

EFEITO DO USO DO MEIO CONDICIONADO NA EXPRESSÃO DE GENES FLAGELARES DE *Salmonella* TYPHIMURIUM

**RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO¹; RÉGIS TUCHTENHAGEN
STURBELLE¹; LEON, PRISCILA M. M.¹; LORENZON, LUCAS B.¹; CLÁUDIO
DIAS TIMM¹; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE²**

¹Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Quorum Sensing é um termo que vem sendo utilizado para designar um sistema de sinalização entre as bactérias, as quais produzem substâncias denominadas auto-indutores (AI). Quando estes atingem uma determinada concentração em decorrência do aumento da densidade celular, a bactéria detecta estas moléculas sinais e responde alterando a sua expressão gênica. Estudos têm utilizado este sistema de sinalização *Quorum Sensing* para melhor entender a patogenicidade das bactérias (WALTERS & SPERANDIO, 2006; SPERANDIO et al., 2002).

Até o momento, três tipos de auto-indutores têm sido descritos em bactérias Gram-negativas. O AI-1 está primariamente envolvido na comunicação intracelular, o AI-2 na comunicação entre as espécies e, há a produção de um terceiro auto-indutor, denominado AI-3, sendo também responsável por ativar a expressão gênica em *Salmonella* (SPERANDIO et al., 2003; JESUDHASAN et al.; 2010; BEARSON & BEARSON, 2008).

Adrenalina e noradrenalina são catecolaminas produzidas pelos mamíferos e utilizam a mesma via de sinalização do AI-3 das bactérias (SPERANDIO et al., 2003). Neste sentido, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando as catecolaminas para melhor entender as bactérias patogênicas, como *Salmonella*. Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos. A patogenicidade desta bactéria está relacionada a uma série de fatores de virulência e dentre estes podemos citar os flagelos (TOYOTA-HANATANI et al., 2008). Este é uma estrutura complexa que fornece mobilidade ao micro-organismo, sendo necessários mais de 50 genes para essa estrutura ser expressa (McQUISTON et al., 2008). A expressão do flagelo está entre os fatores de virulência induzidos por *Quorum Sensing* (BEARSON & BEARSON, 2008; MOREIRA et al., 2010).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o sistema de sinalização “*Quorum Sensing* (AI-3)” na expressão dos genes envolvidos na motilidade de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em resposta à exposição deste micro-organismo ao meio condicionado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias e Meios de Cultura

No experimento foi utilizado uma cepa de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ST) isolada pelo Laboratório de Produtos de Origem Animal (LIPOA-UFPel-Pelotas-RS) e sorotipada pela FIOcruz - RJ. O caldo Infusão

Cérebro e Coração (BHI, Acumedia), ágar Infusão Cérebro e Coração (BHA, Acumedia) e caldo Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma) foram utilizados como meios de cultivo. Adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$, E1635, Sigma) foi utilizada na concentração de 500 μ M.

Preparo do Meio Condicionado

Salmonella Typhimurium (ST) foi semeada em caldo BHI (Acumedia) por 18h a 37°C. A densidade ótica do cultivo foi ajustada para 1 (A_{600nm}) e alíquotas foram semeadas em MEM e incubadas em agitador orbital (Certomat^R BS-T) a 37°C por 7 h a 130 rpm. Após este período, o cultivo foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado (filtro de 0,22 μ m, Millipore). O meio condicionado (mc) foi preparado com 50% de sobrenadante + 10 % (500 μ M) de adrenalina + 30% de água destilada + 10% MEM concentrado 10 vezes.

Ensaio Moleculares

ST foi cultivada a 37°C por 7 horas a 130 rpm em meio MEM. Após este período, este cultivo foi centrifugado e o *pellet* utilizado para inocular o meio MEM (controle) e o meio condicionado. A partir do inóculo nos cultivos, amostras foram coletadas a cada trinta minutos, totalizando quatro coletas. Estas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em Trizol (Invitrogen) para fazer extração de RNA e síntese de cDNA. A síntese de cDNA foi realizada, segundo instruções do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems AB) e quantificado em espectrofotômetro (Nanovue) e estocado a -20°C até posterior uso.

A expressão dos genes foi determinada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), comparando as células induzidas com as células controle. Os *primers* usados na quantificação da expressão de cada gene por RT-PCR encontram-se listados na Tabela 1. As reações foram realizadas em duplicatas no equipamento Real-Time PCR System 7300 Applied Biosystems e com o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMixUDG (Applied Biosystems), seguindo instruções do fabricante.

A reação de PCR em tempo real consistiu em 236 ng de cDNA (sintetizado conforme descrito na seção anterior), 6,25 μ L de Platinum® SYBR® Green, 0,25 μ L de Rox Reference Dye, 0,5 μ M de cada primer e água em quantidade suficiente para um volume final de 12,5 μ L. As amostras foram submetidas à 45 ciclos nas seguintes condições de termo-ciclagem: 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos, sendo que a análise dos dados gerados foi feita com o auxílio do software Real-Time *MxPro - Mx3005P*.

Amostras com uma concentração inicial maior de mRNA do gene alvo alcançam um limite significativo na detecção por tempo real em menores números de ciclo na reação de PCR que as amostras que apresentam um mRNA inicial com uma menor concentração, desta forma é possível obter uma medida quantitativa da magnitude da expressão (ΔC_T) de cada gene de interesse, normalizado pela expressão do gene *16S* RNA ribossomal em cada amostra para corrigir a variação do conteúdo de cDNA da amplificação entre as amostras.

