

Ana Viegas

*Quorum Sensing* na Prática Clínica: Mito ou Realidade

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013



Ana Viegas

*Quorum Sensing* na Prática Clínica: Mito ou Realidade

Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2013

Ana Viegas

*Quorum Sensing* na Prática Clínica: Mito ou Realidade

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

---

## **Resumo**

Este trabalho tem como objetivo analisar, através desta revisão bibliográfica, a possibilidade de se estudar mais detalhadamente o fenómeno de QS e avaliar a hipótese de se utilizar este mecanismo a favor do tratamento de algumas patologias.

A influência dos microrganismos na saúde e/ou enfermidade da população, é uma questão incontornável. É de facto relevante que se efetuem estudos acerca do modo como estes seres sobrevivem, como comunicam entre si e, principalmente, averiguar quais as suas potencialidades para que futuramente possam ser exploradas em proveito da saúde humana.

O estudo do QS, suas moléculas sinalizadoras e inibitórias é bastante complexo, devido à elevada quantidade e diversidade de moléculas envolvidas no processo. Este fenómeno permite aos microrganismos, mais especificamente às bactérias, a sobrevivência em comunidade e em condições pouco favoráveis, uma vez que possibilita a formação de uma estrutura designada por biofilme. Esta confere-lhes proteção contra as defesas do hospedeiro e contra os antibióticos. Assim, o estabelecimento de uma infeção torna-se rápido e eficaz. Esta situação é relativamente comum em pacientes com fibrose cística, transplantados, com feridas crónicas, com próteses ortopédicas ou outros dispositivos médicos (cateteres, válvulas, etc). A instalação do biofilme acarreta, para além dos custos económicos devido à repetição dos tratamentos, custos para o doente, nomeadamente, diminuição da qualidade de vida.

O sucesso da sobrevivência das bactérias sob a influência do mecanismo de QS, levou os investigadores a colocarem a hipótese de utilizarem este processo nas mais diversas áreas, designadamente na área da saúde. Assim, graças à engenharia genética que permite adicionar ou remover genes de interesse às bactérias e colocá-las sob o controlo de outras através do QS, verificou-se que moléculas sinalizadoras e inibitórias tinham um grande potencial para a deteção e/ou tratamento de alguns tipos de cancro, impediam a formação de biofilmes sobre as superfícies das próteses, permitiam identificar os agentes etiológicos de determinadas infeções, constituíam uma excelente alternativa terapêutica no tratamento de feridas crónicas, entre outros.

É neste contexto que se compreende a relevância do estudo e compreensão do QS, para que seja possível utilizá-lo na prática clínica, motivo pelo qual se efetuam inúmeras investigações, que até à data revelaram resultados bastante promissores.

## **Abstract**

This work aims to analyze, through this literature review, the possibility of studying in detail the phenomenon of QS in order to identify potential ways of disruption and evaluate the possibility of using this mechanism in favor of the treatment of some diseases.

The influence of microorganisms in health and / or illness of the population, is an unavoidable question. It is indeed important to be made, any studies about how these organisms survive, how they communicate with each other, and especially to ascertain what their potential future so that they can be exploited for the human health benefit.

Study of QS signaling molecules and their inhibitory is quite complex, due to the high number and diversity of molecules involved in the process. This phenomenon allows micro-organisms, more particularly bacteria, to survival in community under undesirable conditions, since it enables the formation of a structure that provides protection against host defenses and against antibiotics, called biofilm. Thus, the establishment of an infection becomes faster and more effective. This situation is relatively common in patients with cystic fibrosis, transplant recipients, patients with chronic wounds or patients with orthopedic or other medical devices (catheters, valves, etc.). The installation of biofilm brings, apart from the economic costs due to repeated treatments, costs to the patient, in particular, decreased of life's quality.

The success of the bacteria's survival under the influence of QS mechanism, led investigators to consider the hypothesis to use this process in several areas, particularly in health. Thus, by genetic engineering which enables adding or removing bacteria interesting genes and placed them under control of other bacteria, by QS was found that both inhibitory and signaling molecules have a great potential for the detection and / or treatment of some types of cancer, prevented the formation of biofilms on the surfaces of prostheses, allowed to identify the etiologic agents of certain infections and were an excellent therapeutic option in the treatment of chronic wounds.

It is in this context, lies the importance of studying and understanding the QS, so you can use it in clinical practice, which is why numerous investigations are carried out, which to date have shown very promising results.

## **Dedicatórias**

Aos meus pais, pela dupla oportunidade, por todo o amor, carinho e confiança que sempre me deram. Tudo o que sou hoje é a eles que devo em primeiro lugar.

Aos meus avós, agradeço o afeto, a cumplicidade, o amor e os ensinamentos que sempre me transmitiram. Todas as palavras seriam curtas para expressar o amor e a gratidão que lhes tenho.

À minha família, uma palavra especial, pelo apoio, pela amizade e por todos os valores que sempre me inculcaram.

À Nicole, por ser a irmã que não tive, agradeço por todos os momentos que partilhámos, pelos conselhos, pelos risos, pelo companheirismo e pela amizade. Não seria capaz de traduzir nestas linhas tudo o que me deu e o que significa para mim. Juntas partilhámos alguns dos melhores momentos que tive e por isso lhe agradeço de todo o coração.

À Martinha, por ser a amiga que qualquer pessoa gostaria de ter e que vou guardar comigo para sempre. Agradeço por toda a ajuda que me deu ao longo destes anos.

Às minhas queridas Joana, Andreia e Isabel, por sempre me apoiarem, por todas as vezes que me ouviram e pelas surpresas com que me apresentaram. Agradeço a amizade, o companheirismo e a boa disposição. Apesar de esta fase ter terminado, a nossa amizade irá continuar com a mesma alegria de sempre.

Aos meus amigos, por me recordarem sempre dos valores mais importantes da amizade e por sempre estarem presentes quando precisei.



## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Pia Ferraz, um agradecimento especial por toda a amabilidade, disponibilidade e simpatia com que sempre me recebeu no decorrer deste trabalho.

A todos os professores com quem tive o privilégio de aprender e partilhar experiências durante este período da minha vida.

À Universidade Fernando Pessoa.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES .....	i
ÍNDICE DE TABELAS .....	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	iii
INTRODUÇÃO .....	1
DESENVOLVIMENTO .....	3
<b>I. Definição de QS.....</b>	<b>3</b>
<b>II. Perspetiva Histórica. ....</b>	<b>4</b>
<b>III. Modelos de QS. ....</b>	<b>5</b>
1- QS baseado em AHLs.....	6
2- QS baseado em oligopeptidos.....	6
3- Outros sistemas de QS .....	8
<b>IV. Utilização de QS pelos microrganismos. ....</b>	<b>8</b>
1- Detecção de moléculas sinalizadoras.....	10
2- Critérios para a seleção de moléculas de QSI.....	12
3- Tipo de QSI.....	13
3.1. QSI de Origem Natural.....	13
3.1.1- QSI de origem procariótica .....	13
3.1.2. QSI de origem animal .....	16
3.1.3- QSI de origem vegetal.....	17
3.1.4- QSI baseado em organismos marinhos .....	24
3.1.5- QSI de origem fúngica .....	25
3.1.6- QSI baseado em anticorpos .....	25
3.2- QS de Origem Sintética.....	26

