

Isabel Monteiro Conrado

BACTÉRIAS E AS SUAS REDES SOCIAIS

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2013

Isabel Monteiro Conrado

BACTÉRIAS E AS SUAS REDES SOCIAIS

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2013

Isabel Monteiro Conrado

BACTÉRIAS E AS SUAS REDES SOCIAIS

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Isabel Monteiro Conrado

Resumo

As bactérias são microorganismos primitivos unicelulares que habitam em nichos ecológicos formando comunidades multiespécie e sintetizam moléculas sinalizadoras que lhes permitem comunicar entre si por um mecanismo designado de *quorum sensing*. O primeiro modelo experimental de *quorum sensing* a ser estudado foi o da bactéria de Gram-negativo bioluminescente *Vibrio fischeri* que sintetiza como moléculas de sinalização as N-acil-homoserina lactonas. As bactérias de Gram-negativo comunicam igualmente através de outras moléculas de sinalização nomeadamente, 2-alkil-4-quinolonas (AQs), cadeias longas de ácidos gordos e ésteres metílicos de ácidos gordos. As bactérias de Gram-positivo sintetizam auto-indutores peptídicos.

Nesta revisão bibliográfica estão descritos alguns mecanismos de *quorum sensing*, designadamente, o sistema LuxI/LuxR pela bactéria *Vibrio fischeri*, sistema de *quorum sensing* peptídico em *Staphylococcus aureus*, circuitos de *quorum sensing* paralelos por *Vibrio harveyi*, circuitos de *quorum sensing* competitivos por *Bacillus subtilis* e circuitos de *quorum sensing* organizados em série por *Pseudomonas aeruginosa*.

Serão igualmente abordadas novas terapêuticas antibacterianas que incluem a utilização de moléculas anti-*quorum sensing*.

Palavras-chave: bactérias; comunicação entre as bactérias; *quorum sensing*; *quorum quenching*.

Abstract

Bacteria are primitive unicellular microorganisms that inhabit ecological niches composed by multispecific communities and synthesize signal molecules that allow them to communicate between each other by quorum sensing.

The first studied model of *quorum sensing* was of the bioluminescent Gram-negative bacteria *Vibrio fischeri*, which synthesize *N*-Acyl homoserine lactone signal molecules. Gram-negative bacteria also communicate using other signal molecules, namely 2-alkyl-4-quinolones (AQs), long-chain fatty acids and fatty acid ethyl ester. Gram-positive bacteria, however, synthesize peptide autoinducers.

In this review several *quorum sensing* mechanisms are described, namely the LuxI/LuxR system by the bacteria *Vibrio fischeri*, peptide *quorum sensing* in *Staphylococcus aureus*, parallel *quorum sensing* circuits by *Vibrio harveyi*, competitive *quorum sensing* circuits by *Bacillus subtilis* and serial *quorum sensing* circuits by *Pseudomonas aeruginosa*.

Novel antibacterial therapeutics that include the use of anti-quorum sensing molecules will also be approached.

Keywords: bacteria; cross-talk in bacteria; *quorum sensing*; *quorum quenching*.

Agradecimentos

Depois de concluído este trabalho não posso deixar de agradecer a um conjunto de pessoas que sempre me acompanharam e apoiaram durante o meu percurso académico.

Agradeço à Universidade Fernando Pessoa por me ter proporcionado a minha formação académica.

Agradeço à Professora Doutora Anabela Castro, minha orientadora, por todos os conhecimentos transmitidos, pela atenção demonstrada, disponibilidade, motivação, incentivo, dedicação e simpatia que sempre teve ao longo de todo o trabalho.

O meu sincero e eterno obrigada.

Ao Gonçalo pela paciência, apoio e significado para mim.

À Natacha Oliveira pelo apoio, amizade, paciência e carinho que sempre demonstrou ao longo de todos os anos do nosso curso.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, ao meu irmão e à minha avó Maria Emília pelo carinho e compreensão que se tornaram imprescindíveis durante estes anos de Faculdade.

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
I. Introdução	1
II. A comunicação entre bactérias: <i>Quorum Sensing</i>	3
2.1. Classes de auto-indutores.....	6
2.2. <i>Quorum sensing</i> em bactérias de Gram-negativo.....	8
2.2.1. Sistema de <i>quorum sensing</i> LuxI/LuxR em <i>Vibrio fischeri</i>	8
2.3. <i>Quorum sensing</i> em bactérias de Gram-positivo.....	13
2.3.1. Sistema de quorum sensing peptídico em <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.4. Circuitos de <i>quorum sensing</i> paralelos.....	16
2.5. Circuitos de <i>quorum sensing</i> competitivos.....	18
2.6. Circuitos de <i>quorum sensing</i> organizados em série.....	21
2.7. Comunicação inter-espécies.....	22
III. Terapia antimicrobiana	27
IV. Perturbação nos sistemas de <i>quorum sensing</i>: <i>Quorum Quenching</i>	28
4.1. Sistemas de <i>quorum quenching</i> entre células procariontes.....	29
4.2. Sistemas de <i>quorum quenching</i> de eucarionte para procarionte.....	31
V. Conclusão	35
VI. Bibliografia	36

Índice de Figuras

Figura 1 - Influência da densidade celular no <i>quorum sensing</i>	4
Figura 2 - <i>Quorum sensing</i> e auto-indutores.....	6
Figura 3 - Moléculas de sinalização mais utilizadas em sistemas de QS.....	6
Figura 4 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em bactérias de Gram-negativo.....	7
Figura 5 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em bactérias de Gram-positivo.....	7
Figura 6 - Órgão luminescente de <i>Euprymna scolopes</i>	8
Figura 7 - Cultura bacteriana de <i>Vibrio fischeri</i>	8
Figura 8 - Sistema de <i>quorum sensing</i> na bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	11
Figura 9 - Estruturas de alguns AHLs com cadeias laterais diferentes.....	12
Figura 10 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 11 - Diferentes auto-indutores peptídicos de <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 12 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em <i>Vibrio harveyi</i>	16
Figura 13 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em <i>Bacillus subtilis</i>	19
Figura 14 - Sistema de <i>quorum sensing</i> em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figura 15 - Auto-indutor AI-2 de <i>Vibrio harveyi</i>	23
Figura 16 - Biossíntese da homoserina lactona e do auto-indutor AI-2.....	24
Figura 17 - Síntese de AI-2 em <i>Vibrio harveyi</i> e <i>Salmonella typhimurium</i>	24
Figura 18 - Furanonas que atuam como inibidores do sistema de <i>quorum sensing</i>	31
Figura 19 - Moléculas antagonistas dos recetores das bactérias de Gram-negativo.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Bactérias que apresentam genes *luxS*.....25

Tabela 2 - Funções reguladas pela molécula sinalizadora AI-2.....26, 27

I. Introdução

As bactérias são os microorganismos vivos mais antigos na Terra, são constituídas por uma única célula e possuem poucos genes e pouca informação genética para codificar todas as funções que levam a cabo. As bactérias sobrevivem consumindo nutrientes do meio ambiente, crescendo até ao dobro do tamanho e dividindo-se. De uma célula bacteriana formam-se duas células-filha e assim por diante (Murray *et al.*, 2012).

Os humanos possuem cerca de um bilião de células somáticas e aproximadamente 10 biliões de bactérias, ou seja, 10 vezes mais células bacterianas. As bactérias auxiliam na digestão de nutrientes e minerais, na síntese de vitaminas, e educam o sistema imunitário no combate a agentes infecciosos e na prevenção de múltiplas patologias. As bactérias apresentam comportamentos incríveis que nos auxiliam e são vitais para nós, nunca sendo reconhecidas por isso (Bassler, 2002; Alberts *et al.*, 2009).

Até ao final dos anos 60 as bactérias eram consideradas células individuais que apenas procuravam nutrientes e se multiplicavam (Antunes, 2003). Assumia-se que as bactérias e outros microorganismos unicelulares viviam de uma forma independente e que não possuíam comportamentos cooperativos. As bactérias foram sempre consideradas organismos reclusivos e sociais (Shapiro, 1988).

Na verdade, as bactérias têm comportamentos sociais que lhes permitem sincronizar o comportamento de todos os membros do grupo atuando como entidades multicelulares, aumentando as suas hipóteses de sobrevivência em ambientes complexos (Hooshangi & Bentley, 2008; Antunes, 2003; Bassler & Losick, 2006).

As bactérias vivem quase sempre em comunidades, denominadas biofilmes, que são constituídos por um aglomerado de células, aderentes a uma superfície biótica (por exemplo, tecidos da mucosa) ou abiótica (por exemplo, rochas) envolvidas numa matriz polisacarídica. As bactérias não são aleatoriamente distribuídas na matriz, estão presentes em micro colónias que permitem o transporte de nutrientes e metabolitos para dentro e para fora do biofilme. Os biofilmes formam na natureza comunidades multiespécie, com centenas ou milhares de outras bactérias e raramente são compostos

por uma única espécie bacteriana (Vendeville *et al.*, 2005; Jayaraman & Wood, 2008; Kokare *et al.*, 2009).

Populações bacterianas multiespécie podem desempenhar funções que são difíceis ou mesmo impossíveis para estirpes ou espécies individuais (Brenner *et al.*, 2008). O comportamento coletivo das células bacterianas pode ser vantajoso, como por exemplo, na migração para ambientes que possuam condições satisfatórias, com melhor oferta de nutrientes ou na adopção de novos modelos de crescimento, tais como a esporulação ou a formação de biofilmes que proporcionam proteção contra efeitos nocivos do ambiente (Rumjanek *et al.*, 2004).

Quando estes microorganismos primitivos se encontram em comunidade, distribuem diferentes tarefas e passam a exibir comportamentos de grupo. A forma como o fazem é falando umas com as outras através de uma linguagem química designada por *quorum sensing* (Bassler, 1999).

II. A comunicação entre bactérias: *Quorum Sensing*

Os processos de comunicação e sinalização celular são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos vivos unicelulares e multicelulares. Nos microrganismos a comunicação inter e intra-espécies é designada por *quorum sensing* e envolve a produção, deteção e resposta a pequenas moléculas de sinalização extracelulares designadas de auto-indutores (AIs) ou feromonas (Bassler, 1999; Rutherford & Bassler, 2012; Sifri, 2008).

Os AIs medeiam a comunicação célula-a-célula em bactérias, através da transferência de informação entre as células da mesma ou de diferentes espécies, géneros ou mesmo famílias, e conseqüentemente são consideradas “palavras” nesta “linguagem” bacteriana específica (Khmel & Metlitskaya, 2006).

A comunicação célula-a-célula através do sistema de QS e a indução de grupos de genes facilita a rápida adaptação de uma população bacteriana a alterações nas condições ambientais e garante a sua sobrevivência em ambientes naturais (Khmel & Metlitskaya, 2006).

As bactérias libertam para o meio ambiente vários tipos de moléculas de sinalização produzidas no interior da célula que vão mediar o sistema de QS. Estes comportamentos são ineficazes quando realizados individualmente por uma bactéria, mas tornam-se eficazes quando realizados simultaneamente por um grupo de células bacterianas (Bassler, 2002; Umesha & Shivakumar, 2013).

A expressão génica de uma comunidade bacteriana é controlada por sistemas de QS, responsáveis pela sincronização de uma determinada atividade, com efeitos benéficos para toda a comunidade bacteriana (Rutherford & Bassler, 2012).

O QS apresenta-se como um tipo específico de regulação da expressão génica que depende da densidade da população bacteriana (Khmel & Metlitskaya, 2006). A concentração de AIs no meio extracelular é diretamente proporcional ao número de bactérias pertencentes a essa população bacteriana. Quando é atingida a concentração

mínima estimulatória de AIs toda a população bacteriana vai alterar coletivamente a sua expressão génica (Rutherford & Bassler, 2012).

A densidade celular apresenta-se assim como um fator determinante na obtenção da emissão de um sinal que ultrapasse o limiar da sensibilidade necessário à ocorrência da resposta desejada. Estes sinais levam à ativação ou supressão de genes que conduzem a diferentes alterações na atividade metabólica, morfologia, mobilidade, agregação e associação com outras células da mesma espécie ou de espécies diferentes (Adak *et al.*, 2011).

A uma baixa densidade celular (**Figura 1A**), não é atingida a concentração mínima estimulatória de auto-indutores, mas à medida que aumenta a densidade celular a concentração de AIs aumenta (**Figura 1B**) atingindo a concentração necessária para que as bactérias ali presentes detetem essas moléculas e ativem ou reprimam genes específicos (Antunes, 2003).