Tabela 1: *Primers* usados neste estudo.

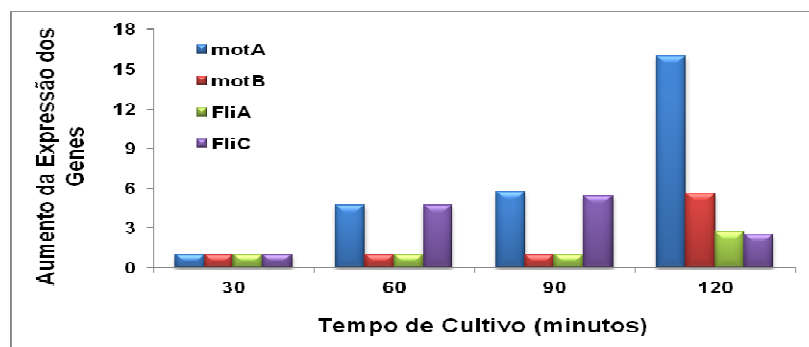
| Gene | Sequência do Primer (5' → 3') | Referência |
|------------|-------------------------------|-------------|
| <i>16S</i> | AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT | Nosso grupo |

| | | |
|--------------|---|----------------------------|
| | GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG | |
| <i>mot A</i> | GGTTATCGGTACAGTTTTTCG TAGATTTTGTGTATTTTCGAACG | FINK et al., 2007 |
| <i>mot B</i> | ATGAAAAATCAGGCTCATCCCA CATAAAATCGGCGTAGGCAATT | Nosso grupo |
| <i>fli A</i> | CGGAGTATCGTCAGATGTTG TTGATGTTCTTCAGTCACCAG | BEARSON & BEARSON, 2008 |
| <i>fli C</i> | GGCACAAGTCATTAATACAAACAGC TCTTTCGCGCTGTTGATACG | Nosso grupo |

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O ensaio de RT-PCR foi utilizado para verificar a expressão dos genes envolvidos na montagem e funcionalidade do flagelo durante a exposição de *Salmonella Typhimurium* à adrenalina e ao sobrenadante de um cultivo de ST, através do uso do meio condicionado. A partir dos resultados obtidos, podemos observar que os genes *mot A*, *mot B*, *fli C* e *fli A* de ST, tiveram um aumento na sua expressão em relação ao tratamento controle. Observamos uma indução de 16 vezes na expressão do gene *mot A*, sendo isso verificado duas horas após adição do mc (Figura 1). Proteínas como Mot A, assim como, Mot B, Fli G, Fli M e Fli N, têm sido identificadas como componentes da rotação do motor presentes na membrana citoplasmática e envolvidas em dirigir o flagelo bacteriano (NAKAMURA et al., 2009).

Figura 1: Expressão dos genes flagelares de *Salmonella Typhimurium* quando expostos ao meio condicionado.



4. CONCLUSÕES

Em resumo, este estudo demonstrou que adrenalina associada ao sobrenadante de uma cultura de *Salmonella Typhimurium* induziu uma maior expressão de genes envolvidos com a montagem e funcionalidade do flagelo de *Salmonella*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEARSON, B.L.; BEARSON, S.M.D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, n. 4, p. 271-78, 2008.

FINK, R.C.; EVANS, M.R.; PORWOLLIK, S.; VAZQUEZ-TORRES, A.; JONES-CARSON, J.; TROXELL, B.; LIBBY, S.J.; McCLELLAND, M.; HASSAN, H.M. FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium (ATTCC 14028s). **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2262-2273, 2007.

JESUDHASAN, P.R.; CEPEDA, M.L.; WIDMER, K.; DOWD, S.E.; SONI, K. A.; HUME, M.E.; ZHU, J.; PILLAI, S. Transcriptome analysis of genes controlled by *luxS*/autoinducer-2 in *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Food Pathogens and Disease**, v. 7, n. 4, p.399-410, 2010.

McQUISTON, J.R.; FIELDS, P.I.; TAUXE, R.V.; LOGSDON Jr, J.M. Do *Salmonella* carry spare tyres? **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 142-48, 2008.

MOREIRA, C.G.; WEINSHENKER, D.; SPERANDIO, V. QseC mediates *Salmonella enteric* serovar Typhimurium virulence in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 914-926, 2010.

NAKAMURA, S.; MORIMOTO, Y.V.; KAMI-IKE, N.; MINAMINO, T.; NAMBA, K. Role of a Conserved Prolyl Residue (Pro173) of Mot A in the Mechanochemical Reaction Cycle of the Proton-Driven Flagellar Motor of *Salmonella*. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, p. 300-307, 2009.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; KAPER, J.B. Quorum Sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in E.coli. **Molecular Microbiology**, v.43, n.3, p.809-21, 2002.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; JARVIS, B.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Bacteria-host communication : the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, p. 8951-56, 2003.

TOYOTA-HANATANI, Y.; INOUE, M.; EKAWA, T.; OHTA, H.; IGIMI, S.; BABA, E. Importance of the major FliC antigenic site of *Salmonella* Enteritidis as a subunit vaccine antigen. **Vaccine**, v. 26, p. 4135-37, 2008.

WALTERS, M.; SPERANDIO, V. Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection Immunity**, v.74, p. 5445-55, 2006.