3.2.1- Síntese de moléculas sinalizadoras.....	27
3.2.2- Modificações na cadeia lateral das AHLs .....	27
3.2.3- Alterações na estrutura do anel da AHLs.....	28
3.2.4- Antagonistas dos recetores .....	29
3.2.4.1- Recetores <i>LuxR</i> , <i>LuxO</i> e <i>LasR</i> .....	29
3.2.4.2- Recetor <i>RhIR</i> .....	30
3.2.4.3- Recetor <i>QscR</i> .....	31
3.2.5- Sinal <i>QseC</i> .....	33
3.2.6- Modificação no sinal AIP-II.....	34
3.2.7- Complexos metálicos .....	34
3.2.8- Outros .....	35
<b>VI- Sinergismo entre antibióticos e QSI.....</b>	<b>35</b>
<b>VII- Resistência bacteriana aos QSI e alternativas. ....</b>	<b>36</b>
<b>VIII. Aplicações do QS. ....</b>	<b>37</b>
1- Aplicações do QS na prática clínica .....	38
1.1- Aplicações do QS no diagnóstico e terapêutica .....	38
1.2- Aplicações do QS em oncologia .....	39
1.2.1- Justificações para a aplicação de péptidos do QS em oncologia.....	39
1.2.2- Mecanismos de ação dos péptidos antitumorais.....	41
1.3- Aplicações do QS nos dispositivos ortopédicos .....	42
1.4- Aplicações do QS no tratamento de feridas crónicas.....	44
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Princípio do sistema <i>Quorum Sensing</i> . (adaptado de Sola et al, 2012).....	3
Ilustração 2- Produção de bioluminescência pela bactéria <i>Vibrio Fischeri</i> regulada pelo processo de QS. (adaptado de Lal, A., 2009). .....	4
Ilustração 3 - Interação dos sistemas SQS 1 e SQS 2 para a produção de toxinas. (adaptado de Givskov et al, 2008).....	7
Ilustração 4 - Algumas aplicações do processo de QS (adaptado de Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).....	37
Ilustração 5 - Espécies bacterianas mais frequentemente associadas a infecções relacionadas com próteses ortopédicas. (adaptado de Campoccia, D., et al, 2006). .....	43

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Algumas moléculas sinalizadoras de QS, sua estrutura química e microrganismos onde são expressas. (adaptado de Lal, A., 2009).....	5
Tabela 2: Alguns biossensores utilizados para detetar as moléculas sinalizadoras de QS. (adaptado de Kalia, V.C., 2013). .....	11
Tabela 3: Enzimas bacterianas inibidoras do QS. (adaptado de Kalia, V.C., 2013). .....	15
Tabela 4: Inibidores do QS de origem eucariótica. (adaptado de Kalia, V.C., 2013). .....	20
Tabela 5: Inibidores do QS de origem sintética. (adaptado de Kalia, V.C., 2013). .....	31

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AHL - N-acyl homoserine lactone

AI-2 - Autoindutor-2

AIP - Autoinducer peptide

CMI - Concentração Mínima Inibitória

DFO - Ga - desferrioxamina-galio

DPD - Dihydroxi-2,3-pentaedione

MRSA-Meticilin Resistant *Staphylococcus Aureus*.

NIPs - Péptidos indutores de necrose

PHLs - Fenilacetanoil HLs

PIP- Péptidos inibidores da protease

PONs- Paraoxonases dos mamíferos.

QS - *Quorum Sensing*

QQ - *Quorum Quenching*

QSI - Inibidores do *Quorum Sensing*

RHK - Recetor Histidina Kinase

RIP – Péptido Inibidor da RNA- III

## INTRODUÇÃO

O fenómeno de QS é um mecanismo de comunicação que alguns microrganismos (principalmente as bactérias) adotam no sentido de se adaptarem a condições do meio adversas (como, por exemplo, a baixa disponibilidade de nutrientes ou oxigénio) e que os leva a funcionarem como um único organismo multicelular organizado. Esta comunicação é realizada através da produção de sinais químicos que se difundem e são captados por outros microrganismos. No entanto, este processo está dependente de uma determinada densidade populacional mínima, ou seja, é necessária a presença de uma quantidade mínima de bactérias para que ocorra. (Givskov *et al*, 2008)

Este sistema possibilita às bactérias comunicar com outras espécies de modo a obter informações acerca do meio, habitar ambientes inóspitos, verificar a densidade populacional e principalmente regular a expressão de genes, o que permite controlar processos celulares como a esporulação, expressão de genes de virulência, formação de biofilmes, produção de antibióticos ou de bioluminescência. (Sola *et al*, 2012)

O estudo mais aprofundado do funcionamento do mecanismo de QS pode revelar-se bastante útil pois são vários os problemas associados à presença e persistência de microrganismos, seja em hospedeiros ou em dispositivos médicos (catéteres, válvulas ou outros materiais de suporte). Desta forma, a descoberta de alternativas para interromper a cadeia de acontecimentos envolvida no mecanismo de comunicação celular pode constituir um passo de gigante para ultrapassar os problemas associados às resistências aos antibióticos, nomeadamente, a formação de biofilmes. (Sola *et al*, 2012)

A grande variedade de mecanismos de resistência a antibióticos, a fácil adaptação a condições adversas e a elevada variabilidade genética são algumas das razões que fazem das bactérias uns organismos altamente sofisticados no que respeita à sua sobrevivência, persistência e proliferação nos mais diversos ambientes.

Estão a ser realizados alguns estudos de investigação com o propósito de desenvolver metodologias capazes de utilizar o mecanismo de QS em benefício humano. Os resultados

revelaram-se bastante promissores, contudo, na maioria dos casos, ainda não são suficientes para que seja possível utilizar o QS como auxílio na abordagem terapêutica dos pacientes.

É neste ponto que assenta o fundamento deste tema: compreender este comportamento tão complexo que as bactérias exibem, utilizando-o na prática clínica, principalmente na terapêutica.



## DESENVOLVIMENTO

### I. Definição de QS.

O mecanismo de QS pode ser entendido como uma forma de comunicação existente entre bactérias, através da produção, difusão e captação de sinais químicos. Desta forma, as bactérias ajustam o seu comportamento em relação ao meio de acordo com a informação que recebem e assim, agem como um único organismo complexo e não como células individuais. Este fenómeno constitui uma enorme vantagem adaptativa das bactérias. (Sola *et al*, 2012)

No entanto, esta comunicação só se verifica quando existe no meio um número de bactérias suficientemente elevado a produzirem os referidos sinais químicos que se designam genericamente por auto-indutores. No início do processo, a densidade celular é baixa pelo que a concentração de auto-indutores não é suficientemente elevada para ser detetada, mas à medida que a população bacteriana se desenvolve, essa concentração vai aumentando até atingir um valor crítico designado por *quorum size* a partir do qual as moléculas sinalizadoras acabam por ser reconhecidas pelas bactérias. (Givskov *et al*, 2008; Sola *et al*, 2012)

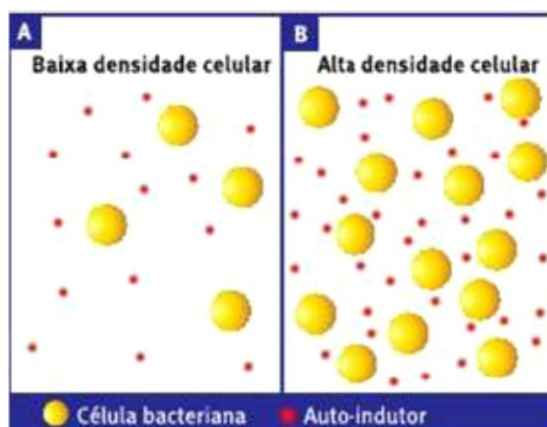


Ilustração 1 - Princípio do sistema *Quorum Sensing*. (adaptado de Sola *et al*, 2012).