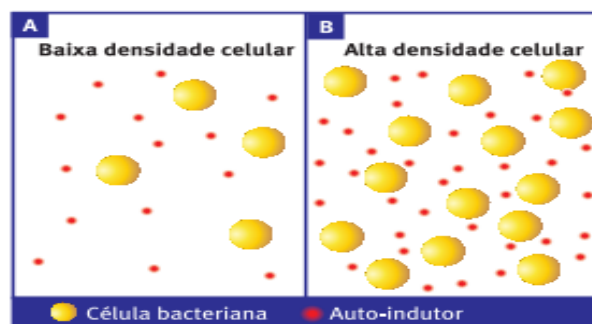


Figura 1 - Influência da densidade celular no *quorum sensing*: a baixa densidade celular, a concentração de auto-indutores é baixa (**A**) não sendo possível detetar as moléculas de sinalização. À medida que a densidade celular aumenta (**B**), as bactérias detetem a acumulação de uma concentração mínima estimulatória de auto-indutores e respondem coletivamente através da alteração da expressão génica (retirado de Antunes, 2003).

A acumulação extracelular da concentração mínima estimulatória de um auto-indutor só ocorre quando um número suficiente de células, um *quorum*, está presente. Através da utilização destes sistemas de sinal-resposta, as bactérias sincronizam em grande escala comportamentos específicos numa população, funcionando assim como organismos multicelulares (Waters & Bassler, 2005; Bassler, 2002).

Alguns dos processos controlados por sistemas de QS incluem a bioluminescência por *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*), a esporulação por *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), a competência por *Streptococcus pneumoniae*, a produção de antibióticos por *Streptomyces* spp., a formação de biofilme e a secreção de factores de virulência por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Novick & Geisinger, 2008; Ng & Bassler, 2009; Williams & Camara, 2009; Miller & Bassler, 2001).

Os sistemas de QS podem ser divididos em quatro etapas: (1) síntese de pequenas moléculas sinalizadoras pela célula bacteriana, (2) libertação de moléculas de sinalização, ativa ou passivamente para o meio circundante, (3) reconhecimento das moléculas de sinalização por recetores específicos e (4) alterações na regulação génica que ocorrem quando a exposição a auto-indutores é elevada (Sifri, 2008).

Apesar das diferenças na regulação dos comportamentos e dos respetivos mecanismos moleculares, todos os sistemas de QS conhecidos dependem de 3 mecanismos sequenciais.

Em primeiro lugar, os membros da comunidade bacteriana sintetizam as moléculas de sinalização (AIs). Em condições de baixa densidade celular (**Figura 2 - condição 1**), os AIs diluem-se e por conseguinte não atingem a concentração mínima estimulatória, o que inviabiliza a sua deteção. Quando a densidade celular é elevada (**Figura 2 - condição 2**), a concentração de AIs no local é elevada e cumulativa permitindo a sua deteção e o desenvolvimento de uma resposta coletiva sincronizada (Kaplan & Greenberg, 1985).

Em segundo lugar, os auto-indutores são detetados pelos respetivos recetores (**Figura 2 - proteína R**) existentes no citoplasma ou na membrana citoplasmática (Antunes, 2003).

Em terceiro lugar, além de ativar a expressão de genes necessários para comportamentos cooperativos, a deteção de AIs resulta na ativação da produção de mais AIs (Novick *et al.*, 1995; Seed *et al.*, 1995).

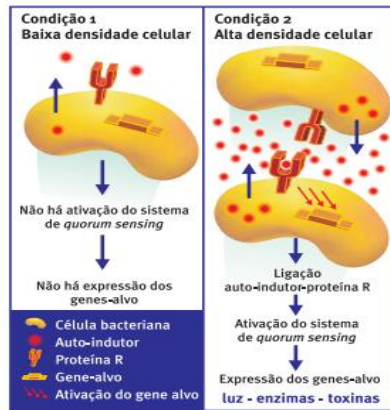


Figura 2 - *Quorum sensing* e auto-indutores. No *quorum sensing*, os auto-indutores, quando se encontram em concentração elevada, ligam-se a moléculas sensoras das bactérias que atuam como reguladores da expressão de genes específicos (retirado de Antunes, 2003).

2.1. Classes de auto-indutores

Existem diversas moléculas que podem exercer funções de sinalização. As moléculas de sinalização mais utilizadas pelas bactérias de Gram-negativo são as N-acil-homoserina-lactonas (AHLs) (**Figura 3a**), 2-alkil-4-quinolonas (AQs), cadeias longas de ácidos gordos e ésteres metílicos de ácidos gordos. As bactérias de Gram-positivo utilizam péptidos lineares, modificados ou cíclicos como moléculas de sinalização, designadas por auto-indutores peptídicos (**Figura 3c**). Existe um terceiro auto-indutor do sistema de QS, designado por AI-2 (**Figura 3b**) que pode ser encontrado tanto em bactérias de Gram-negativo como em bactérias de Gram-positivo pertencendo a um grupo de furanonas interconvertíveis derivadas da dihidroxipentanodiona (DPD) (Umesha & Shivakumar, 2013; Adak *et al.*, 2011).

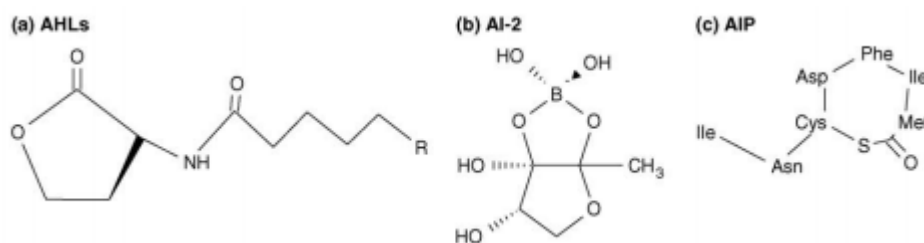


Figura 3 - Moléculas de sinalização mais utilizadas em sistemas de QS. (a) Acil-homoserina-lactonas produzidas por bactérias de Gram-negativo, consistem num anel homoserina-lactona e cadeias laterais acilo variadas (C4 a C18). “R” indica a presença de grupos adicionais de carbono; (b) AI-2, auto-indutor presente em bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo; (c) auto-indutor peptídico utilizado por bactérias de Gram-positivo (retirado de Decho *et al.*, 2009).

O QS pode ser dividido em duas classes paradigmáticas: a primeira classe, refere-se a sistemas de QS do tipo LuxI/LuxR nas bactérias de Gram-negativo (**Figura 4a e b**), que utiliza as N-acil-homoserina-lactonas (AHL) como moléculas de sinalização, também designadas de auto-indutores-1 (AI-1). O AHL consiste num anel de homoserina lactona e numa cadeia lateral acilo (Khmel & Metlitskaya, 2006). A segunda classe reporta-se a circuitos de QS que utilizam auto-indutores peptídicos como moléculas de sinalização das bactérias de Gram-positivo (**Figura 5a e b**) (Federle & Bassler, 2003; Li & Tian, 2012).

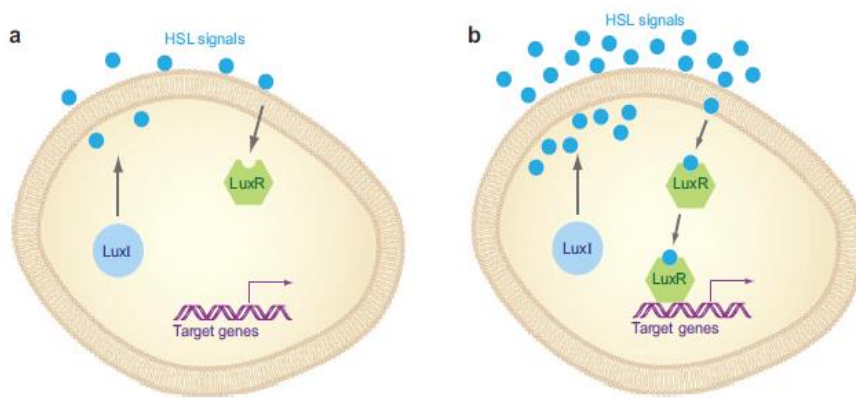


Figura 4 - Sistema de *quorum sensing* em bactérias de Gram-negativo: moléculas de sinalização homoserina-lactonas (HSL) (retirado de Jayaraman & Wood, 2008).

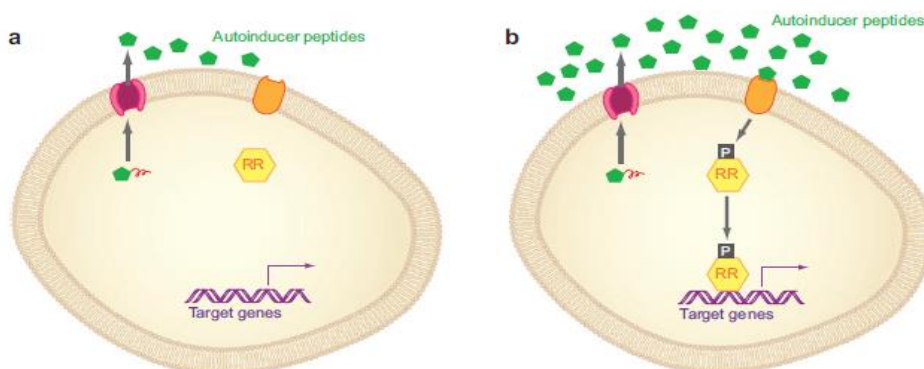


Figura 5 – Sistema de *quorum sensing* em bactérias de Gram-positivo: auto-indutores peptídicos (retirado de Jayaraman & Wood, 2008)

2.2. *Quorum sensing* em bactérias de Gram-negativo

2.2.1. Sistema de *quorum sensing* LuxI/LuxR em *Vibrio fischeri*

O primeiro sistema descrito de comunicação intercelular em bactérias, designado por QS, foi o da bactéria marinha bioluminescente *V. fischeri* (**Figura 6**) e é considerado um paradigma de QS para a maioria das bactérias de Gram-negativo (Nealson & Hastings, 1979), apresentando como exceção as bactérias *Vibrio harveyi* e *Myxococcus xanthus* que utilizam circuitos de *quorum sensing* distintos (Miller & Bassler, 2001).

Durante anos, pensava-se que este fenómeno era limitado a alguns microorganismos marinhos, mas após a descoberta do sistema de *quorum sensing* em *V. fischeri* já foram identificadas mais de 100 espécies que apresentam este mecanismo de comunicação celular como parte da sua maquinaria regulatória (Hirakawa & Tomita, 2013; Umesha & Shivakumar, 2013).

A bactéria *V. fischeri* (**Figura 7**) coloniza o órgão luminescente da lula *Euprymna scolopes* (**Figura 5**), que habita as águas pouco profundas do Havai (Antunes, 2003; Lupp *et al.*, 2003; Waters & Bassler, 2005).



Figura 6 - Órgão luminescente de *Euprymna scolopes*.

Disponível em <<http://supercoolscience.files.wordpress.com/2012/04/hawaiian-bobtail-squid1.png>>

[Consultado em 21.07.2013].

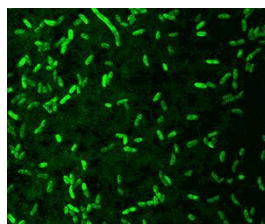


Figura 7 – Cultura bacteriana de *Vibrio fischeri* (retirado de Antunes, 2003).

Neste órgão as bactérias multiplicam-se até atingirem uma densidade superior a 10^{11} células/ml (Khmel & Metlitskaya, 2006; Mitchell *et al.*, 2011; Miller & Bassler, 2001) e induzirem a expressão de genes responsáveis pela bioluminescência. A lula utiliza a bioluminescência das bactérias para deteção de presas e simultaneamente para mascarar a sua sombra diante do luar evitando assim o ataque de predadores (Miller & Bassler, 2001). As bactérias beneficiam desta simbiose, uma vez que dentro do órgão emissor de luz rico em nutrientes se encontram todas as condições necessárias, que lhes permitem atingir níveis de proliferação elevados, incapazes de ocorrer na água marinha (Visick *et al.*, 2000; Asad & Opal, 2008).

Dispersa no mar, a bactéria *V. fischeri* não atinge elevada densidade celular e consequentemente não produz bioluminescência. Quando estas bactérias se encontram dispersas no mar e encontram matéria orgânica em decomposição, aderem à sua superfície e multiplicam-se alcançando uma alta densidade celular indutora de bioluminescência. Esta estratégia tem como objetivo atrair para o local peixes ou outros animais que ao ingerirem o material bioluminescente em decomposição vão servir de hospedeiro para a bactéria *V. fischeri*, iniciando assim um novo ciclo (Antunes, 2003).

