiot and its possible relationship with obesity.** Mayo Clin. Proc. 83:460-469, 2008.

FALAGAS, M.E., & SIAKAVELLAS, E. ***Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options.** Int. J. Antimicrob. Agents., 15, 1–9, 2000.

FERREIRA, E.O.; CARVALHO, J.B.; PEIXOTO, R.J.; LOBO, L.A.; ZINGALLI, R.B.; SMITH, C.J.; ROCHA, E.R. & DOMINGUES, R.M. **The interaction of *Bacteroides fragilis* with components of the human fibrinolytic system.** FEMS Immunol Med Microbiol., 56(1), 48-55, 2009.

FINEGOLD, S.M. **Anaerobic bacteria in human disease.** Academic Press, New York, N.Y. 1977.

FREEMAN, J.A. & BASSLER, B.L. **A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*.** Mol. Microbiol., 31, 665–677, 1999a.

FREEMAN, J.A. & BASSLER, B.L. **Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*.** J. Bacteriol., 181(3), 899–906, 1999b.

FREEMAN, J.A.; LILLEY, B.N. & BASSLER, B.L. **A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*.** Mol. Microbiol., 35, 139–149, 2000.

FRIAS, J.; OLLE, E. & ALSINA, M. **Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules.** Infect. Immun., 69, 3431-3434, 2001.

FONG, K.P.; CHUNG, W.O.; LAMONT, R.J. & DEMUTH, D.R. **Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS.** Infect Immun., 69, 7625-7634, 2001.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; & GREENBERG, E.P. **Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators.** J. of Bacteriol., 176(2), 269-275, 1994.

FUQUA, C.; PARSEK, M.R. & GREENBERG, E.P. **Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing.** Annu. Rev. Genet., 35, 439–468, 2001.

FUQUA, C. & GREENBERG, E.P. **Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3, 685–695, 2002.

GAMBELLO, M.J. & IGLEWSKI, B.H. **Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression.** J. Bacteriol. 173, 3000–3009, 1991.

GIBSON, F.C.III; ONDERDONK, A.B.; KASPER, D.L. & TZIANABOS, A.O. **Cellular mechanism of intraabdominal abscess formation by *Bacteroides fragilis*.** J. Immunol., 160(10), 5000-5006, 1998.

GREENBERG, E.P.; HASTINGS, J.W. & ULITZUR, S. **Induction of luciferase synthesis in *Beneckea harveyi* by other marine bacteria.** Arch. Microbiol., 120, 87-91, 1979.

GOULD, T.A.; SCHWEIZER, H.P. & CHURCHILL, M.E. **Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acylhomoserinelactone synthase LasI.** Mol. Microbiol., 53, 1135–1146, 2004.

HASTINGS, J.W. & NEALSON, K.H. **Bacterial bioluminescence.** Annu. Rev. Microbiol., 31, 549–595, 1977.

HANZELKA, B.L.; STEVENS, A.M.; PARSEK, M.R.; CRONE, T.J. & GREENBERG, E.P. **Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase.** J. Bacteriol., 179, 4882–4887, 1997.

HANZELKA, B.L.; PARSEKMR, V.A.L.; DUNLAPPV, D.L.; CRONAN, J.E. & GREENBEREP, J.R. **Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein.** J. Bacteriol., 181, 5766–5770, 1999.

HENKE, J.M. & BASSLER, B.L. **Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*.** J. Bacteriol., 186, 6902–6914, 2004.

HOLD, G.L.; PRYDE, S.E.; RUSSELL, V.J.; FURRIE, E. & FLINT, H.J. **Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis.** FEMS Microbiol Ecol., 39(1), 33-39, 2002.

HOLDMAN, L.V.; KELLY, R.W. & MOORE, W.E.C. **Genus I. Bacteroides** In: Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), Bergy's manual of systematic bacteriology, vol. 1, 604-631. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1984.

Jl, G.; BEAVIS, R.C. & NOVICK, R.P. **Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 12055–12059, 1995.

JOHNSON, J.L. **Taxonomy of the *Bacteroides*. I. Deoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species.** Int. J. Syst. Bacteriol., 28, 245-256, 1978.

JOHNSON, J.L. & HARICH, G. **Ribosomal ribonucleic acid homology among species of the genus *Bacteroides*.** Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 71-79, 1986.