Uma vez ligados e reconhecidos pelas bactérias, estes sinais químicos vão induzir o genoma bacteriano a sintetizar outros que regulem os processos de virulência, formação de

biofilmes, resistência e produção de antibióticos, diferenciação celular ou produção de bioluminescência. (adaptado de Sola *et al*, 2012)

## II. Perspetiva Histórica.

O estudo do QS iniciou-se na década de 60 quando os cientistas ficaram intrigados com a emissão de luz da lula *Euprymna scolopes*. Descobriu-se que esta luminescência era o resultado de um processo de simbiose que ocorria entre este organismo e a bactéria *Vibrio Fischeri*, hospedeira no intestino da lula. A cooperação garantia à lula uma camuflagem evitando os predadores, pois o meio circundante ficava iluminado o que permitia melhor visualização de outros animais e uma atração para as suas presas que se dirigiam para a fonte de luz; em troca, a bactéria tinha à sua disposição uma elevada concentração de nutrientes (Lal, A., 2009).

Este processo requer uma elevada quantidade de energia pelo que a bactéria apenas produz luminescência quando se encontra em simbiose com outros organismos e em elevada concentração. Assim, *Vibrio Fischeri* não produz luz quando se encontra em meio de cultura (Sola *et al*, 2012).

Quando é atingido o *quorum size*, os auto-indutores ligam-se a um recetor denominado LuxR. O complexo auto-indutor/LuxR liga-se a uma região específica do genoma, a *lux box*, dando início à síntese da enzima luciferase que conduz ao surgimento de bioluminescência (Lal, A., 2009).

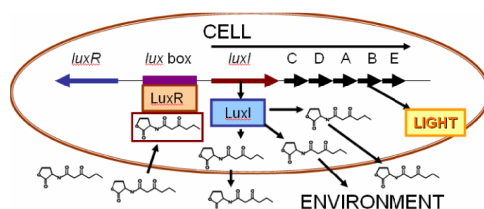
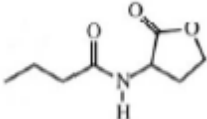
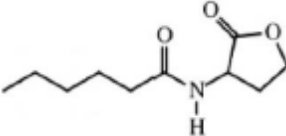
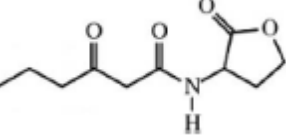
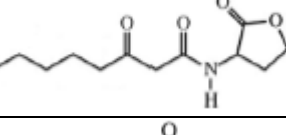
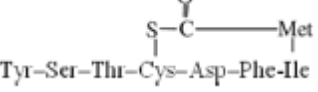
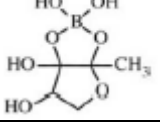



Ilustração 2- Produção de bioluminescência pela bactéria *Vibrio Fischeri* regulada pelo processo de QS. (adaptado de Lal, A., 2009).

### III. Modelos de QS.

Até à atualidade, foram identificadas várias moléculas que regulam o processo de QS: oligopéptidos, AHLs, AI-2 (furanosil borato), ácido metilésterhidroxipalmitico e ácido metildodecanóico. (Dong e Zhang, 2005; McDougald *et al*, 2005). As duas moléculas mais extensamente estudadas são as AHLs produzidas pelas bactérias de Gram-negativo e os oligopéptidos e seus derivados presentes no mecanismo de QS das Gram-positivo. (Amara *et al*, 2011; Walters e Bassler, 2005).

**Tabela 1:** Algumas moléculas sinalizadoras de QS, sua estrutura química e microrganismos onde são expressas. (adaptado de Lal, A., 2009).

Sinal	Estrutura	Organismo (exemplo)
C4-HSL (HSL)		<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C6-HSL		<i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aureofaciens</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
3-Oxo-C6-HSL		<i>E. carotovora</i> <i>Vibrio fischeri</i> <i>Y. enterocolitica</i>
3-Oxo-C8-HSL		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
(AIP)-1		<i>Staphylococcus aureus</i>
AI-2 (S-THMF-borato)		<i>Vibrio harveyi</i>
CSF (Fator Estimulante da Esporulação)	Glu - Arg - Gly - Met - Thr	<i>Bacillus subtilis</i>
Farnesol		<i>Candida albicans</i>

## 1- QS baseado em AHLs:

Os elementos fundamentais neste modelo de QS são o gene *luxI* homólogo que codifica para uma enzima que se designa por AHL sintetase e o gene *luxR* homólogo que codifica para uma proteína recetora e reguladora da resposta. Quando a densidade bacteriana é baixa, o gene *luxI* é expresso continuamente conduzindo à produção de AHL sintetase que, por sua vez, leva à formação de moléculas de AHL. Estas acumulam-se lentamente no meio dependendo do processo de difusão. O aumento da concentração do autoindutor leva ao aumento da população bacteriana. Quando se atinge o *quorum size*, as moléculas sinalizadoras ligam-se ao recetor e ativam a transcrição do gene *luxR*. O complexo AHL-*luxR* liga-se à região promotora do DNA e ativa a expressão dos genes regulados pelo mecanismo de QS. (Zhang R.G. *et al*, 2002)

Em *Sinorhizobium meliloti*, foram identificados três sistemas de QS designados por Sin, Tra e Mel. O sistema Sin, por exemplo, produz moléculas de AHL com cadeias acil com mais de 14 carbonos (C14HSL e C18HSL) eficazes na fixação de nitrogénio. (Marketon *et al*, 2002).

Em *Vibrio harveyi* o QS atua por três vias distintas reguladas por AIs denominadas por HAI-1, CAI-1 e AI-2. Neste caso, HAI-1 tem uma estrutura química de OHC4HSL que leva a uma via de sinalização específica da espécie, CAI-1 conduz a bactéria a realizar comunicação com bactérias de outros géneros e AI-2 é específica para comunicação interespecíficas. (Henke e Bassler, 2004; Higgins *et al*, 2007). O mecanismo de QS regulado por AI-2 identificado inicialmente em *Vibrio harveyi* foi também encontrado em muitas outras bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo. (Walter e Bassler, 2005)

## 2- QS baseado em oligopeptidos:

Os oligopeptidos são moléculas pequenas compostas por 10 ou menos aminoácidos e no processo de QS são designadas por AIP. São utilizadas maioritariamente pelas bactérias de Gram-positivo que as produzem e libertam para o meio externo, atuando através de um sistema de sinalização por 2 componentes. Quando a concentração extracelular destas moléculas atinge um determinado limite crítico, os dois componentes detetam uma quinase membranar. Esta reconhece o sinal e transfere-o para o meio interno através da fosforilação

de uma proteína reguladora da resposta que se liga ao DNA e controla a expressão dos genes alvo. (Sola *et al*, 2012; Tortosa *et al*, 2001).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria de Gram-positivo cuja virulência é regulada por dois sistemas de QS altamente organizados, em que o primeiro regula o segundo. O SQS 1 (staphylococcal quorum-sensing system 1) consiste no autoindutor RAP (RNAIII-activating protein) e na sua molécula alvo, o TRAP. O SQS 1 é capaz de regular o SQS 2 (staphylococcal quorum-sensing system 2) composto pelos componentes do sistema *agr* que inclui o AIP e o seu sensor AgrC. (Givskov *et al*, 2008)

Os sistemas SQS 1 e SQS 2 interagem do seguinte modo: à medida que a população bacteriana cresce, vai produzindo RAP, que por sua vez, leva à fosforilação da histidina no seu alvo, o TRAP. A fosforilação do TRAP conduz à ativação do *agr*, à síntese de RNAII e consequentemente à produção de AIP e AgrC. O AIP regula a fosforilação do TRAP e do seu recetor AgrC. A fosforilação do AgrC promove a fosforilação de AgrA e em conjunto com SarA e SigB resulta na produção de RNAIII. RNAIII conduz à expressão de fatores de virulência como adesinas, toxinas ou exoproteínas. (Givskov *et al*, 2008)