O peixe *Monocentris japonicum* utiliza a bioluminescência produzida pela *V. fischeri* para atrair o parceiro. Neste caso existem duas regiões luminosas neste peixe, que são aparentemente atraentes para o peixe do sexo oposto (Miller & Bassler, 2001).

O mecanismo de sinal-resposta da bactéria *V. fischeri* descrito por Engebrecht e Silverman (Engebrecht *et al.*, 1983; Engebrecht & Silverman, 1984) foi demonstrado em mais de 30 espécies de bactérias de Gram-negativo para o controlo das funções dependentes da densidade celular (Fuqua *et al.*, 1994; Swift *et al.*, 1999).

Os circuitos de QS em bactérias de Gram-negativo são mediados por um sistema regulatório que é análogo ao sistema de QS em *V. fischeri* (Jayaraman & Wood, 2008). Os sistemas de QS de bactérias de Gram-negativo contêm no mínimo homólogos das duas proteínas reguladoras de *V. fischeri*, designadas LuxI e LuxR (Miller & Bassler, 2001). As proteínas do tipo LuxI são as enzimas responsáveis pela biossíntese da

molécula sinalizadora específica acil-homoserina-lactona (AHL), N- (3-oxo-hexanoil)-homoserina-lactona (3OC6-HSL), com função de auto-indutor (Lupp & Ruby, 2005).

A biossíntese da molécula de sinalização AHL envolve a proteína S-adenosilmetionina (SAM), que é necessária para a formação do anel de homoserina-lactona, e a proteína ACP, cuja função é ser transportadora do grupo acilo (Khmel & Metlitskaya, 2006).

Diferentes estirpes de bactérias de Gram-negativo produzem diferentes AHLs que ativam o respetivo circuito de QS (Jayaraman & Wood, 2008). A especificidade do auto-indutor AHL depende do número de grupos acilo e da presença de certos grupos adicionais específicos. AHLs com cadeias laterais acilo pequenas difundem livremente através das membranas celulares, enquanto AHLs com cadeias laterais de acilo longas, utilizam um efluxo ativo para atravessar a membrana (Khmel & Metlitskaya, 2006).

As moléculas de AHL variam no comprimento da cadeia N-acil (de 4 a 18 átomos de carbono), no grau de saturação e no número de substituintes de oxigénio. A forma L-isomérica do anel da homoserina-lactona é comum a todos os AHLs (Asad & Opal, 2008). Estas moléculas de sinalização passam livremente através das membranas celulares e por isso a concentração do auto-indutor tem um incremento diretamente proporcional ao aumento da densidade celular na população bacteriana (Miller & Bassler, 2001; Sifri, 2008).

Devido ao pequeno tamanho e ao carácter lipofílico dos auto-indutores, estes difundem-se livremente no citoplasma e atravessam passivamente as membranas celulares, acumulando-se tanto intra como extracelularmente na proporção da respetiva densidade celular (Bassler, 2002).

A baixa densidade celular da bactéria *V. fischeri* corresponde uma baixa concentração de moléculas de sinalização (Jayaraman & Wood, 2008). Quando os auto-indutores atingem uma concentração extracelular mínima estimulatória, atravessam a membrana celular e ligam-se ao receptor citoplasmático do auto-indutor LuxR, formando um complexo LuxR-AHL que induz a transcrição do operão luciferase (*luxICDABE*)

responsável pelo fenómeno de bioluminescência (Waters & Bassler, 2005; Bassler, 1999; Sifri, 2008).

O complexo LuxR-AHL regula igualmente o gene *luxI*, levando ao aumento da síntese da proteína LuxI e conseqüentemente a um rápido incremento da bioluminescência. Contudo, a produção de sinal (isto é, da expressão de *luxI*) não aumenta continuamente. O feedback positivo, ou seja, a amplificação da emissão de bioluminescência é equilibrado por um feedback negativo que leva à diminuição da concentração da proteína recetora intracelular LuxR, da síntese da proteína LuxI e conseqüentemente à diminuição da expressão dos genes da luciferase (Jayaraman & Wood, 2008).

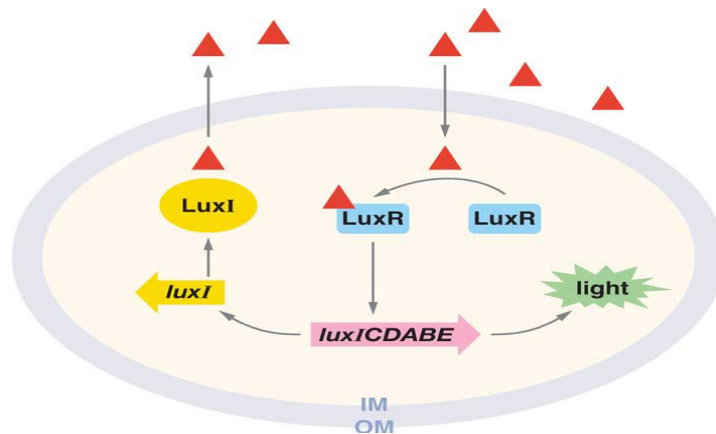


Figura 8 - Sistema de *quorum sensing* na bactéria *Vibrio fischeri* (retirado de Waters & Bassler, 2005).

Estes sistemas de regulação são usados predominantemente para comunicação bacteriana intra-espécie dado que existe uma enorme especificidade entre o recetor das proteínas LuxR e as moléculas de sinalização AHL. Cada uma das espécies de bactérias de Gram-negativo produz um único AHL ou uma combinação única de AHLs (se possuir mais do que uma proteína do tipo LuxI). Como consequência, apenas os membros da mesma espécie reconhecem as respectivas moléculas de sinalização respondendo assim seletivamente (Federle & Bassler, 2003).

Cada proteína do tipo LuxI sintetiza a molécula de sinalização com grande fidelidade. No entanto existem algumas proteínas do tipo LuxI que produzem diferentes moléculas de sinalização (AHLs), embora se desconheça se estas apresentam um papel biológico activo (Marketon *et al.*, 2002).

Encontram-se descritas cerca de 50 espécies de bactérias de Gram-negativo que produzem os auto-indutores AHLs que diferem quimicamente na porção acilo da cadeia lateral (**Figura 9**) (Bassler, 2002).

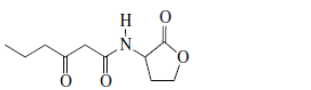
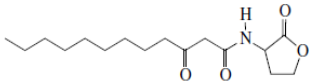
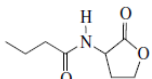
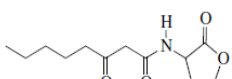
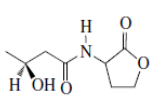
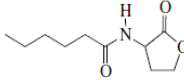
Bacterium/gene responsible for AHL synthesis/AHL	AHL structure
<i>Vibrio fischeri</i> /luxI/N-3-oxohexanoyl homoserine lactone	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> /lasI/N-3-oxododecanoyl homoserine lactone	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> /rhlI/N-butanoyl homoserine lactone	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> /traI/N-3-oxooctanoyl homoserine lactone	
<i>Vibrio harveyi</i> /luxM/N-3-hydroxybutanoyl homoserine lactone	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> /phzI/N-hexanoyl homoserine lactone	

Figura 9 - Estruturas de alguns AHLs com cadeias laterais diferentes (retirado de Khmel & Metlitskaya, 2006).

A estrutura das proteínas LuxR sugere que estas apresentam especificidade através dos seus locais de ligação a grupos acil que permitem que o receptor LuxR apenas se ligue e seja ativado por uma molécula sinalizadora específica (Vannini *et al.*, 2002).

Em ambientes onde se encontrem diferentes espécies bacterianas e consequentemente diversas moléculas de sinalização AHL, cada espécie pode distinguir, quantificar e responder apenas às suas moléculas sinalizadoras específicas. É importante referir que as bactérias nem sempre dependem de um sistema exclusivo de QS LuxIR. Utilizam mais do que um destes sistemas LuxIR em simultâneo e em conjunto com outros tipos de circuitos de QS (Waters & Bassler, 2005).

2.3. *Quorum sensing* em bactérias de Gram-positivo

As bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo utilizam diferentes tipos de sistemas de QS. As bactérias de Gram-positivo não utilizam AHLs como moléculas de sinalização, nem utilizam o complexo de sinalização LuxI/LuxR. As moléculas de sinalização neste tipo de bactérias são péptidos modificados designados de auto-indutores peptídicos (AIPs) (Umesha & Shivakumar, 2013; Antunes *et al.*, 2010).

Ao contrário dos auto-indutores presentes nas bactérias de Gram-negativo, os auto-indutores peptídicos não se difundem livremente dentro e fora da célula. Estes são sintetizados por precursores peptídicos, posteriormente modificados e exportados das células usando uma proteína transportadora com consequente gasto de adenosina trifosfato (Jayaraman & Wood, 2008).

Estes auto-indutores uma vez exportados difundem-se e vão interagir com as bactérias vizinhas através da sua ligação ao domínio externo das proteínas membranares que funcionam como sensores (Bassler, 2002).

Os auto-indutores peptídicos derivam da clivagem de longos precursores peptídicos. Alguns sinais peptídicos contêm modificações nas cadeias laterais, incluindo lactonas ou anéis de tio-lactonas e ainda outras porções hidrofóbicas indefinidas (Bassler, 2002).

Cada espécie bacteriana de Gram-positivo utiliza um sinal específico assim como recetores que são extremamente sensíveis às moléculas de sinalização, através de um mecanismo idêntico ao utilizado nas bactérias de Gram-negativo. Assim, tal como nos sistemas de LuxIR, os circuitos peptídicos de QS asseguram a comunicação intra-espécie (Waters & Bassler, 2005).

Tal como as bactérias de Gram-negativo, as bactérias de Gram-positivo podem utilizar múltiplos auto-indutores e sensores (Waters & Bassler, 2005).

2.3.1. Sistema de *quorum sensing* peptídico em *Staphylococcus aureus*

A bactéria *S. aureus* é uma das principais causas de infecções hospitalares em todo o mundo. É o agente etiológico de uma vasta gama de doenças, desde infecções relativamente benignas da pele até doenças sistêmicas potencialmente fatais. Múltiplas patologias, incluindo endocardite e osteomielite estão associadas a biofilmes de *S. aureus*. Os biofilmes têm uma relevância especial na clínica, uma vez que as bactérias associadas aos biofilmes apresentam resistência contra desinfetantes e antibióticos (Yarwood *et al.*, 2004).

A bactéria *S. aureus* apresenta-se como um exemplo fascinante de QS peptídico, pois utiliza uma estratégia bifásica para causar patogenicidade: a baixa densidade celular a bactéria expressa fatores proteicos que promovem a adesão e a colonização, enquanto que em condições de elevada densidade celular, a bactéria reprime esses traços e inicia a secreção de toxinas e proteases que são necessárias para a sua disseminação (Lyon & Novick, 2004).

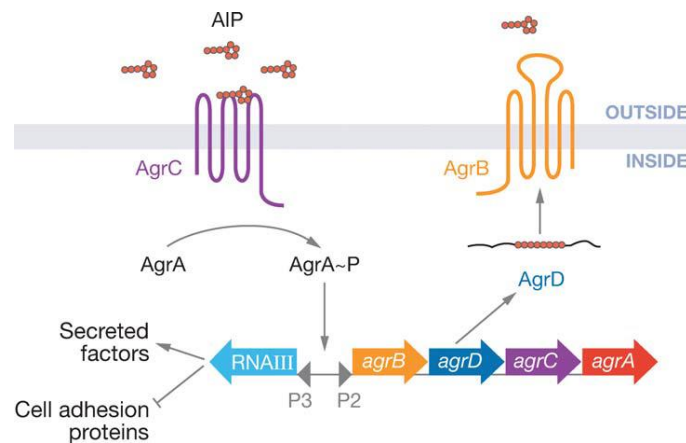


Figura 10 - Sistema de *quorum sensing* em *Staphylococcus aureus*. O *S. aureus* apresenta um sistema regulador de resposta constituído por dois componentes, onde deteta e responde a um péptido extracelular (AIP). Os pequenos círculos vermelhos indicam o AIP. P2 e P3 são os promotores para *agrBDCA* e RNAlIII, respetivamente (retirado de Waters & Bassler, 2005).

O sistema consiste num auto-indutor peptídico de *S. aureus* (**Figura 10**) que é codificado pelo gene *agrD*. Dado que os sinais peptídicos não se difundem passivamente pela membrana, a libertação da molécula de sinalização é mediada por

uma proteína transportadora, AgrB, que exporta e adiciona um anel tio-lactona modificando os AIPs do *S.aureus* (Novick *et al.*, 1995; Saenz *et al.*, 2000).