KAPER, J.B. & SPERANDIO, V. **Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract.** Infect Immun., 73(6), 3197-3209, 2005.

KELLER, L. & SURETTE, M.G. **Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective.** Nat Rev Microbiol., 4(4), 249-58, 2006.

KIEVIT, T.R. & IGLEWSKI B.H. **Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships.** Infect Immun., 68(9), 4839-4849, 2000.

KIEVIT, T. R.; GILLIS, R.; MARX, S.; BROWN, C. & IGLEWSKI, B. H.. **Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns.** Appl. Environ. Microbiol. 67, 1865–1873, 2001.

KOETH, L.M.; GOOD, C.E.; APPELBAUM, P.C.; GOLDSTEIN, E.J.C.; RODLOFF, A.C.; CLAROS, M. & DUBREUIL, L. J. **Surveillance of susceptibility patterns in 1297 Europeans and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobials agents.** J. Antimicrob. Chemother., 53, 1039-1044, 2004.

KRINOS, C.M.; COYNE, M.J.; WEINACHT, K.G.; TZIANABOS, A.O.; KASPER, D.L. & COMSTOCK, L.E. **Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions.** *Nature.*, 414, 555–558, 2001.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 227, 680-685, 1970.

LERAT, E. & MORAN, N.A. **The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria.** *Mol Biol Evol.* 21(5), 903-913, 2004.

LIU, C. SONG, Y., MCTEAGUE, M., VU, A. W., WEXLER, H., FINEGOLD, S. M. **Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers.** *FEMS Microbiol Lett.* 16, 222(1), 9-16, 2003.

LYON, G.J.; WRIGHT, J.S.; MUIR, T.W. & NOVICK, R.P. **Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*.** *Biochemistry* 41, 10095–10104, 2002.

MAYVILLE, P.; JI, G.; BEAVIS, R.; YANG, H. & GOGER, M. **Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1218–1223, 1999.

MILLER, M.B. & BASSLER, B.L. **Quorum sensing in bacteria.** *Annu Rev Microbiol.*, 55, 165-199, 2001.

MILLER, S.T.; XAVIER, K.B.; CAMPAGNA, S.R.; TAGA, M.E. & SEMMELHACK, M.F. **A novel form of the bacterial quorum sensing signal AI-2 recognized by the *Salmonella typhimurium* receptor LsrB.** *Mol. Cell.*, 15, 677–87, 2004.

MIRANDA, K. R. **Detecção da expressão de auto-indutores em cepas de *Bacteroides fragilis*.** Dissertação de Mestrado apresentado ao Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes/UFRJ, 2005.

MORE, M.I.; FINGER, L.D.; STRYKER, J.L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A. & WINANS, S.C. **Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates.** *Science*, 272, 1655–1658, 1996.

MYERS, L.L. & SHOOP, D.S. **Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with diarrheal disease in young pigs.** *Am. J. Vet. Res.*, 48(5), 774-775, 1984.

NAKAYAMA, J.; CAO, Y.; HORII, T.; SAKUDA, S. & AKKERMANS, A.D. **Gelatinase biosynthesis activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*.** *Mol. Microbiol.*, 41, 145–154, 2001.

NEALSON, K.H.; PLATT & HASTINGS, J.W. **Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system.** *J Bacteriol.*, 104(1), 313-322, 1970.

NEALSON, K.H. & HASTINGS, J.W. **Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance.** *Microbiol. Rev.*, 43, 496–518, 1979.

NOVICK, R.P.; ROSS, H.F.; PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; KREISWIRTH, B. & MOGHAZEH, S. **Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule.** *EMBO J.*, 12, 3967–3975, 1993.

NOVICK, R.P.; PROJAN, S.J.; KORNBLUM, J.; ROSS, H.F. & JI, G. **The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*.** *Mol. Gen. Genet.* 248, 446–458, 1995.

NOVICK R.P. **Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence.** *Mol. Microbiol.* 48, 1429–49, 2003.

OCHSNER UA, KOCH AK, FIECHTER A & REISER J. **Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa***. J. Bacteriol. 176, 2044–54, 1994.

OHTANI K, HAYASHI H & SHIMIZU T. **The luxS gene is involved in cell–cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens***. Mol Microbiol. 44, 171-179, 2002.