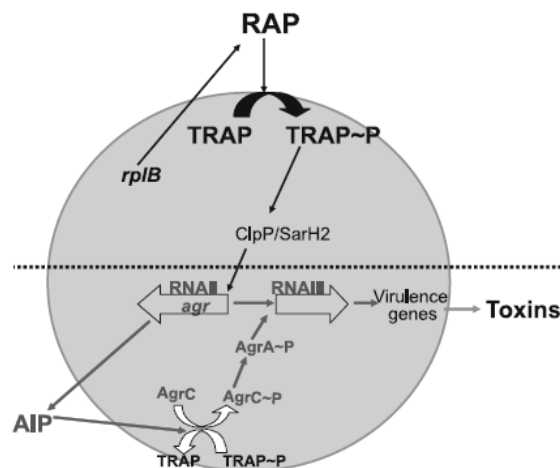


Ilustração 3 - Interação dos sistemas SQS 1 e SQS 2 para a produção de toxinas. (adaptado de Givskov *et al*, 2008).

### 3- Outros sistemas de QS:

Existem algumas bactérias que não são capazes de sintetizar as moléculas sinalizadoras mas identificam e respondem às que são produzidas por outras bactérias. O objetivo é adquirir vantagens adaptativas em relação ao meio como o acesso a nichos de bactérias ou melhorar o seu desempenho na competição com outros microrganismos. Por exemplo, *Escherichia coli* tem um gene homólogo do gene LuxR, o SdiA (Van Houdt *et al*, 2006); *Burkholderia cepacia* em pacientes com fibrose cística tem a capacidade de responder aos sinais de QS produzidos por *P. aeruginosa* (Riedel *et al*, 2001); o processo de QS em *Candida albicans*, um fungo patogénico eucariótico, conduz à produção de farnesol que é um composto essencial na passagem deste fungo da forma de levedura para a forma filamentosa. Esta forma adaptativa confere a *C. albicans* um aumento do potencial patogénico. (Hornby *et al*, 2001)

#### **IV. Utilização de QS pelos microrganismos.**

Os microrganismos coordenam a sua virulência com o objetivo de escapar ao sistema imunológico do hospedeiro e estabelecer uma infeção com sucesso. O mecanismo de QS permite a agregação de bactérias em biofilmes capazes de resistir à radiação ultra-violeta, à desidratação ou à ação dos antibióticos. (Lal, A., 2009).

A formação do biofilme está diretamente associada a outros processos resultantes do QS como a produção de biosurfactante, de exopolissacáridos e ao swarming (mobilidade bacteriana por meio de flagelos). Estes factos são especialmente verificados nas infeções do trato urinário. (Packiavathy, I., *et al*, 2012)

O swarming é um dos fatores mais importantes para o surgimento de infeções urinárias, iniciando-se pela colonização do trato urinário inferior e seguindo-se a migração ascendente das bactérias. (Packiavathy, I., *et al*, 2012)

O biosurfactante possui propriedades tensioativas, diminuindo assim a tensão superficial do meio o que potencia o swarming e conseqüentemente a formação de biofilmes. (Packiavathy, I *et al*, 2012)

Os exopolissacáridos constituem uma barreira protetora do biofilme impedindo a penetração de muitas moléculas tornando as células no interior resistentes a antibióticos, aos fagócitos ou a anticorpos. Desta forma, quer o sistema imunológico do hospedeiro, quer a antibioterapia, não apresentam argumentos para debelar a infeção instalada. (Packiavathy, I *et al*, 2012)

Até uma determinada concentração, *P. aeruginosa* é capaz de crescer dentro de um organismo hospedeiro sem o prejudicar. Quando as bactérias detetam que se encontram em número suficiente para superarem o sistema imunológico do hospedeiro, tornam-se mais nocivas e formam biofilmes provocando doença. *P. aeruginosa* utiliza o QS para formar biofilmes, promover o swarming e a agregação bacteriana. Esta situação é verificada frequentemente nos pulmões de pacientes com fibrose cística (Lal, A., 2009; Greenberg, E., *et al*, 2008)

A colonização de cateteres (muito utilizados em doentes hemodialisados ou em internamento) por microrganismos, constitui uma situação relativamente frequente. Estes são capazes de aderir ao material do cateter, interagir com o hospedeiro e formar colónias de bactérias que crescem até formarem biofilmes cobertos por exopolissacáridos e por isso, difíceis de eliminar pelo hospedeiro e muitas vezes, resistentes aos antibióticos. Assim, as septicémias associadas ao uso de cateteres podem ocorrer facilmente comprometendo o sucesso do tratamento. Por outro lado, a colonização destes materiais é irreversível pelo que é necessário substituí-lo o que acarreta custos adicionais para o tratamento. (Storti, A., *et al*, 2005)

As feridas crónicas constituem um dos meios onde se formam biofilmes com mais frequência. As bactérias depositam-se na superfície da ferida e se encontrarem as condições adequadas dividem-se. Caso a colonização avance e haja uma invasão de curta distância no hospedeiro, a colonização passa a designar-se por colonização crítica e caracteriza-se por eritema, prurido, inflamação. Neste ponto, a infeção está instalada e as bactérias estão prontas para formar um biofilme capaz de resistir aos antibióticos e às defesas do hospedeiro. (Wolcott, R., 2008).

## V. Inibição do QS.

Devido à problemática que representa o processo de QS para a saúde humana, mais especificamente a formação de biofilmes, foram estudadas e apresentadas algumas teorias com o objetivo interromper o processo. A interrupção do QS tem a designação de *quorum quenching* (QQ). O QQ pode ocorrer por vários mecanismos: diminuição da atividade do recetor da AHL ou da AHL sintetase, inibição da síntese de moléculas sinalizadoras, degradação das AHLs ou mimetização das moléculas sinalizadoras utilizando compostos sintéticos análogos. A degradação das moléculas de AHL tem-se mostrado uma das abordagens mais promissoras. Paralelamente a estes mecanismos, também se tem avaliado o uso de anticorpos e de recetores "decoy" como terapia para a não-infeção. (Dembitsky, V.A., *et al*, 2011; Kaufmann, G.F., *et al*, 2006).

### 1- Detecção de moléculas sinalizadoras:

Devido à elevada variabilidade química das moléculas sinalizadoras, o primeiro passo para a interrupção do processo de QS é identificar qual(ais) a(s) molécula(s) envolvidas. Para tal, utilizam-se diferentes espécies bacterianas que permitem controlar em tempo real os sinais de QS e quantificá-los com elevada sensibilidade. Cada espécie tem a capacidade de detetar determinados sinais químicos. (Someya, N., *et al*, 2009; Teplitski, M., *et al*, 2000).

Estas bactérias ou biossensores, utilizam a fusão do gene promotor regulado pelo QS com o gene a expressar para detetarem as moléculas ativadoras ou inibitórias do processo. Em geral, não conseguem sintetizar as próprias moléculas sinalizadoras, mas respondem às moléculas exógenas e expressam determinado fenótipo característico. (McLean, R., *et al*, 2008).