O reconhecimento do AIP é constituído por um sistema que engloba dois componentes (**Figura 10** – AgrC e AgrA). O AIP liga-se a uma cinase sensora membranar (AgrC) induzindo a sua auto-fosforilação num resíduo de histidina. A proteína membranar AgrC fosforilada reconhece então o segundo componente do processo de reconhecimento do AIP, uma proteína reguladora de resposta específica (AgrA). A informação é transmitida através da fosforilação da proteína citoplasmática reguladora (AgrA). A proteína AgrA fosforilada vai induzir a expressão de um RNA regulador designado RNAIII, que vai ser responsável pela repressão da expressão de fatores de adesão induzindo simultaneamente a expressão de fatores de secreção, tais como toxinas e proteases. A proteína AgrA activada vai também induzir a expressão génica do operão *agrBDCA*. Este processo vai dar origem a um aumento dos níveis de AIP, o que vai assegurar que toda a população bacteriana transite de uma baixa densidade celular para uma elevada densidade celular (Novick *et al.*, 1995; Jayaraman & Wood, 2008).

As estirpes de *S. aureus* podem ser categorizadas em quatro grupos diferentes baseados na especificidade dos seus AIPs (**Figura 11**) (Miller & Bassler, 2001). As estirpes são classificadas de acordo com o anel tio-lactona do auto-indutor (Dufour *et al.*, 2002).

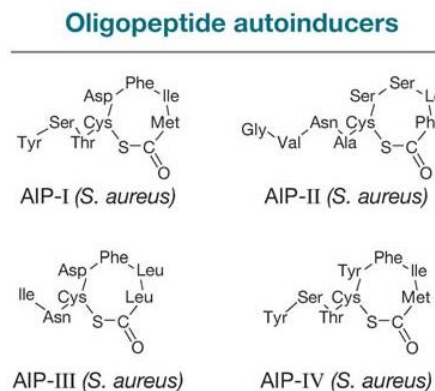


Figura 11 – Diferentes auto-indutores peptídicos de *Staphylococcus aureus* (retirado do artigo Waters & Bassler, 2005).

A interacção entre o AIP e o recetor AgrC é altamente específica, de tal modo que para um determinado sinal peptídico apenas serão ativados recetores específicos do respetivo grupo de *S.aureus* (Waters & Bassler, 2005).

Segundo Ji *et al.* (1997), diferentes estirpes de *S. aureus* produzem diferentes péptidos e os péptidos de uma determinada estirpe inibem a expressão génica de outras estirpes.

A co-infecção com dois grupos diferentes de *S. aureus* resulta numa competição intra-espécie; o grupo que estabelecer primeiro a sua cascata de QS põe o outro grupo fora dessa competição (Sifri, 2008; Waters & Bassler, 2005).

2.4. Circuitos de *quorum sensing* paralelos

A primeira observação de que as bactérias podem comunicar com múltiplos sinais de QS foi identificada no sistema de QS da bactéria marinha, bioluminescente, de Gram-negativo *Vibrio harveyi* (Federle & Bassler, 2003).

O sistema de QS em *Vibrio harveyi* (**Figura 12**) envolve três auto-indutores e três recetores (Jayaraman & Wood, 2008) que funcionam em paralelo. Os recetores são proteínas transmembranares localizados na membrana interna que detetam o auto-indutor. Este atravessa por difusão a membrana externa alcançando o periplasma onde se liga ao recetor da proteína transmembranar, induzindo uma cascata de fosforilação, similar ao mecanismo utilizado pelas bactérias de Gram-positivo (Waters & Bassler, 2005).

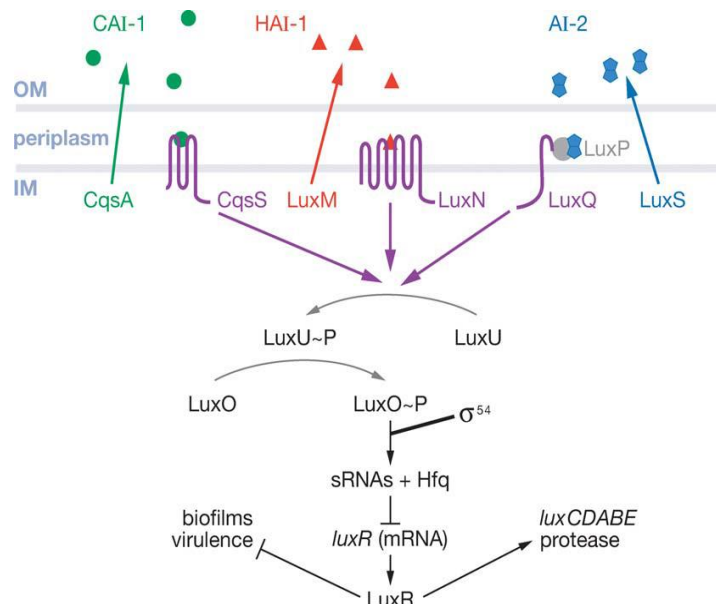


Figura 12 – Sistema de *quorum sensing* em *Vibrio harveyi*. *V. harveyi* sintetiza e responde a três auto-indutores distintos: CAI-1, HAI-1 e AI-2 (retirado de Waters & Bassler, 2005).

A bactéria *Vibrio harveyi* produz uma molécula sinalizadora AHL designada HAI-1 (3OHC4- homoserina-lactona) que é sintetizada pela proteína LuxM (Cao & Meighen, 1989). Apesar de não apresentar homologia com as proteínas do tipo LuxI, esta proteína catalisa reações bioquímicas idênticas para sintetizar um AHL específico (Bassler *et al.*, 1993; Hanzelka *et al.*, 1999). O auto-indutor HAI-1 liga-se a uma cinase sensora membranaar que contem histidina (LuxN), por um mecanismo idêntico ao que ocorre nos circuitos de QS nas bactérias de Gram-positivo (Bassler *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 2000).

A segunda molécula de sinalização em *Vibrio harveyi* é uma furanosil borato diéster, designada por AI-2 (**Figura 3b**) (Chen *et al.*, 2002) e sintetizada pela proteína intracelular LuxS (Xavier & Bassler, 2003). O auto-indutor AI-2 liga-se à proteína LuxP no periplasma formando o complexo LuxP-AI-2 que interage com uma segunda cinase sensora membranaar que contem histidina, LuxQ (Bassler *et al.*, 1994a).

A terceira molécula de sinalização é designada por CAI-1 ((S)- 3-hidroxitridecano-4-ona) e é sintetizada pela enzima citoplasmática CqsA. Mais uma vez este sinal interage com uma terceira cinase sensora membranaar que contem histidina, CqsS. O auto-indutor CAI-1 é responsável pela regulação de *quorum sensing* nos processos de bioluminescência e formação de biofilmes (Henke & Bassler, 2004b; Jayaraman e Wood, 2008).

A baixa densidade celular, na ausência de concentrações detetáveis de auto-indutores, os três sensores – LuxN, LuxQ e CqsA – agem como cinases, autofosforilam-se e subsequentemente transferem o fosfato para a proteína citoplasmática LuxU. Esta proteína transfere o fosfato para a proteína reguladora de resposta LuxO (Bassler *et al.*, 1994b; Freeman & Bassler 1999a,b; Freeman *et al.*, 2000).

A proteína LuxO- fosfatada, em conjugação com o fator de transcrição denominado σ^{54} , ativa a transcrição dos genes que codificam 5 pequenos RNAs (sRNAs, do inglês small RNAs) reguladores denominados Qrr1-5 (Qrr - Quorum Regulatory RNA) (Lilley & Bassler 2000; Lenz *et al.*, 2004).

Os diferentes sRNAs interagem com a proteína de apoio de RNA, Hfq, que é um membro da família Sm das proteínas de apoio de RNA eucarióticas envolvidas no splicing do mRNA (Carrington & Ambros, 2003).

Os sRNAs juntamente com a proteína Hfq ligam-se e destabilizam o mRNA que codifica o ativador transcripcional designado LuxR (Lenz *et al.*, 2004).

LuxR é necessário para ativar a transcrição do operão luciferase. Assim, a baixa densidade celular, devido ao complexo *luxR* mRNA ser degradado, a bactéria não vai expressar bioluminescência (Waters & Bassler, 2005).

A elevada densidade celular leva à acumulação de auto-indutores atingindo-se assim a concentração mínima estimulatória necessária para a sua deteção. As três cinases sensoras convertem-se em fosfatases adquirindo o fosfato da LuxO via LuxU.

A proteína LuxO desfosforilada é incapaz de induzir a expressão de sRNAs. Isto permite a translação de *luxR* mRNA, produção de LuxR e expressão da bioluminescência. Esta via controla múltiplos genes incluindo os que codificam a luciferase (Henke & Bassler, 2004a; Mok *et al.*, 2003).

2.5. Circuitos de *quorum sensing* competitivos

O *B. subtilis* é um microorganismo do solo, que utiliza um elaborado sistema peptídico de *quorum sensing* para induzir o desenvolvimento do estado de competência ou do processo de esporulação (**Figura 13**) (Miller & Bassler, 2001).

A bactéria do solo *B. subtilis* pode formar endósporos, metabolicamente inativos, que se encontram num estado de dormência e que são muito resistentes ao calor, dessecação, radiação ou agressão química em resposta à privação de nutrientes (Wang *et al.*, 1997).

A esporulação em *Bacillus* spp. é induzida pela privação de nutrientes, mas o processo de desenvolvimento da esporulação não se inicia imediatamente após a desaceleração do crescimento bacteriano. Podem ocorrer várias respostas alternativas, incluindo a ativação da motilidade flagelar para procurar novas fontes de alimento por quimiotaxia, a produção de antibióticos para destruir microorganismos competitivos do solo, a

secreção de enzimas hidrolíticas para eliminar as proteínas e polissacarídeos extracelulares ou a indução de competência, para captar DNA exógeno. A esporulação é o último recurso da célula bacteriana à privação de nutrientes e este processo é suprimido até as respostas alternativas se revelarem inadequadas (Grossman & Losick, 1997).

A competência, também designada de competência natural, é um fenómeno comum às bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo. Entre os sistemas mais bem estudados destacam-se os de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Bacillus subtilis*. As bactérias competentes são capazes de se ligar de forma eficiente, processar e internalizar DNA exógeno de alto peso molecular (Dubnau, 1991).

O circuito competitivo de *B. subtilis* apresenta dois auto-indutores peptídicos (ComX e CSF (factor de competência e esporulação)) que funcionam em rede com a finalidade de determinar um de dois estilos de vida mutuamente exclusivos: competência ou esporulação (Miller & Bassler, 2001).

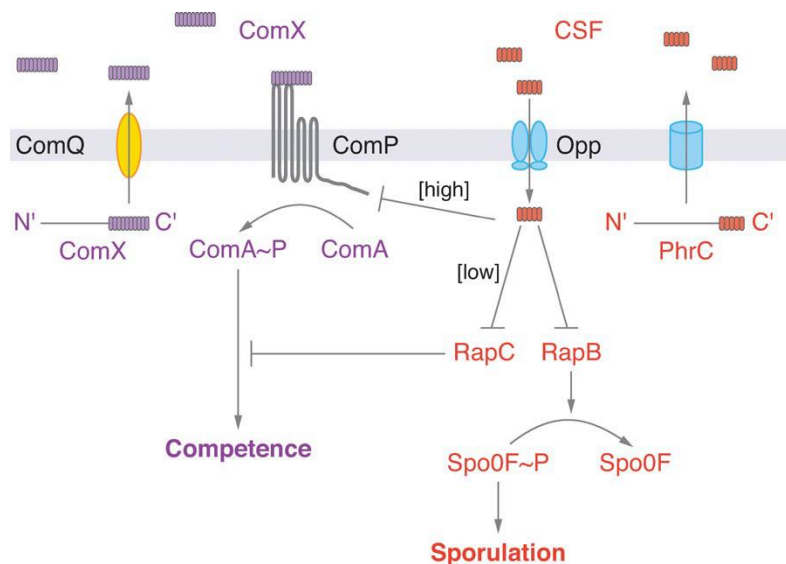


Figura 13 – Sistema de *quorum sensing* em *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* sintetiza dois auto-indutores peptídicos que regulam dois caminhos distintos de indução de resposta: competência ou esporulação (retirado de Waters & Bassler, 2005).

Ambos os péptidos são sintetizados no citosol e acumulam-se à medida que a densidade celular aumenta (Miller & Bassler, 2001).

O péptido ComX é constituído por 10 aminoácidos (Magnuson *et al.*, 1994; Solomon *et al.*, 1996) e contem uma modificação hidrofóbica num resíduo de triptofano que é necessário para a sua atividade de sinalização. Este péptido deriva de um péptido precursor, constituído por 55 aminoácidos que é codificado pelo gene *comX* (Miller & Bassler, 2001). Para o seu processamento e síntese este péptido necessita de uma proteína membranar designada ComQ. Este péptido é detetado por uma cinase sensora membranar que contem histidina e é designada ComP (Waters & Bassler, 2005).