ONDERDONK, A.B., KASPER, D.L., CISNEROS, R.L. & BARTLET, J.G. **The capsular polysaccharide of *Bacteroides fragilis* as a virulent factor: comparison of the pathogenic potencial of encapsulated and unencapsulated strains**. J. Infect. Dis. 136, 82-89 1977a.

ONDERDONK, A.B., MOON, N.E., KASPER, D.L. & BARTLETT, J.G. **Adherence of *Bacteroides fragilis* in vivo**. Infect. Immun. 19, 1083, 1977.

ONDERDONK, A.B., CISNEROS, R.L., FINBERG, R., CRABB, J.H. & KASPER, D.L. **Animal model system for studying virulence of and host response to *Bacteroides fragilis***. Rev. Infect. Dis. 12 (S2), S169-177, 1990.

OLSEN I. & SHAH N.H. **International Committee on Systematics of Procaryotes – Subcommittee on the taxonomy of Gram-negative anaerobic rods**. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 58, 1051-1055, 2008.

PARSEK, M. R., D. L. VAL, B. L. HANZELKA, J. E. CRONAN, JR., AND E. P. GREENBERG. **Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4360–4365, 1999.

PARSEK, M. R., AND E. P. GREENBERG. **Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8789–8793, 2000.

PASTER, B.J., DEWHIRST, F.E., OLSEN, I. & FRASER, G.J. **Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. And related bacteria.** J. Bacteriol. 176, 725-732, 1984.

PATRICK, S. **Molecular Medical Microbiology.** M Sussman, Ed. (Academic Press, London. pp.1921-1948, 2002.

PEARSON J.P., PASSADOR L., IGLEWSKI B.H., GREENBERG E.P. **A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1490–94, 1995.

PEARSON J.P., GRAY K.M., PASSADOR L., TUCKER K.D. & EBERHARD A. **Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes.** Proc. Natl.Acad. Sci. USA 91, 197–201, 1994.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A. & OWEN, R.J. **Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate.** Lett. Appl. Microbiol. 8, 151-156, 1989.

PUMBWE L, SKILBECK C.A. & WEXLER H.M. **Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis*.** Microb Ecol. Oct;56(3):412-9, 2008.

RATH HC. **Role of commensal bacteria in chronic experimental colitis: lessons from the HLA-B27 transgenic rat.** Pathobiology. 70(3):131-8, 2003.

READING, NC & SPERANDIO, V. **Quorum sensing: the many languages of bacteria.** FEMS Microbiol Lett. Jan; 254(1):1-11, 2006.

REDONDO, M. C., ARBO M. D., GRINDLINGER J., SNYDMAN D. R. **Attributable mortality of bacteremia associated with the *Bacteroides fragilis* group.** Clin. Infect. Dis. 20:1492–1496, 1995.

SAENZ HL, AUGSBURGER V, VUONG C, JACK RW, GOTZ F. & OTTO M. **Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone.** Arch. Microbiol. 174:452–55, 2000.

SCHAUDER, S. & BASSLER B. L. **The languages of bacteria.** Genes Dev. 15:1468–1480, 2001.

SCHAUDER S, SHOKAT K, SURETTE MG, BASSLER BL. **The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule.** Mol. Microbiol. 41:463–76, 2001.

SEARS, C.L. **Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiontes.** Clin. Microbiol. Rev. 22:349-69, 2009.

SHAH, H.N. & COLLINS, M.D. **Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani & Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species.** Int. J. Syst. Bacteriol. 39:85-87, 1989.

SHOEMAKER CA, PUNGLIYA M, SAO PEDRO MA, RUIZ C, ALVAREZ SA, WARD M, RYDER EF, KRUSHKAL J. **Computational methods for single-point and multipoint analysis of genetic variants associated with a simulated complex disorder in a general population.** Genet Epidemiol. 21 Suppl 1:S738-45, 2001.

SMITH R.S. & IGLEWSKI B.H. ***P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence.** Curr. Opin. Microbiol. 6:56–60, 2003.

SNYDMAN, D. R., N. V. JACOBUS, L. A. MCDERMOTT, R. RUTHAZER, E. J. C. GOLDSTEIN, S. M. FINEGOLD, L. J. HARRELL, D. W. HECHT, S. G. JENKINS, C. PIERSON, R. VENEZIA, J. RIHS, AND S. L. GORBACH. **National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends for 1997-2000.** Clin. Infect. Dis. 35, S126–S134, 2003.