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é altamente sensível às moléculas com cadeias laterais aciladas de 4 a 6 carbonos e a incapacidade de *C. violaceum* CV026 para responder a AHLs com derivados 3-hidroxi é indicativa de que a *P. fluorescens* poderá estar presente. *E. coli* pSB410 deteta as cadeias laterais aciladas com 6 a 8 carbonos e pSB1075 identifica as AHLs com cadeias laterais de 10-14 carbonos. *Agrobacterium tumefaciens* NT1 é um bom biossensor para AHLs com cadeias laterais muito longas; esta bactéria possui a enzima  $\beta$ -galactosidase que degrada o composto 5-bromo-4-cloro-3-indol  $\beta$ -D-



galactosidase (X-gal) com produção de cor azul. *A. tumefaciens* é capaz de responder a muitas AHLs diferentes mesmo em concentração muito baixa o que constitui uma grande vantagem na utilização deste biossensor. *S. meliloti* Rm41 *sinI::lacZ* (pJNSinR) é sensível a moléculas sinalizadoras com cadeias laterais longas (C16-C20) bem como *C. violaceum* VIR24. (Someya, N., *et al*, 2009).

**Tabela 2:** Alguns biossensores utilizados para detetar as moléculas sinalizadoras de QS. (adaptado de Kalia, V.C., 2013).

<b>Organismo</b>	<b>Sinal de QS detetado</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Referência</b>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> A136 [fusão <i>traI-lacZ</i> (pCF218)(pCF372)]	C6HSL a C14-HSL	Atividade $\beta$ -galactosidase	Fuqua e Winans, 1996
<i>A.tumefaciens</i> NT1 (pDCI41EE33 com os genes fundidos <i>traG::lacZ</i> )	AHLs com 3-oxo-, 3-hidroxi- e cadeias laterais de vários comprimentos não substituídas, C6-C14HSL	Atividade $\beta$ -galactosidase	Shaw <i>et al</i> , 1997
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026-recetor CviR	Vários tipos de AHLs	Produção do pigmento violaceína	McClellan <i>et al</i> , 1997
Plasmídeo de <i>Escherichia coli</i> com a cassette <i>luxCDABE</i> ativada pelo recetor AhyRI' de <i>A. hydrophila</i> (pSB536)	C4HSL	Bioluminescência	Swift <i>et al</i> , 1997
Plasmídeo de <i>E. coli</i> com a cassette <i>luxCDABE</i> ativada pelo recetor AhyR de <i>A. hydrophila</i> (pSB403)	Vários tipos de AHLs	Bioluminescência	Winson <i>et al</i> , 1998
Plasmídeo de <i>E. coli</i> JM109 com a cassette <i>luxCDABE</i> ativada pelo recetor LuxR de <i>Vibrio fischeri</i> (pSB401)	C6HSL	Bioluminescência	Winson <i>et al</i> , 1998
Plasmídeo de <i>E. coli</i> JM109 com a cassette <i>luxCDABE</i> ativada pelo recetor LasR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C12HSL	Bioluminescência	Winson <i>et al</i> , 1998

Plasmídeo de <i>E. coli</i> JM109 com a cassette <i>luxCDABE</i> ativada pelo recetor RhIR de <i>P.aeruginosa</i>	C4HSL	Bioluminescência	Winson <i>et al</i> , 1998
<i>Pseudomonas aurofaciens</i> 30-84I	C6HSL	Produção do antibiótico fenazina	Woods <i>et al</i> , 1997
<i>Pseudomonas putida</i> 117 recetor (pAS-C8)-CepR	C8HSL	Proteína fluorescente verde	Steidle <i>et al</i> , 2001
<i>P. putida</i> IsoF/gfp	3OC12HSL	Fluorescência	Venturi, 2006
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44	C4HSL	Produção de biosurfactante	Lindum, <i>et al</i> 1998
<i>S. liquefaciens</i> PL10 – LuxAB	C4HSL	Bioluminescência	Lindum, <i>et al</i> 1998
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm41 <i>sinI::lacZ</i> (pJNSinR)	C16-C20HSL	Atividade $\beta$ -galactosidase	Llamas <i>et al</i> , 2004
<i>Vibrio harveyi</i> BB170 – recetor LuxP	Ai-2	Bioluminescência	Bassler <i>et al</i> , 1993
<i>V. harveyi</i> BB886 – recetor LuxP	AI-1	Bioluminescência	Bassler <i>et al</i> , 1993

## 2- Critérios para a seleção de moléculas de QSI:

Para que as moléculas de QSI sejam eficazes têm que obedecer a determinados pressupostos: devem ser capazes de reduzir a expressão dos genes regulados pelo QS, ter especificidade para o gene regulador do QS, elevada estabilidade química e resistência à degradação pelo sistema imunológico da hospedeiro e devem apresentar maior comprimento que as moléculas AHL nativas. (Hentzer e Givskov, 2003; Rasmussen e Givskov, 2006; Vattem *et al*, 2007).

Desta forma, as bactérias não serão capazes de oferecer resistência, o que conduz a uma pressão seletiva no tratamento de infeções, com a vantagem de não afetarem a população bacteriana saprófita do local. (Rasmusen, T.B., *et al*, 2005).

### 3- Tipo de QSI:

#### 3.1. QSI de Origem Natural:

Nos ecossistemas existe uma grande variedade de bactérias, as quais cooperam, comunicam e competem entre si. Neste meio, a inibição do QS é realizada por QQ (interrupção da sinalização do QS) com intervenção de uma grande variedade de moléculas.

##### 3.1.1- QSI de origem procariótica:

A produção de enzimas de QQ varia um pouco. As moléculas pequenas que intervêm na biossíntese das AHLs e os péptidos bicíclicos, produzidos pelas bactérias, têm a capacidade de atuar como moléculas de QQ. Existem vários tipos de enzimas com capacidade para degradarem as AHLs:

AHL-acilases: presentes em *Ralstonia sp.* XJ12B e *P. aeruginosa* PAO1 são muito diversificadas e têm em comum apenas 39% da sequência de aminoácidos. (Dong e Zhang, 2005). *Pseudomonas syringae* B728a produz duas acilases, HacA e HacC que degradam eficazmente as AHLs. (Sheperd e Lindow, 2009). *Streptomyces sp.* produz uma enzima altamente específica para AHLs com cadeias acil com 6 ou mais carbonos. *P. aeruginosa* sintetiza uma AHL-acilase que degrada as 3-oxo-C12- HSL mas não as C4-HSL. (Sio, C.F., *et al*, 2006).

AHL-lactonase: pode ser encontrada em várias espécies de *Bacillus spp.* e, neste caso, designa-se por AiiA, partilhando cerca de 90% da sequência de aminoácidos entre as várias espécies. A AHL-lactonase encontrada em *A. tumefaciens* apenas tem em comum com *Arthrobacter sp.* e *K. pneumoniae* 30 a 50% da sequência de aminoácidos, exibindo por isso, uma elevada heterogeneidade. (Dong e Zhang, 2005)

*Bacillus megaterium* produz uma AHL-oxidase capaz de degradar C4HSL e OC12-HSL e uma monooxigenase do citocromo P450 capaz de oxidar a cadeia acil lateral inativando as AHLs. (Chowdhary, P.K., *et al*; Cirou, A., *et al*, 2009). Os genes bpiB são responsáveis

pela inibição da formação do biofilme e três homólogos foram encontrados em *Nitrobacter* sp. subtipo Nb-311A, *Pseudomonas fluorescens* e *Xanthomonas campestris*. (Amara, N., et al, 2011; Schipper, C., et al, 2009).

Um caso isolado é o de *B. thuringiensis* pois não produz AHLs mas possui atividade AHL-lactonase. (Bentley, S.D., et al, 2002). *A. tumefaciens* é capaz de produzir AHL e AHL-lactonase BlaC (AttM) para degradar as moléculas sinalizadoras, contudo, esta enzima não impede o processo de QS mediado por plasmídeo. Esta bactéria, em condições adversas, sintetiza 3OC8HSL que pode sofrer a ação da AttM-lactonase. (Carrier, A., et al, 2004).