A ligação do auto-indutor extracelular ComX ao recetor da cinase sensora transmembranar ComP, estimula a autofosforilação desta, que transfere o grupo fosfato ao regulador de resposta ComA (Solomon *et al.*, 1995). A fosforilação da proteína ComA regula a transcrição de vários genes que codificam fatores essenciais para o desenvolvimento do fenómeno de competência (Nakano & Zuber, 1991).

Um segundo auto-indutor oligopeptídico, CSF, é codificado pelo gene *phrC* e apresenta-se como um factor de competência e esporulação em *B. subtilis*. O auto-indutor é transportado do citoplasma para o meio extracelular através de um canal proteico e é reinternalizado através do péptido transportador Opp, actuando no citoplasma (Lazazzera *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1996).

A baixa concentração o auto-indutor CSF liga-se a uma proteína designada RapC rompendo a ligação de RapC com ComA (Perego, 1997; Solomon *et al.*, 1996). A fosfatase RapC é específica de ComA. A inibição de RapC por CSF causa um aumento dos níveis de ComA-fosfatada. Níveis baixos de CSF promovem o desenvolvimento de competência (Miller & Bassler, 2001).

Contudo, a concentração elevada de CSF internalizado, inibe a cascata de sinalização ComP-ComA por um mecanismo desconhecido, diminuindo o desenvolvimento de competência e favorecendo a esporulação (Lazazzera *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1996).

O mecanismo pelo qual CSF estimula a esporulação é análogo ao mecanismo pelo qual CSF estimula a competência. Neste caso CSF liga-se e inibe uma fosfatase designada RapB. RapB desfosforila o regulador de resposta Spo0F que está envolvido no desenvolvimento da esporulação. A inibição da atividade da fosfatase RapB aumenta os níveis de Spo0F fosfatado, favorecendo assim o desenvolvimento de esporulação (Miller & Bassler, 2001).

2.6. Circuitos de *quorum sensing* organizados em série

O circuito de *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é sensível a múltiplos auto-indutores, e utiliza circuitos de QS organizados em série (**Figura 14**).

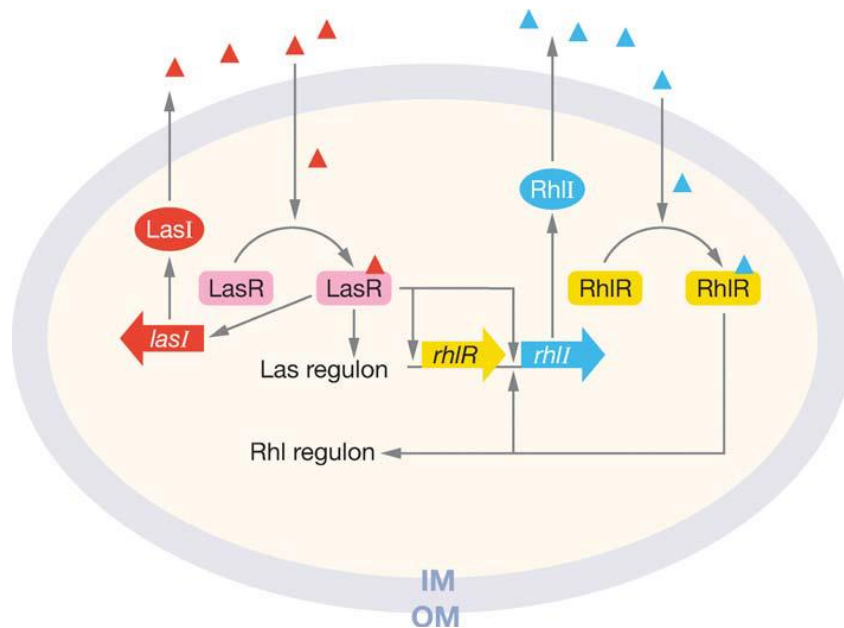


Figura 14 – Sistema de *quorum sensing* em *Pseudomonas aeruginosa*. Os circuitos de QS em *P. aeruginosa* operam em série para controlar um grande conjunto de genes alvo (retirado de Waters & Bassler, 2005).

P. aeruginosa é uma bactéria de Gram-negativo, geralmente encontrada no trato intestinal, água e solo, e apresenta-se como um agente patogénico oportunista associado a infeções nosocomiais e a infeções em pacientes imunocomprometidos. Este microorganismo é também conhecido por causar infeções respiratórias crónicas, em

pacientes portadores de fibrose cística (Eberl & Tummler, 2004; Hirakawa & Tomita, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Nas infeções crónicas causadas por *P. aeruginosa*, o mecanismo de QS assume um papel determinante uma vez que este sistema controla o processo de adesão, a formação de biofilme e a expressão de fatores de virulência (Smith & Iglewski, 2003a).

O sistema de QS em *P. aeruginosa* engloba dois auto-indutores AHL, nomeadamente N-(3-oxododecanoil)-HSL (3OC12-HSL) e N-butiril-HSL (C4-HSL), produzidos pelas enzimas LasI e RhII, respetivamente. Estes auto-indutores acumulam-se tanto intra como extracelularmente durante o crescimento celular. Após atingirem a concentração mínima estimulatória, as moléculas de sinalização ligam-se aos respetivos recetores citosólicos, LasR e RhIR, para ativarem a expressão dos genes alvo (Juhas *et al.*, 2005; Schuster & Greenberg, 2006; Smith & Iglewski, 2003b).

Os dois sistemas de QS estão dispostos hierarquicamente uma vez que o sistema LasR-LasI controla o sistema RhIR-RhII (Pesci *et al.*, 1997).

Conjuntamente estes dois sistemas controlam a expressão de centenas de genes (Hentzer *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Foram identificados mais de 30 genes que codificam fatores de virulência, tais como enzimas extracelulares (protease LasA, elastase, protease alcalina, lipase, fosfolipase C), metabolitos secundários (cianeto de hidrogénio e piocianina), e toxinas (exotoxina A). Propõe-se que estes fatores de virulência contribuam nas infeções crónicas e agudas de *P.aeruginosa* em indivíduos imunocomprometidos e portadores de fibrose cística (Sandoz *et al.*, 2007).

2.7. Comunicação inter-espécies

O *quorum sensing* é utilizado com elevada especificidade e controlo apertado para regular múltiplos fenótipos bacterianos. As bactérias estão predominantemente presentes em comunidades multiespécie (por exemplo, a cavidade oral apresenta biofilmes com cerca de 400 espécies bacterianas (Kolenbrander, 2000)) sendo o nível de especificidade e de controlo fascinante dado à complexidade associada às comunidades microbianas. Cada uma das espécies bacterianas pode sintetizar várias moléculas de

sinalização e os circuitos de resposta utilizados por estas moléculas de sinalização estão também interligados (Waters & Bassler, 2005).

O sistema de *quorum sensing* permite a comunicação bacteriana intra e interespecie. O auto-indutor AI-2 é uma molécula de sinalização não específica de uma espécie que medeia a comunicação interespecie entre bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo. A actividade do auto-indutor AI-2 já foi demonstrada em mais de 100 espécies de bactérias. Este tipo de comunicação é designada de linguagem universal para a comunicação entre espécies bacterianas (Federle & Bassler, 2003; Li & Tian, 2012; Hirakawa & Tomita, 2013).

A primeira molécula de sinalização AI-2 a ser identificada pertence à bactéria de Gram-negativo *V. harveyi* (Figura 15).

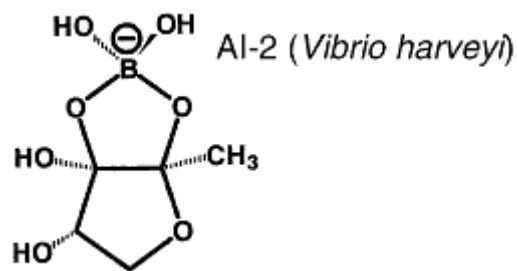


Figura 15 - Auto-indutor AI-2 de *V. harveyi*. Este tipo de auto-indutor está presente em bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo (retirado Federle & Bassler, 2003).

A molécula de sinalização AI-2 participa no sistema de *quorum sensing* da bactéria marinha bioluminescente *Vibrio harveyi*. Muitas das bactérias que sintetizam AI-2 também sintetizam e respondem a um auto-indutor AHL ou AIP, indicando que para além de distinguirem as diferentes espécies bacterianas, contêm um mecanismo que lhes permite quantificar as bactérias existentes da mesma espécie (Federle & Bassler, 2003).

O auto-indutor AI-2, tal como os AHLs, é sintetizado a partir de S-adenosilmetionina (SAM) em três etapas enzimáticas. SAM é um cofactor essencial para os processos de síntese de DNA, RNA e de proteínas. A utilização de SAM como doador de metilo tanto neste processo como em outros processos metabólicos, leva à formação de um intermediário tóxico denominado S-adenosilhomocisteína (SAH), que é hidrolisado para formar S-ribosilhomocisteína (SRH) e adenina pela enzima nucleosidase Pfs (5'

metiltioadenosina/ S- adenosilhomocisteína nucleosidase) (Khmel & Metlitskaya, 2006; Xavier & Bassler, 2003).

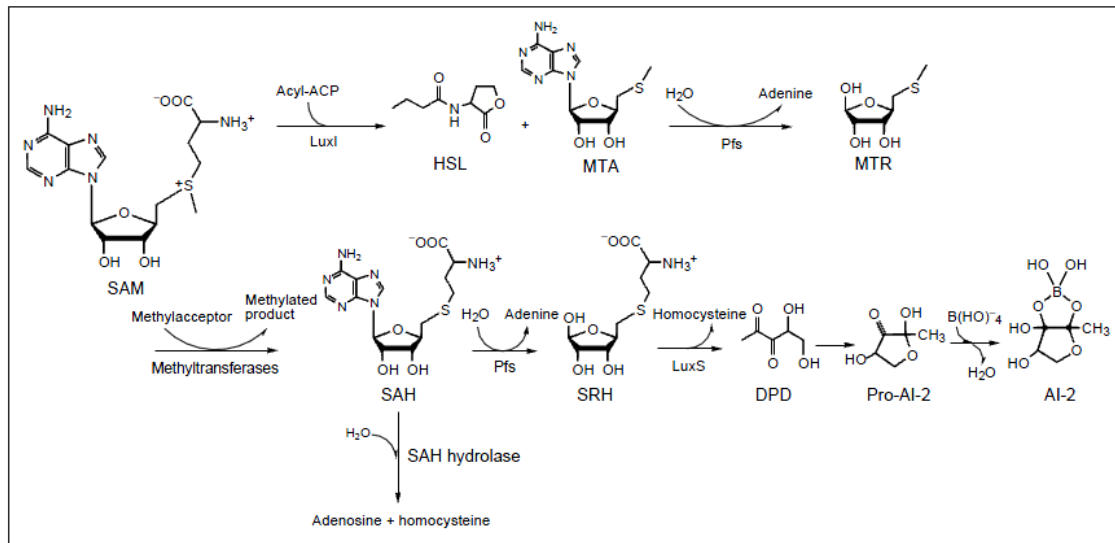


Figura 16- Biossíntese da homoserina lactona e do AI-2. Ambos os auto-indutores derivam de SAM (retirado de Xavier & Bassler, 2003)

A proteína LuxS cliva a S- ribosilhomocisteína para formar homocisteína e 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) que é depois espontaneamente ciclizado para formar AI-2 (Winzer *et al.*, 2000; De Keersmaecker *et al.*, 2005; Rajan *et al.*, 2005). Este sistema foi avaliado num determinado número de espécies e tornou-se claro que a ciclização espontânea de DPD não produz um único composto molecular, mas produz múltiplas moléculas com diferentes capacidades de ligação aos recetores de AI-2 (Vendeville *et al.*, 2005) como se encontra representado na Figura 17.

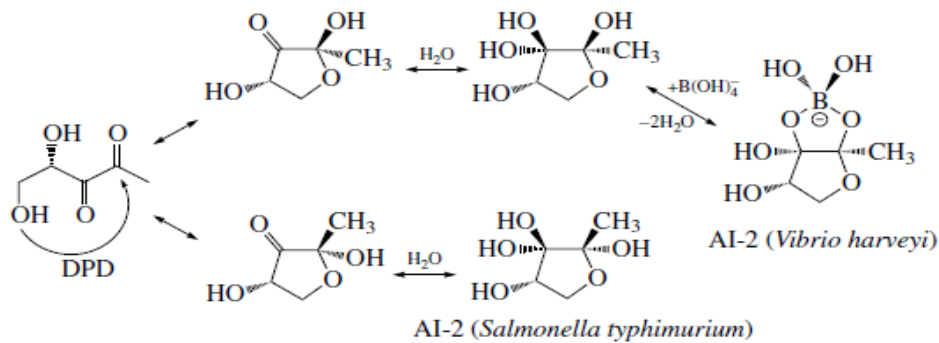


Figura 17 - Síntese de AI-2 em *V. harveyi* e *Salmonella typhimurium* (retirado de Khmel & Metlitskaya, 2006).