SONG Y, LIU C, BOLANOS M, LEE J, MCTEAGUE M. & FINEGOLD SM. **Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant *Bacteroides* species.** J Clin Microbiol. 43(4):1531-7, 2005.

SPERANDIO, V., TORRES A. G., JARVIS B., NATARO J. P. & KAPER J. B. **Bacteria-host communication: the language of hormones.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8951–8956, 2003.

SUAU A, BONNET R, SUTREN M, GODON JJ, GIBSON GR, COLLINS MD & DORÉ J. **Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut.** Appl Environ Microbiol. 65(11):4799-807, 1999

SUN, J., DANIEL, R., WAGNER-DÖBLER, I. & ZENG, A. **Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways.** BMC Evolutionary Biology. 29;4:36, 2004.

SURETTE, M. G. & BASSLER B. L.. **Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7046–7050, 1998.

SURETTE M.G, MILLER M.B. & BASSLER B.L. **Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production.** Proc Natl Acad Sci USA, 96:1639-1644, 1999.

TAGA M.E, SEMMELHACK JL & BASSLER BL. **The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*.** Mol. Microbiol. 42:777–93, 2001.

TAGA, M.E. & BASSLER, B.L. **Chemical communication among bacteria.** Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 25; 100 Suppl 2:14549-54. 2003

TENOVER F.C. & GAYNES R.P. **The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections.** In ***Gram- Positive Pathogens.*** ed. VA Fischetti, RP Novick, JJ Ferretti, DA Portnoy, JI Rood, pp. 414–21. Washington, DC: ASM Press, 2000.

TZIANABOS, A.O., ONDERDONK, A.B., ROSNER. B., CISNEROS, R.L. & KASPER, D.L. **Structural features of polysaccharides that induce intraabdominal abscesses.** Science **262**: 416–9, 1993.

VANNINI A, VOLPARI C, GARGIOLI C., MURAGLIA E. & CORTESE R.. **The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA.** EMBO J. 21:4393–401, 2002..

VISICK K.L., FOSTER J., DOINO J., MCFALL-NGAI M. & RUBY E.G. ***Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ.** J. Bacteriol. 182:4578–86, 2000.

WATERS C.M. & BASSLER B.L. **Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.** Annu Rev Cell Dev Biol. 21:319-46, 2005.

WALTERS M. & SPERANDIO V. **Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*.** Int J Med Microbiol. 296(2-3):125-31, 2006.

WATSON W.T., MINOGUE T.D., VAL D.L., VON BODMAN S.B. & CHURCHILL M.E. **Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing.** Mol. Cell 9, 685–94, 2002.

WEIKEL, C.S., GRIECO, F.D., REUBEN, J., MYERS, L.L. & SACK, R. B. **Human colonic epithelial cells, HT 29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alter their morphology.** Infect. Immun. 6, 321-327, 1992..

WEXLER, H. M. ***Bacteroides*: The good the bad, and the Nitty-Gritty.** Clinical Microbiology Reviews. 20 (4), 593-621, 2007.

WHOOLEY, M.A. & MCLOUGHLIN, A. **The proton motive force in *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to exoprotease production.** J Gen Microbiol, 129(4):989-96, 1983.

WINANS S.C. & BASSLER B.L. **Mob psychology.** J Bacteriol. 184(4):873-83, 2002.

WINZER K., SUN Y.H., GREEN A., DELORY M., BLACKLEY D., HARDIE K.R., BALDWIN T.J. & TANG C.M. **Role of *Neisseria meningitidis* luxS in cell-to-cell signaling and bacteremic infection.** Infect Immun, 70, 2245-2248, 2002.

XAVIER K.B., BASSLER B.L. **LuxS quorum sensing: more than just a numbers game.** Curr. Opin. Microbiol. 6, 191–17, 2003.

XU J., MAHOWALD M.A., LEY R.E., LOZUPONE C.A., HAMADY M., MARTENS E.C., HENRISSAT B., COUTINHO P.M., MINX P., LATREILLE P., CORDUM H., VAN BRUNT A., KIM K., FULTON R.S., FULTON L.A., CLIFTON S.W., WILSON R.K., KNIGHT R.D., GORDON J.I. **Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine.** PLoS Biol. 5(7):e156, 2007.

ZHU J. & WINANS S.C. **Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4832–37, 1999.

ZHU J. & WINANS S.C. **The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 1507–12, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)