Outras bactérias como *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Glaciacola*, *P. aeruginosa*, *Shewanella*, etc, têm a capacidade de produzir e degradar AHLs. Nestes casos, não se verifica a expressão dos genes dependentes do QS enquanto se dá a degradação das moléculas sinalizadoras. (Chan, K-G., et al, 2011).

Péptidos antibióticos: *Streptomyces* sp. Y33-1 produz a siomicina I, que inibe a gelatinase, logo, a biossíntese de gelatina e ativa uma feromona que conduz à destruição do biofilme formado por *Enterococcus faecalis*. A siomicina tem a capacidade de inibir apenas o crescimento das bactérias de Gram-positivo, sem qualquer efeito sobre as de Gram-negativo. *Streptomyces* sp. produz butirolactonas que atuam como análogos das AHLs; em *Hortonia* sp. e *Streptomyces antibioticus* são produzidos intermediários da via metabólica das butirolactonas que inibem o QS de *C. violaceum* CV026. (Martinelli, D., et al, 2004).

As feniletílamidas possuem características que lhe permitem mimetizar a estrutura das AHL, possibilitando assim, a ligação ao recetor destas moléculas sinalizadoras. *Pseudomonas* sp. B13 e *Pseudomonas reinekei* MT1 produzem naturalmente o inibidor «4-metilenebut-2-en-4-olide» (proteoanemonina) que é capaz de limitar os fatores que intervêm no QS de *P. aeruginosa* principalmente aqueles que estão relacionados com a privação de ferro e com as estruturas que se formam nestas condições, pioverdina e piocianina. (Bobadilla Fazzini, R.A., et al, 2012).

Extratos das bactérias *Bacillus horikoshii*, *B. pulmilus* e *Vibrio natrigens* em associação com o coral *Acropora digitifera* revelaram-se bastante eficazes no controlo da formação de biofilmes por *S. pyogenes*, principalmente *Bacillus horikoshii*, que demonstrou esta

potencialidade a uma concentração mais baixa que as outras duas bactérias (50 µg/ ml em contraste com 100 µg/ ml). Outros estudos indicam que *Bacillus indicus*, *B. pulmilus* e *Bacillus sp.* SS4 provenientes da baía de Beagle inibem o QS em bactérias de Gram-negativo, como *P. aeruginosa* PAO1, *Serratia marcescens* e espécies de *Vibrio*. (Musthafa, K.S., *et al*, 2011)

*B. pulmilus* S8-07 produz uma AHL-acilase que degrada a molécula sinalizadora 3OC12HSL. Verificou-se também que *B. pulmilus* S6-17 apresenta um espectro maior de utilização, uma vez que é capaz de inibir a formação de biofilme em bactérias quer de Gram-positivo, quer em Gram-negativo. A molécula quimicamente ativa para o efeito é um derivado de ácido carboxílico, ácido 4-fenilbutanóico. (Nithya, C., *et al*, 2011)

A associação do coral com actinomicetes também se mostrou vantajosa no sentido de diminuir a formação de biofilme em *S. aureus* ATCC 11632, *S. aureus* ATCC 33591 resistente à meticilina e *S.aureus* isolados de amostras biológicas, a uma concentração de 0,1 mg/ml. (Bakkiyaraj, D. e Pandian, S.K., 2010).

Tabela 3: Enzimas bacterianas inibidoras do QS. (adaptado de Kalia, V.C., 2013).

<b>Origem da molécula QSI</b>	<b>Enzima</b>	<b>Sinal de QS degradado</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus sp.</i> estirpe 240B1	Lactonase	AHLs	Dong <i>et al</i> , 2000
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lactonase	AHLs	Lee <i>et al</i> , 2002
<i>Stappia</i> <sup>a</sup> <i>sp.</i> estirpes 5, 176 e 97-1	Lactonase	AHLs	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Oceanobacillus</i> estirpes 30, 172 e 97-2	Lactonase	AHLs	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Halomonas sp.</i> estirpe 33	Lactonase	AHLs	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Tenacibaculum discolor</i> estirpe 20J	Acilase/Lactonase	AHLs	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Hyphamonas sp.</i> DG895	Acilase/Lactonase	C4HSL e 3OC12-HSL	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Alteromonas sp.</i> estirpe 168	Acilase	C4HSL e 3OC12-HSL	Romero <i>et al</i> , 2011
<i>Bacillus magaterium</i>	AHL-oxidase	C4HSL e 3OC12-HSL	Chowdhary <i>et al</i> , 2007; Cirou <i>et al</i> , 2009
<i>Bacillus circulans</i> estirpe 24	Diferente da Lactonase <sup>b</sup>	C4HSL e 3OC12-HSL	Romero <i>et al</i> , 2011

<i>Bacillus pumilus</i> S8-07	AHL-Acilase	3OC12HSL	Nithya <i>et al</i> , 2010
<i>Ralstonia sp.</i> XJ12B	AHL-Acilase	AHLs de cadeia longa	Lin <i>et al</i> , 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	AHL-Acilase	AHLs de cadeia longa	Huang <i>et al</i> , 2003
<i>Rhodococcus erythropolis</i> estirpe W2	AHL-Lactonase	AHLs	Park <i>et al</i> , 2006; Uroz <i>et al</i> , 2008
	Acilase (Amidohidrolase)	AHLs	
	Atividade de oxidoreductase	3-oxo-N-AHLs	
<i>Burkholderia</i> estirpe GC4	AHL-oxidoreductase	3OC6HSL	Chan <i>et al</i> , 2011
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	AHL-Lactonase	AHLs	H.B. Zhang <i>et al</i> , 2002; Zhang <i>et al</i> , 2004; Carlier <i>et al</i> , 2003
<i>Arthrobacter sp.</i> IBN110	AHL-Lactonase	AHLs	Park <i>et al</i> , 2003
<i>Acinetobacter sp.</i> estirpe C1010	Lactonase	AHLs	Kang (BR) <i>et al</i> , 2004

<sup>a</sup> Oficialmente pertence a *Agrobacterium*.

<sup>b</sup> AHLs que não foram recuperadas por acidificação, poderão ser semelhantes a AHL – oxidase de *B. magaterium* (Romero *et al*, 2011).

### 3.1.2. QSI de origem animal:

As interações que se verificam entre um hospedeiro eucariota e bactérias altamente patogênicas, especialmente na presença de moléculas de QS, são muito variadas. Os rins do porco contêm acilase I que se verificou ser capaz de inativar algumas moléculas de QS como C6HSL e 3OC12HSL, mas não C4HSL. Esta enzima tem alguma influência na inibição do biofilme em bactérias como *A. hydrophila* e *Pseudomonas putida*. (Paul, D., *et al*, 2009).

Os animais possuem umas enzimas designadas por PONs (paraoxonases dos mamíferos) que atuam sobre ésteres e lactonas, hidrolisando-os. As PON-lactases diferem das lactases dos seres procarióticos porque lhes falta o motivo HCDH~H~D e também porque necessitam de íões cálcio para exercerem a sua função. (Billecke, S., *et al*, 2000).

As células epiteliais dos humanos têm a capacidade de degradar algumas das AHLs produzidas por *P. aeruginosa*, dependendo do comprimento da cadeia acil, portanto,

degradam 3OC12HSL mas não C4HSL. (Chung, C.K., *et al*, 2004). Alguns estudos revelaram a decomposição da molécula 3OC12HSL no soro de alguns mamíferos testados como, bovinos, cabras, cavalos, ratos e coelhos. (Yang, F., *et al*, 2005).