Isto levou à utilização do termo “AI-2” para representar coletivamente uma grande diversidade de variantes moleculares que resultam de mudanças espontâneas em DPD e atuam como ligandos para os recetores de AI-2 (Vendeville *et al.*, 2005).

A enzima LuxS é codificada pelo gene *luxS* e está presente numa grande diversidade de bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo (Federle & Bassler, 2003) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Bactérias que apresentam genes *luxS* (retirado de Federle & Bassler, 2003).

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>Leuconostoc oenos</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Clostridium acetobolyticum</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Haemophilus somnus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>Helicobacter hepaticus</i>		

O auto-indutor AI-2 pode ser sintetizado por uma grande diversidade de bactérias, e é também detetado por muitas ou possivelmente por todas elas. O auto-indutor AI-2 controla múltiplas funções em bactérias (**Tabela 2**), o que indica que, tal como a sinalização por AHL e AIP, a sinalização por AI-2 foi adaptada pelas diferentes bactérias para influenciar uma variedade de comportamentos específicos do nicho ecológico onde habitam (Federle & Bassler, 2003).

Tabela 2- Funções reguladas pela molécula sinalizadora AI-2 (adaptado de Pereira *et al.*, 2013).

Species	Functions regulated by AI-2	AI-2 receptor
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Biofilm formation [†] , adherence to host cells and growth in iron-limited medium	Unknown
<i>Actinomyces naeslundii</i> and <i>Streptococcus oralis</i>	Mutualistic biofilm formation	Unknown
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Biofilm formation	LsrB and RbsB
<i>Bacillus cereus</i>	Biofilm formation [†]	LsrB [‡]
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Increased expression of the outer surface lipoprotein VlsE [†]	Unknown
<i>Escherichia coli</i> EHEC	Chemotaxis towards AI-2, motility and HeLa cell attachment	LsrB [‡]
<i>Escherichia coli</i> K12	Biofilm formation and motility [†] AI-2 incorporation and chemotaxis towards AI-2	LsrB [‡] LsrB
<i>Haemophilus influenzae</i> strain 86-028NP	AI-2 incorporation and biofilm formation	RbsB
<i>Helicobacter pylori</i>	Motility	Unknown
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Biofilm formation and antibiotic resistance [†]	Unknown
<i>Mycobacterium avium</i>	Biofilm formation [†]	Unknown
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virulence factor production	Unknown
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Pathogenicity island 1 gene expression and invasion into eukaryotic cells	LsrB [‡]
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AI-2 incorporation	LsrB
<i>Staphylococcus aureus</i>	Capsular polysaccharide gene expression and survival rate in human blood and macrophages	Unknown
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Expression of phenol-soluble modulins, peptides, acetoin dehydrogenase, gluconokinase, bacterial apoptosis protein LrgB, nitrite extrusion protein and fructose PTS system subunit	Unknown
<i>Streptococcus anginosus</i>	Susceptibility to antibiotics	Unknown

Bactérias e as suas redes sociais

<i>Streptococcus intermedius</i>	Haemolytic activity, biofilm formation and susceptibility to antibiotics	Unknown
<i>Streptococcus gordonii</i>	Biofilm formation	Unknown
<i>Streptococcus gordonii</i> and <i>Streptococcus oralis</i>	Mutualistic biofilm formation	Unknown
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Biofilm formation	Unknown
<i>Vibrio cholerae</i>	Biofilms, protease and virulence factor production, and competence	LuxP
<i>Vibrio harveyi</i>	Bioluminescence, colony morphology, siderophore production, biofilm formation, type III secretion and metalloprotease production	LuxP

*Whole genome expression profiles such as microarrays analysis were not included in this table.

†DPD supplemented to wild-type strain cultures.

‡This receptor is present in this bacteria but the connection to the regulated phenotypes remains to be demonstrated.

Todas as bactérias possuem mecanismos de *quorum sensing* que lhes permitem coordenar centenas de comportamentos coletivos. É importante salientar que as bactérias controlam sempre a sua patogenicidade através de sistemas *quorum sensing*.

A identificação das moléculas responsáveis pela comunicação entre as bactérias apresenta-se como uma nova estratégia no combate a infeções causadas por agentes patogénicos (Koh *et al.*, 2013).

III. Terapia antimicrobiana

Uma das maiores conquistas da medicina moderna tem sido o desenvolvimento de produtos farmacêuticos antimicrobianos para o tratamento de doenças infecciosas. Em 1928, Alexandre Fleming identificou o primeiro agente com propriedades antibióticas, a penicilina, e desde então desenvolveu-se uma intensa pesquisa para que as infeções bacterianas possam ser tratadas eficazmente (Hentzer & Givskov, 2003).

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento celular ou causar a morte de bactérias e fungos. Relativamente à classificação dos

antibióticos, estes podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento bacteriano (Guimarães *et al.*, 2010).

Os antibióticos têm como principais alvos, processos celulares essenciais para a sobrevivência das bactérias, tais como a biossíntese da parede celular, a síntese proteica, a replicação e a reparação do DNA. O aumento gradual do aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos torna ineficaz o tratamento de infeções com graves consequências humanas e sócio-económicas em todo o mundo (Hall, 2004).

A procura de novos fármacos com actividade antimicrobiana torna-se imperativa, uma vez que a resistência aos antibióticos leva a falhas terapêuticas e consequentemente a limitações nas opções de tratamento (Hall, 2004).

Uma alternativa de controlar a patogenicidade de bactérias é através da atenuação específica da sua virulência, que pode ser atingida alvejando sistemas regulatórios-chave que medeiam a expressão de fatores de virulência. Um dos sistemas regulatórios alvo é o *quorum sensing*. A quebra do sistema de QS tem sido sugerida como uma nova estratégia contra infeções bacterianas (Defoirdt *et al.*, 2010).

IV. Perturbação nos sistemas de *quorum sensing*: *Quorum Quenching*

A perturbação do processo de QS em comunidades bacterianas, apresenta-se como uma vantagem competitiva quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis. Da mesma forma, a capacidade do hospedeiro para interferir na comunicação célula-a-célula pode ser crucial na prevenção da sua colonização por bactérias patogénicas que utilizam sistemas de *quorum sensing* para controlar a virulência (Waters & Bassler, 2005).

O aumento do número de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, associado aos processos referidos anteriormente, levou ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de infeções bacterianas. A descoberta de que um largo espectro de microorganismos utilizam sistemas de *quorum sensing* para controlar a produção de

fatores de virulência tornou-se um alvo atraente para a terapia antimicrobiana. Através do bloqueio destes mecanismos de sinalização célula-a-célula nos microorganismos patogénicos, que utilizam sistemas de *quorum sensing*, pode controlar-se a sua virulência, convertendo-os assim em agentes que não apresentam patogenicidade (Kievit & Iglewski, 2000; Antunes *et al.*, 2003).

Como já foi referido anteriormente, os sistemas de *quorum sensing* consistem na produção de moléculas de sinalização e dos seus recetores específicos para a regulação de genes e actividades coordenadas (Miller & Bassler, 2001; Waters & Bassler, 2005; Federle & Bassler, 2003; Parsek & Greenberg, 2005). A descoberta de mecanismos de *quorum sensing* nas bactérias levou à identificação de alguns compostos ou enzimas que suprimem a comunicação bacteriana, designada interferência no *quorum sensing* ou *quorum quenching* (Smith & Iglewski, 2003a; Zhang & Dong, 2004; Dong *et al.*, 2001).

Os antagonistas de sistemas de QS atuam, interrompendo a síntese de moléculas de sinalização, inibindo a difusão dessas moléculas, bloqueando a ligação à proteína recetora, ou impedindo a transdução de sinal após a ligação das moléculas de sinalização aos recetores (Hong *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, tem havido um incremento na identificação de antagonistas de sistemas de *quorum sensing* de origem bacteriana e não bacteriana. Até à data, os componentes biologicamente activos de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, levaram à descoberta de novas drogas para o tratamento de numerosas doenças infecciosas (Koh *et al.*, 2013).

4.1. Sistemas de *quorum quenching* entre células procariontes

O *Staphylococcus aureus* é um claro exemplo de mecanismo de *quorum quenching*, na medida em que cada um dos seus quatro grupos de AIPs inibe especificamente o *quorum sensing* de grupos competidores de *S. aureus*, sem que ocorra a inibição do crescimento e de outras funções celulares (Lyon *et al.*, 2002).

As bactérias apresentam a capacidade de degradar os auto-indutores AHLs. Foram descobertas enzimas capazes de inativar os AHLs em proteobactérias, bem como em algumas bactérias de Gram-positivo (Czajkowski & Jafra, 2009).

A inativação da molécula de sinalização pode ser mediada por dois tipos de enzimas, AHL-lactonases e AHL-acilases. As AHL-lactonases hidrolisam o anel homoserina-lactona das moléculas de sinalização AHL, enquanto as AHL-acilases decompõem a cadeia lateral libertando um ácido gordo e uma lactona (Defoirdt *et al.*, 2010).

A família de enzimas intimamente relacionada com a degradação de AHLs, AiiA, pode ser encontrada em várias espécies de *Bacillus*, incluindo *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. mycoides* isoladas a partir do meio ambiente. Esta enzima cliva os anéis lactona das porções acil dos AHLs tornando-os inativos na transdução de sinal (Dong *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Esta enzima não é específica relativamente à cadeia lateral de acil do AHL, o que sugere que esta estratégia interfere genericamente na comunicação mediada por AHL entre bactérias de Gram-negativo (Dong *et al.*, 2001).

Como mencionado anteriormente, o sistema de *quorum sensing* em *Bacillus subtilis* é mediado por péptidos não sendo por isso este sistema perturbado por este mecanismo de interrupção da comunicação em bactérias de Gram-negativo (Waters & Bassler, 2005).

A produção de enzimas que são capazes de degradar AHLs não está limitada a *Bacillus*. Homólogos de AiiA, capazes de degradar AHLs foram identificados em *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Comamonas* sp., e *Rhodococcus* sp. (Carlier *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Uroz *et al.*, 2003).

Na fase de crescimento estacionária, a *Agrobacterium tumefaciens* produz uma lactonase designada AttM, capaz de degradar o seu próprio auto-indutor (Zhang *et al.*, 2002). Nesta fase tardia de crescimento a bactéria não beneficia da participação em atividades de grupo, interrompendo assim os processos de QS, sintetizando a enzima AttM. Encontram-se igualmente descritas atividades de degradação do auto-indutor, na fase de crescimento estacionária, para as bactérias *Xanthomonas campestris* e *Erwinia carotovora* (Barber *et al.*, 1997; Holden *et al.*, 1998).

A bactéria do solo *Variovorax paradoxus* degrada AHLs, utilizando uma tática diferente de *quorum quenching*. Neste caso ocorre a destruição de AHLs através da abertura do anel lactona por uma acilase. Esta bactéria utiliza o produto da reação como uma fonte de carbono e azoto, usando uma estratégia com um duplo benefício: termina comportamentos de grupo competitivos e aumenta simultaneamente o seu próprio crescimento potencial (Leadbetter & Greenberg, 2000).

P. aeruginosa degrada cadeias longas de AHLs, mas não as cadeias curtas, através de uma acilase do tipo AiiD, denominada PvdQ (Huang *et al.*, 2003). Neste caso, o auto-indutor sintetizado pela proteína RhII, C4-homoserina-lactona, é resistente a este comportamento, enquanto o auto-indutor sintetizado pela proteína LasI, 3OC12-homoserina-lactona, pode ser destruído (Waters & Bassler, 2005).

4.2. Sistemas de *quorum quenching* de eucarionte para procarionte

Têm sido identificados mecanismos em organismos eucariontes hospedeiros, capazes de neutralizar os sistemas de *quorum sensing* de células bacterianas (Waters & Bassler, 2005). Existem compostos sintetizados quimicamente que inibem sistemas de *quorum sensing*, mas a maior parte dos antagonistas foram encontrados em extratos de plantas. Ainda é necessário aprofundar a toxicidade deste tipo de compostos (Koh *et al.*, 2013).

Os antagonistas naturais dos auto-indutores têm sido alvo de especial atenção, citando como exemplo os derivados de furanonas (incluindo as furanonas halogenadas). A alga vermelha marinha *Delisea pulchra* (*D. pulchra*) produz várias furanonas halogenadas (Figura 18), que impedem assim a sua colonização por bactérias marinhas, através da inibição dos sistemas de QS das bactérias (Khmel & Metlitskaya, 2006).

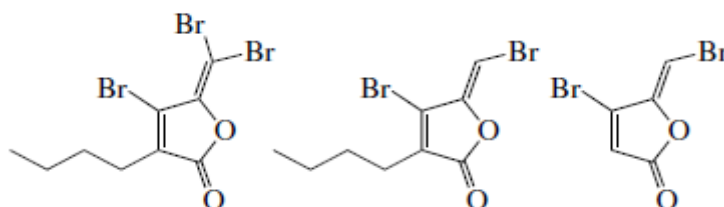


Figura 18 - Furanonas que atuam como inibidores do sistema de *quorum sensing*. O composto à esquerda e o composto central são produzidos pela alga marinha *D. pulchra*. O composto à direita representa um inibidor de QS sintetizado quimicamente (retirado de Khmel & Metlitskaya, 2006).

As furanonas naturais são halogenadas em várias posições com bromo, iodo ou cloro (Suga & Smith, 2003; Hentzer & Givskov, 2003). Derivados de furanonas são produzidos por vários organismos: algas marinhas verdes, vermelhas e castanhas, fungos, ascídias e actinomicetos (Hentzer & Givskov, 2003; Martinelli *et al.*, 2004).

A macroalga *D. pulchra* possui a sua superfície revestida com uma mistura de furanonas halogenadas que possuem similaridade estrutural com AHLs bacterianas (Givskov *et al.*, 1996). As furanonas são internalizadas pela bactéria, ligam-se às proteínas do tipo LuxR, alterando a estabilidade do complexo proteína-ligando, causando uma rápida degradação destas proteínas recetoras (Manefield *et al.*, 2002).

As algas são, portanto, protegidas contra o efeito destas bactérias. Esta estratégia previne a colonização bacteriana à superfície da alga pela inibição do sistema de *quorum sensing*, controlando a formação de biofilme (Waters & Bassler, 2005).

As furanonas halogenadas sintetizadas por *D. pulchra* têm a capacidade de bloquear sistemas de QS em *Serratia ficaria*, *V. fischeri*, *V. harveyi*, e outras bactérias, mas curiosamente não em *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2002; Manefield *et al.*, 2000; Rasmussen *et al.*, 2000).

Estudos efetuados com um derivado de furanona, (5Z)-4-bromo-5-(bromometileno)-3-butil-2(5H)-furanona sintetizada pela *D. pulchra* demonstraram que esta inibe o sistema de QS em *E. coli* que utiliza o auto-indutor AI-2. Este derivado também suprime a formação de biofilme e a expressão de 56 genes em *E. coli*, sendo que 79% destes genes são induzidos pela molécula de sinalização AI-2 (Ren *et al.*, 2004).

Após a caracterização do efeito das furanonas de *D. pulchra*, muitos laboratórios selecionaram uma ampla gama de compostos naturais e compostos quimicamente sintetizados de derivados de furanonas que inibem o sistema de QS, incluindo aqueles com variações nas cadeias laterais. Identificaram um derivado de furanona que não apresenta cadeia lateral mas que contem dois átomos de boro e inibe o sistema de QS em *P. aeruginosa* (**Figura 18**) (Hentzer *et al.*, 2002).

As furanonas suprimem vários processos celulares regulados por *quorum sensing*: bioluminescência em *V. fischeri*, a produção de fatores de virulência em *P. aeruginosa* e *Erwinia carotovora* e a formação de biofilmes (Hentzer & Givskov, 2003; Hentzer *et al.*, 2002; Manfield *et al.*, 2001; Hentzer *et al.*, 2003).

Nas bactérias de Gram- negativo, o passo inicial do *quorum sensing* é ligar um sinal específico de AHL a uma proteína LuxR. Assim, antagonistas que interferem com a ligação dos AHLs aos recetores são potenciais inibidores de QS. Têm sido testados vários compostos naturais e sintéticos relativamente à sua potencial atividade antagonista (**Figura 19**).

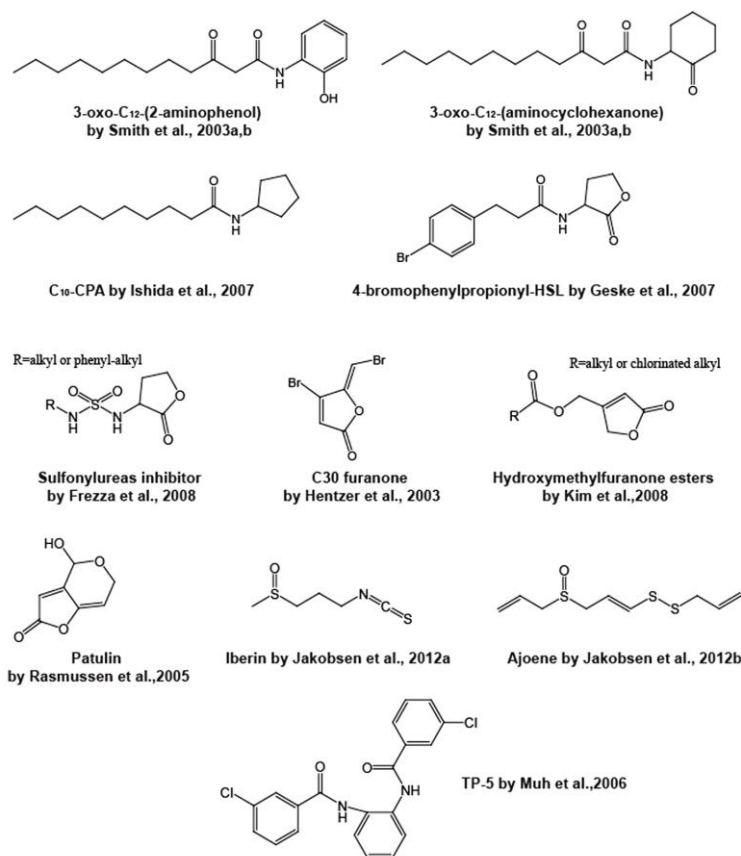


Figura 19 – Moléculas antagonistas dos recetores das bactérias de Gram-negativo (retirado de Hirakawa & Tomita, 2013).

Moléculas que apresentam analogia com os auto-indutores são potenciais candidatos a antagonistas dos sinais de AHL. Estudos com alterações na cadeia lateral de 3-oxo-C6-HSL de *Vibrio fischeri*, 3-oxo-C12-HSL de *Pseudomonas aeruginosa* e 3-oxo-C8-HSL de *Agrobacterium tumefaciens* demonstraram inibir a ligação dos AHLs nativos por

mecanismos de competição com o respectivo recetor (Passador *et al.*, 1996; Schaefer *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998).

Alguns análogos dos AHLs nativos estabelecem ligações com os recetores inativando a expressão génica e comportando-se desta forma como antagonistas (Hirakawa & Tomita, 2013).

Além da *D. pulchra*, os extractos de *Citrus x paradisi* (toranja) também contêm compostos bioativos, tais como, furocumarinas, carotenóides, limonóides, pectina e cumarina que apresentam actividade antibacteriana (Heggors *et al.*, 2002). Compostos furocumarínicos revelam ter uma forte inibição tanto contra actividades AI-1 como AI-2 e impedem a formação de biofilme em *E. coli*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* (Girenavar *et al.*, 2008).

Encontram-se descritos outros compostos naturais que interferem com o QS presentes em: *Daucus carota* (cenoura), *Allium sativum* (alho), *Matricaria recutita* (camomila), *Nymphaea* L. (nenúfar) bem como *Capsicum* sp. (variedades de pimentas). O extracto de *Allium sativum* contém três inibidores distintos de QS. Um deles é um composto dissulfureto cíclico, que exerce um forte efeito inibitório sobre sistemas de QS baseados em LuxR, mas curiosamente, sem efeito em *P. aeruginosa* (Adak *et al.*, 2011). O ácido rosmarínico extraído de *Ocimum basilicum* (manjeriço) tem a capacidade de diminuir a expressão da elastase e da protease, bem como a formação de biofilme em *P. aeruginosa* (Walker *et al.*, 2004).

Os inibidores de sistemas de QS podem afetar a integridade de um biofilme e assim tornar as bactérias mais suscetíveis à antibioterapia (Dong *et al.*, 2002), minimizando a possibilidade das bactérias se tornarem resistentes (Hentzer & Givskov, 2003).

V. Conclusão

As bactérias são microorganismos unicelulares e normalmente vivem em comunidades complexas, designadas biofilmes. As bactérias têm a capacidade de captar as informações necessárias do meio ambiente, comunicar através de moléculas de sinalização com bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, monitorizar a sua densidade populacional e regular a sua expressão génica, sendo assim consideradas microorganismos multicelulares.

As bactérias agem em unísono e têm a capacidade de coordenar comportamentos coletivos, citando como exemplo, a bioluminescência por *V. fischeri*, a esporulação por *B. subtilis*, a formação de biofilmes e a secreção de fatores de virulência por *S. aureus* através de mecanismos designados de *quorum sensing*.

Um fator importante controlado por *quorum sensing* é a virulência. Através do conhecimento deste tipo de comunicação é possível compreender que as bactérias se multiplicam até atingirem um *quorum* e lançam o seu ataque colectivo virulento em simultâneo.

O aumento gradual do aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos torna ineficaz o tratamento de múltiplas infecções. Os antibióticos são utilizados como bacteriostáticos ou como bactericidas tendo como consequência a seleção de mutações resistentes. Surge assim o *quorum sensing* como uma nova estratégia terapêutica. Perturbando este sistema de comunicação talvez as bactérias não consigam organizar o seu ataque virulento com eficiência.

Existem compostos naturais e sintéticos capazes de perturbar os sistemas de *quorum sensing*. A interferência com os circuitos de *quorum sensing* através de pequenas moléculas foi proposto como uma nova estratégia na prevenção da patogenicidade bacteriana. Estes compostos poderão representar num futuro próximo uma nova geração de moléculas que quando administradas em simultâneo com os antibióticos apresentem um efeito sinérgico no controlo da patogenicidade bacteriana.

VI. Bibliografia

Adak, S., Upadrasta, L., Kumar, S. P. J., Soni, R., Banerjee, R. (2011). Quorum quenching – an alternative antimicrobial therapeutics. *Science against microbial pathogens*, pp. 586-593.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2009). *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition. New York, Garland Science.

Antunes, L. C. M. (2003). A linguagem. *Ciência hoje*, 33 (193), pp. 17-20.

Asad, S., Opal, S. M. (2008). Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Critical Care*, 12, pp. 1-11.

Barber, C. E., Tang, J. L., Feng, J. X., Pan, M. Q., Wilson, T. J. G., Slater, H., Dow, J. M., Williams, P., Daniels, M. J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular Microbiology*, 24 (3), pp. 555-566.

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 2, pp. 582-587.

Bassler, B. L. (2002). Small Talk: Cell-to-Cell communication in bacteria. *Cell*, 109, pp. 421-424.

Bassler, B. L., Losick, R. (2006). Bacterially Speacking. *Cell*, 125, pp. 237-246.

Bassler, B. L., Wright, M., Showalter, R. E., Silverman, M. R. (1993). Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molecular Microbiology*, 9, pp. 773-786.

Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R. (1994a). Multiple signaling systems controlling expression of bioluminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology*, 13 (2), pp. 273-286.

Bassler, B. L., Wright, M., Silverman, M. R. (1994b). Sequence and function of LuxO, a negative regulator of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 12 (3), pp. 403-412.

Brenner, K., You, L., Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26 (9), pp. 483-489.

Cao, J. G., Meighen, E. A. (1989). Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (36), pp. 21670-21676.

Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. (2003). The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, AiiB, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), pp. 4989-4993.

Carrington, J. C., Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301, pp. 336-338.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Dorsselaer, A. V., Pelczer, I., Bassler, B. L., Hughson, F. M. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 415, pp. 545-549.

Czajkowski, R., Jafra, S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochemica Polonica*, 56 (1), pp. 1-16.

De Keersmaecker, S. C. J., Varszegi, C., van Boxel, N., Habel, L. W., Metzger, K., Daniels, R., Marchal, K., De Vos, D., Vanderleyden, J. (2005). Chemical synthesis of (S) - 4, 5-Dihydroxy-2, 3- pentanedione, a bacterial signal molecule precursor, and validation of its activity in *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (20), pp. 19563-19568.