Foi demonstrado que determinadas comidas como rissóis de peru, peito de frango ou queijos caseiros apresentam 84,4-99,8% de inibição da atividade de AI-2. Também, os ácidos gordos de cadeia longa da carne de aves possuem um efeito inibitório que ronda os 25-99% da atividade da mesma molécula sinalizadora na bactéria *V. harveyi* BB170. (Lu, L.G., *et al*, 2004; Widmer, K.W., *et al*, 2007).

### 3.1.3- QSI de origem vegetal:

Os extratos vegetais podem ser utilizados como QSI devido às semelhanças estruturais que apresentam com os sinais de QS e também porque são capazes de degradar os recetores das moléculas sinalizadores (LuxR/LasR). O GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) produzido pelas plantas é capaz de promover a degradação das AHLs pela lactonase AttM de *A. tumefaciens*, diminuindo o processo infeccioso, exceto em condições adversas (quando a salinidade e humidade do meio não são adequadas, há a produção de prolina que antagoniza o processo onde o GABA intervém). (Haudecoeur, E., *et al*, 2009).

Algumas plantas medicinais como *Embllica officinalis*, produz pirogalol que tem ação antagonista de AI-2. (Ni, N., *et al*, 2008). L-canavanina, presente no exsudado de *M. sativa* interfere na produção de exopolissacáridos, por afetação da fixação de nitrogénio em *S. melioli*. (Gonzalez e Keshavan, 2006). *Medicago truncatula* modula a atividade de AhvR, CviR e LuxR em vários microrganismos e intervém no mecanismo de QS de *P. aeruginosa* e *S. melioli*. (Mathesius, U., *et al*, 2003). Os genes de virulência de *P. aeruginosa* PAO1 podem ser inibidos pela curcumina produzida por *curcuma longa*. O composto cinamaldeído e seus derivados intervêm em vários processos regulados pelo QS como a formação de biofilmes em *P. aeruginosa* e o QS mediado por AI-2 em *Vibrio spp.* (Brackman, G., *et al*, 2008).

Na toranja ocorrem naturalmente uns compostos designados por furocumarinas que podem inibir a atividade de AI-1 e AI-2 em *V. harveyi* estirpes BB886 e BB170 e a

formação de biofilme em *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*. As furocumarinas purificadas conduzem a uma inibição na ordem dos 94,6- 97,7% dos AI. (Girenavar, B., *et al*, 2008). As sementes da laranja azeda possuem limonóides, compostos químicos com capacidade de inibir mais que 90% da atividade do AI-2 em *V. harveyi* à concentração de 100 µg/ml, bem como, inibem a atividade de HAI e AI-2 que leva à bioluminescência. As furocumarinas e limonóides partilham uma parte da sua estrutura química com a furanonas sintéticas que têm ação inibitória do QS. (Löon-Stensrud, J., *et al*, 2007).

Os flavonoides existentes em algumas plantas possuem várias características que os tornam interessantes e constante objeto de estudo na investigação científica. Entre os seus atributos enquadram-se uma ação anti-oxidante, anti-inflamatória, inibidores da proliferação celular ou inibidores do mecanismo de QS. Como QSI, destacam-se os flavonoides naringenina, kaempferol, quercetina e apigenina que inibem as moléculas HAI-1 ou AI-2 intervenientes nos processos de bioluminescência de *V. harveyi* BB120 e MM32. Mais especificamente, observou-se que a quercetina e a naringenina conseguem inibir a formação de biofilme por parte de *V. harveyi* BB120 e *E. coli* O157:H7. (Vikram, A., *et al*, 2010).

Extratos de plantas como *Combretam albiflorum*, *Laurus nobilis* e *Sonchus oleraceus* mostraram possuir atividade inibitória do QS. A casca de *Combretam albiflorum* possui uma catequina (flavan-3-ol) que diminui a produção de piocianina, elastase e a formação de biofilme em *P.aeruginosa* PAO1. (Vandeputte, O.M., *et al*, 2010).

Alguns QSI foram encontrados em vegetais como o alho, plantas medicinais, componentes da dieta ou raízes de *Areca catechu* e *Panax notoginseng*. (Koh e Tham, 2011). Extratos de *Scorzonera sandrasica* revelaram-se eficazes a inibir a produção de violaceína por *C. violaceum*. A avaliação do caule subterrâneo de *Imperata cylindrical*, das folhas de *Nelumbo nucífera*, da planta completa *Prunella vulagris* e da casca de *Punica granatum*, revelou atividade inibitória do QS em *C. violaceum* CV026 mas não em *P.aeruginosa* PAO1. (Koh e Tham, 2011).

Foram identificadas vários legumes com capacidade para degradar as moléculas de AHL, como, alfalfa (*Medicago sativa*), trevo, lótus, ervilha e feijão. Pensa-se que exercem a sua



ação por meio de uma enzima semelhante à lactonase, contudo, o mecanismo de degradação não está bem esclarecido. (Chai, Y., *et al*, 2007).

*Arabidopsis* produz um exsudado que interfere na sinalização do QS em *A. tumefaciens*. (Chai, Y., *et al*, 2007). Também produz umas enzimas que hidrolisam os ácidos gordos e estão relacionadas com a degradação de AHLs principalmente nas plantas mutantes que expressam aquelas enzimas em grande quantidade, logo, são mais resistentes às mudanças que ocorrem nas AHLs. (Ortiz-Castro, R., *et al*, 2008).

A planta do chá produz catequinas que interferem no processo de transferência do plasmídeo conjugado R em *E. coli*. (Zhao, W.H., *et al*, 2001). Nesta bactéria, a formação do biofilme pode também ser interrompida pelas furocumarinas do sumo da toranja e em *P. aeruginosa* pelo ácido rosmarínico produzido pelas raízes da espécie *Ocimum basilicum*. (Walker, T.S., *et al*, 2004).

Algumas plantas, produzem metabolitos secundários dos fenóis como o ácido salicílico, que se mostraram eficazes a estimular a produção de AHL-lactonase. A inibição da formação do biofilme foi conseguida também pela ação de um outro composto, o ácido ursólico identificado em mais de 13000 amostras de compostos purificados de várias partes da plantas ou mesmo na planta completa. Este ácido, com uma concentração de 10 µg/ml levou à diminuição da formação do biofilme em cerca de 79% em *E. coli* e 57-95% em *V. harveyi* e *P. aeruginosa* PAO1 de acordo com o meio de cultura utilizado. Verificou-se também no mesmo estudo que o ácido ursólico não possui qualquer tipo de atividade sobre QS em *V. harveyi* mediado por AI-1 e AI-2. (Ren, D., *et al*, 2005).

Nos extratos de algumas plantas comestíveis como *Ananas comosus*, *Musa paradisiaca*, *Manilkara zapota* e *Ocimum sanctum*, foram identificados moléculas QSI para a produção de violaceína por *C. violaceum* e também para a produção de piocianina, proteases estafilolíticas, elastases e formação de biofilme em *P. aeruginosa* PAO1. O óleo essencial de *Satureja thymbra*, demonstrou ter a capacidade de diminuir a formação do biofilme em *Salmonella*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Lactobacillus spp.* (Al- Shuneigat, J., *et al*, 2005; Chorianopoulos, N.G., *et al*, 2008).

A interrupção do processo de QS em *Staphylococcus spp.*, apresenta mecanismos diferentes dos mencionados até aqui. O QS nestas bactérias baseia-se na proteína ativadora AI RNAlII (RAP) e no seu local-alvo (TRAP). A virulência destas bactérias pode ser atenuada se se utilizar um péptido inibidor da RNA-III (RIP) ou uma molécula sem origem proteica análogo do RIP (hamamelitanina). Esta foi identificada na casca de *Hammamelis virginiana* (hamamélis) e, *in vitro*, mostrou não ter eficácia sobre o crescimento de *Staphylococcus spp.*, mas sim sobre a molécula reguladora de QS RNAlI, impedido a formação do biofilme e a fixação das células bacterianas. Estudos com implantação de enxertos embebidos em hamamelitanina em animais, revelaram uma diminuição bastante significativa do número de bactérias em comparação com os controlos. (Kiran, M.D., *et al*, 2008).