Decho, A. W., Norman, R. S., Visscher, P. T. (2009). Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends in Microbiology*, 18 (2). Pp. 73-80.

Defoirdt, T., Boon, N., Bossier, P. (2010). Can bacteria evolve resistance to quorum sensing disruption? *PLoS Pathogens*, 6 (7), pp. 1-6.

Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature*, 411, pp. 813-817.

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*, *PNAS*, 97 (7), pp. 3526-3531.

Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Reviews*, 55(3), pp. 395-424.

Dufour, P., Jarraud, S., Vandenesch, F., Greenland, T., Novick, R. P., Bes, M., Etienne, J., Lina, G. (2002). High genetic variability of the *agr* locus in *Staphylococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 184 (4), pp. 1180-1186.

Eberl, L., Tummeler, B. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *Int. J. Med. Microbiol.*, 294, pp. 123-131.

Engebrecht, J., Nealson, K., Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32, pp. 773-781.

Engebrecht, J., Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *PNAS*, 81, pp. 4154-4158.

Ferderle, M. J., Bassler, B. L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 112 (9), pp. 1291-1299.

Freeman, J. A., Bassler, B. L. (1999a). A genetic analysis of the function of LuxO, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 31(2), pp. 665-677.

Freeman, J. A., Bassler, B. L. (1999b). Sequence and function of LuxU: a two-component phosphorelay protein that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 181 (3), pp. 899-906.

Freeman, J. A., Lilley, B. N., Bassler, B. L. (2000). A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Molecular Microbiology*, 35 (1), pp. 139-149.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., Greenberg, E. P. (1994). *Quorum sensing* in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176 (2), pp. 269-275.

Girenavar, B., Cepeda, M. L., Soni, K. a., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakrasha, G. K., Pillai, S. D. (2008). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signalling and biofilm formation in bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, pp. 204-208.

Givskov, M., de Nys, R., Manefield, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D., Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *Jornal of Bacteriology*, 178(22), pp. 6618-6622.

Grossman, A., Losick, R. (1997). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, pp. 4369-4373.

Guimarães, D. O., Momesso, L. S., Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, 33 (3), pp. 667-679.

Hall, B. G. (2004). Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 430-435.

Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Jr, C. J. E. , Greenber, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* Ains protein. *Journal of Bacteriology*, 181(18), pp. 5766-5770.

Hegggers, J. P., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., Cox, R., Zhao, J. G. (2002). The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8 (3), pp. 333-340.

Henke, J. M., Bassler, B. L. (2004a). Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 186 (12), pp. 3794-3805.

Henke, J. M., Bassler, B. L. (2004b). Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 186 (20), pp. 6902-6914.

Hentzer, M., Givskov, M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112, pp. 1300-1307.

Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydorn, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002).

Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*, 148, pp. 87-102.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*, 22 (15), pp. 3803-3815.

Hirakawa, H., Tomita, H. (2013). Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 4 (114), pp. 1-14.

Holden, M. T., McGowan, S. J., Bycroft, B. W., Stewart, G. S., Williams, P., Salmond, G. P. (1998). Cryptic carbapenem antibiotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile *trans* activation by the *carR* transcriptional regulator. *Microbiology*, 144, pp. 1495-1508.

Hong, K., Koh, C., Sam, C., Yin, W., Chan, K. (2012). Quorum quenching revisited – from signal decays to signaling confusion. *Sensors*, 12, pp. 4661-4696.

Hooshangi, S., Bentley, W. E. (2008). From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuits and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, pp. 550-555.

Huang, J. J., Han, J. I., Zhang, L. H., Leadbetter, J. R. (2003). Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10), pp. 5941-5949.

Jayaraman, A., Wood, T. K. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 10, pp. 145-167.

Ji, G., Beavis, R. C., Novick, R. P. (1997). Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science*, 276, pp. 2027-2030.

Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. (2005). Quorum-sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 7 (4), pp. 459-471.

Kaplan, H. B., Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of Bacteriology*. 163(3), pp. 1210-1214.

Khmel, I. A., Metlitskaya, A. Z. (2006). Quorum sensing regulation of gene expression: a promising target for drugs against bacterial pathogenicity. *Molecular Biology*, 40 (2), pp. 169-182.

Kievit, T. R., Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68 (9), pp. 4839-4849.

Koh, C., Sam, C., Yin, W., Tan, L. Y., Krishnan, T., Chong, Y. M., Chan, K. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors*, 13, pp. 6217-6228.

Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N., Mahadik, K. R. (2009). Biofilm: importance and applications. *Indian Journal of Biotechnoly*, 8, pp. 159-168.

Kolenbrander, P. E. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54, pp. 413-437.

Lazazzera, B. A., Solomon, J. M., Grossman, A. D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell*, 89, pp. 917-925.

Leadbetter, J. R., Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology*, 182 (24), pp. 6921-6926.

Lee, S. J., Park, S. Y., Lee, J. J. Yum, D. Y., Koo, B. T., Lee, J. K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (8), pp.3919-3924.

Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., Bassler, B. L. (2004). The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell*, 118, pp. 69-82.

Li, H., Tian, X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 12, pp. 2519-2538.

Lilley, B. N., Bassler, B. L. (2000). Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Molecular Microbiology*, 36 (4), pp. 940-954.

Lupp, C., Ruby, E. G. (2005). *Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors. *Journal of Bacteriology*, 187 (11), pp. 3620-3629.

Lupp, C., Urbanowski, M., Greenberg, E. P., Ruby, E. G. (2003). The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence genes expression and are important for persistence in the squid host. *Molecular Microbiology*, 50 (1), pp. 319-331.

Lyon, G. J., Novick, R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, 25, pp. 1389-1403.

Lyon, G. J., Wrights, J. S., Christopoulos, A., Novick, R. P., Muir, T. W. (2002). reversible and specific extracellular antagonism of receptor-histidine kinase signaling. *J. Biol. Chem.*, 277, pp. 6247-6253.

Magnuson, R., Solomon, J., Grossman, A. D. (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell*, 77, pp. 207-216.

Manefield, M., Harris, L., Rice, S. A., de Nys, R., Kjelleberg, S. (2000). Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, pp. 2079-2084.

Manefield, M., Rasmussen, T. B., Hentzer, M., Andersen, J. B., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, 148, pp. 1119-1127.

Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P. C., Kelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205, pp. 131-138.

Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A., Gonzalez, J. E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* sinR/sinI locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *Journal of Bacteriology*, 184, pp. 5686-5695.

Martinelli, D., Grossmann, G., Sequin, U., Brandl, H., Bachofen, R. (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology*, 4 (25), pp. 1-10.

Miller, M. B., Bassler, B.L. (2001). *Quorum sensing* in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 165-199.

Mitchell, R. J., Lee, S. K., Kim, T., Ghim, C. (2011). Microbial linguistics: perspectives and applications of microbial cell-to-cell communication. *BMB reports*, pp. 1-10.

Mok, K. C., Wingreen, N. S., Bassler, B. L. (2003). *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *The EMBO Journal*, 22 (4), pp. 870-881.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2012). *Medical Microbiology*, 7th edition. Canada, Elsevier Mosby.

Nakano, M. M., Zuber, P. (1991). The primary role of comA in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of srfA. *Journal of Bacteriology*, 173, pp. 7269-7274.

Nealson, K. H., Hastings, J. W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.*, 43, pp. 496-518.

Ng, W. L., Bassler, B. L. (2009). Bacterial *quorum-sensing* network architectures. *The Annual Review of Genetics*, 43, pp. 197-222.

Novick, R. P., Geisinger, E.S. (2008). *Quorum sensing* in Staphylococci. *The Annual Review of Genetics*, 42, pp. 541-564.

Novick, R. P., Projan, S. J., Kornblum, J., Ross, H. F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F., Moghazeh, S. (1995). The *agr* P2 operon: An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet*, 248, pp. 446-458.

Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, 149, pp. 1541-1550.

Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: The connection between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.*, 13, pp. 27-33.

Passador, L., Tucker, K. D., Guertin, K. R., Journet, M. P., Kende, A. S., Iglewski, B. H. (1996). Functional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer PAI. *J. Bacteriol.*, 178, pp. 5995-6000.

Perego, M. (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *PNAS*, 94, pp. 8612-8617.

Pereira, C. S., Thompson, J.A., Xavier, K. B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, pp. 156-181.

Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Iglewski, B. H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 179 (10), pp. 3127-3132.

Rajan, R., Zhu, J., Hu, X., Pei, D., Bell, C. (2005). Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complex with a catalytic 2-ketone intermediate. *Biochemistry*, 44, pp. 3745-3753.

Rasmussen, T. B., Manefield, M., Andersen, J. B., Eberl, L., Anthoni, U., Christophersen, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Givskov, M. (2000). How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*, 146, pp. 3237-3244.

Ren, D., Bedzyk, L. A., Ye, R. W., Thomas, S. M., Wood, T. K. (2004). Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 88, pp. 630-642.

Rumjanek, N. G., Fonseca, M. C., Xavier, G. R. (2004). *Quorum sensing* em sistemas agrícolas. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 33, pp. 35-50.

- Rutherford, S. T., Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, pp. 1-26.
- Saenz, H. L., Augsburg, V., Vuong, C., Jack, R. W., Gotz, F., Otto, M. (2000). Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch. Microbiol.*, 174, pp. 452-455.
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M., Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *PNAS*, 104 (40), pp. 15876-15881.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E., Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *PNAS*, 93, pp. 9505-9509.
- Schuster, M., Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, pp. 73-81.
- Seed, P. C., Passador, L., Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol*, 177, pp. 654-659.
- Shapiro, J. A. (1988). Bacteria as multicellular organisms. *Scientific American*, pp. 82-89.
- Sifri, C. D. (2008). *Quorum sensing: bacteria talk sense*. *Clinical Infection Diseases*, 47, pp. 1070-1076.
- Smith, R. S., Iglewski, B. H. (2003a). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 56-60.

Smith, R. S., Iglewski, B. H. (2003b). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J. Clin. Investig.*, 112, pp. 1460-1465.

Solomon, J. M., Lazazzera, B. A., Grossman, A. D. (1996). Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathway in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 10, pp. 2014-2024.

Solomon, J. M., Magnuson, R., Srivastava, A., Grossman, A.D. (1995). Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*, *Genes Dev.*, 9, pp. 547-558.

Suga, H., Smith, K. (2003). Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, pp. 586-591.

Swift, S., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. (1999). N- acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, pp. 291-313.

Umesha, S., Shivakumar, J. (2013). Bacterial quorum sensing and its application in biotechnology. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4 (2), pp. 850-861.

Uroz, S., D'Angelo-Picard, C., Carlier, A., Elasmri, M., Sicot, C., Petit, A., Oger, P., Faure, D., Dessaux, Y. (2003). Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology*, 149, pp. 1981-1989.

Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P., Di Marco, S. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *The EMBO Journal*, 21(17), pp. 4393-4401.

Vendeville, A., Winzer, K., Heulier, K., Tang, C. M., Hardie, K. R. (2005). Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, pp. 383-389.

Visick, K. L., Foster, J., Doino, J., Mc-Fall-Ngai, M., Ruby, E. G. (2000). *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *Journal of Bacteriology*, 182, pp. 4578-4586.

Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I., Iglewski, B. H. (2003). Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. *Journal of Bacteriology*, 185 (7), pp. 2080-2095.

Walker, T.S., Bais, H. P., Deziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation and root exudation. *Plant Physiol.*, 134, pp. 320-331.

Wang, H., Tu, F., Gui, Z., Lu, X., Chu, W. (2013). Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Microbiol*, 53 (2), pp. 163-167.

Wang, L., Grau, R., Perego, M., Hoch, J. (1997). A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 11, pp. 2569-2579.

Waters, C. M., Bassler, B. L. (2005). *Quorum sensing*: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, pp. 319-346.

William, P., Camara, M. (2009). *Quorum sensing* and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*, 12, pp. 182-191.

Winzer, K., Hardie, K. R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M. T. G., Linforth, R., Cornell, K. A., Taylor, A. J., Hill, P. J., Williams, P. (2000). LuxS: its role in central metabolism and the *in vitro* synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology*, 148, pp. 909-922.

Xavier, K. B., Bassler, B. L. (2003). LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 6, pp. 191-197.

Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M., Greenberg, E. P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.*, 186 (6), pp. 1838-1850.

Zhang, H. B., Wang, L. H., Zhang, L. H. (2002). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS*, 99, pp. 4638-4643.

Zhang, L. H., Dong, Y. H. (2004). Quorum sensing and signal interference: Diverse implications. *Mol. Microbiol.*, 53, pp. 1563-1571.

Zhu, J., Beaber, J. W., More, M. I., Fuqua, C., Eberhard, A., Winans, S. C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, 180, pp. 5398-5405.