**Tabela 4:** Inibidores do QS de origem eucariótica. (adaptado de Kalia, V.C., 2013).

Origem do QSI	Efetivo contra		Referência
	Organismo	Atividade mediada pelo QS	
<u>Algas</u>			
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i> (algas vermelhas coreanas): $\alpha$ -D-galactopiranosil- ▶(1 2)-glicerol ( <b>floridoside</b> ), <b>betonicine</b> e ácido isoetiónico	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Mediado por AHL	Kim <i>et al</i> , 2007
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , algas verdes unicelulares: não se identificou qual a AHL que mimetiza	<i>Escherichia coli</i> (LasRI:: <i>luxCDABE</i> )	Bioluminescência	Teplitski <i>et al</i> , 2004
<i>Delisea pulchra</i> (macroalga australiana): furanona halogenada	<i>E. coli</i>	Formação de biofilme e swarming	Ren <i>et al</i> , 2001
		Sinalização por AI-2 (quimiotaxia, mobilidade de síntese de flagelo)	Ren <i>et al</i> , 2004
	<i>Proteus mirabilis</i>	Swarming	Gram <i>et al</i> , 1996
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Formação de biofilme	de Neys <i>et al</i> , 1993
	<i>Serratia liquefaciens</i>	Swarming	Givskov <i>et al</i> , 1996
	<i>Vibrio fischeri</i>	Bioluminescência	Givskov <i>et al</i> , 1996
	<i>Vibrio harveyi</i>	Produção de toxinas e luminescência	Manefield <i>et al</i> , 2000
	Formação de biofilme	de Neys <i>et al</i> , 1993	

<i>Laminaria digitata</i> (alga castanha): HOBr oxidado	<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	Reage especificamente com HSLs 3-oxo-acil	Borchardt <i>et al</i> , 2001
<u>Fungos</u>			
<i>Tremella fuciformis</i>	<i>C. violaceum</i>	Produção de violaceína	Zhu e Sun, 2008
<i>Auricularia auricular</i> : pigmentos naturais	<i>C. violaceum</i>	Produção de violaceína	Zhu e Sun, 2011
Penicillium: ácidos penicílico e “patulin”	<i>P. aeruginosa</i>	Biofilme	Rasmussen <i>et al</i> , 2005b
<u>Plantas</u>			
Extrato de <i>Allium sativum</i> (alho)	<i>A. tumefaciens</i> estirpe NTL4	$\beta$ -galactosidase	Bodini <i>et al</i> , 2009
	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Bodini <i>et al</i> , 2009
	<i>P. aeruginosa</i>	Alginato e elastase	Rasmussen <i>et al</i> , 2005a
		Formação de biofilme	Bjarnsholt <i>et al</i> , 2005a Rasmussen <i>et al</i> , 2005 <sup>a</sup>
	<i>P. aeruginosa</i> estirpe Iso/gfp	Fluorescência	Bjarnsholt <i>et al</i> , 2005a Persson <i>et al</i> , 2005a Bodini <i>et al</i> , 2009
<i>Alyssum maritimum</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CV0blu	Inibição fraca	Karamanoli e Lindow <i>et al</i> , 2006
<i>Ananas comosus</i>	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Musthafa <i>et al</i> , 2010
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Piocianina (pigmento), protease esfatilocócica, produção de elastase e formação de biofilme	
Exsudado de <i>Arabidopsis</i> : $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB)	<i>A. tumefaciens</i>	Sinalização por AHL	Chai <i>et al</i> , 2007
Extrato de mirtilo	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Vattem <i>et al</i> , 2007
<i>Brassica napus</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CV0blu	Inibição fraca	Karamanoli e Lindow <i>et al</i> , 2006
Extratos de <i>Brassica oleracea</i> , manjeriço, alecrim, gengibre e curcuma	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Vattem <i>et al</i> , 2007
<i>Camellia sinensis</i> (chá): catequinas	<i>E.coli</i>	Transferência do plasmídeo R conjugado	Zhao <i>et al</i> , 2001
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	<i>P. aeruginosa</i>	Formação de biofilme	Niu e Gilbert, 2004
	<i>E. coli</i>		
	<i>V. harveyi</i>	QS por AHL e AI-2	Niu <i>et al</i> , 2006

Cinamaldeído e derivados: 4-NO <sub>2</sub> -cinamaldeído	<i>Vibrio spp.</i>	QS mediado por AI-2 (bioluminescência, formação de pigmento e atividade de protease)	Brackman <i>et al</i> , 2008
<i>Combretam albiflorum</i> : flavonoide catequina da casca	<i>P. aeruginosa</i>	Recetor RhIR que deteta C4-HSL	Schaefer <i>et al</i> , 2008
Coroa da ervilha	<i>C.violaceum</i> CV026	Produção de violaceína	Teplitski <i>et al</i> , 2004
Extratos de uva	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Vattern <i>et al</i> , 2007
Sumo de toranja (furocumarinas)	<i>E.coli</i>	Formação de Biofilme	Girenavar <i>et al</i> , 2008
	<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>Salmonella typhimurium</i>		
<i>Lotus corniculatus</i>	<i>A. tumefaciens</i> NTLR4	Beta-galactosidase	Delalande <i>et al</i> , 2005
	<i>C.violaceum</i> CV026	Produção de violaceína	Delalande <i>et al</i> , 2005
<i>Manilkara zapota</i>	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Mushtafa <i>et al</i> , 2010
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Piocianina (pigmento), protease esfaticlocócica, produção de elastase e formação de biofilme	
<i>Musa paradisiaca</i>	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Mushtafa <i>et al</i> , 2010
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Piocianina (pigmento), protease esfaticlocócica, produção de elastase e formação de biofilme	
<i>Medicago sativa</i> (sementes com L-canavanina, um análogo da arginina)	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Keshavan <i>et al</i> , 2005
	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Exopolissacárido II (EPS II)	Keshavan <i>et al</i> , 2005
<i>Medicago truncatula</i> (frações 8-12 e 21-24 da plântula)	<i>E.coli</i>	Gene LuxR	Gao <i>et al</i> , 2003
		Gene AhyR	Gao <i>et al</i> , 2003
	<i>C.violaceum</i>	Gene CviR	Gao <i>et al</i> , 2003
<i>M. truncatula</i>	<i>P. aeruginosa</i>	QS em geral	Mathesius <i>et al</i> , 2003
	<i>Salmonella enterica</i>	Gene LuxR para sinais AI-2	Mathesius <i>et al</i> , 2003
	<i>S. meliloti</i> 1021	QS em geral	Mathesius <i>et al</i> , 2003
<i>Ocimum basilicum</i> (manjeriço): ácido rosmarínico	<i>P. aeruginosa</i>	Produção de protease e elastase e formação de biofilme	Walker <i>et al</i> , 2004

<i>Ocimum sanctum</i>	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Mushtafa <i>et al</i> , 2010
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Piocianina (pigmento), protease esfatilocócica, produção de elastase e formação de biofilme	
<i>Passiflora incarnate</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CV0blu	Produção de violaceína	Karamanoli e Lindow, 2006
<i>Pisum sativum</i>	<i>C.violaceum</i> CV026	Protease induzida pela HSL-C4	Teplitski <i>et al</i> , 2004
		N-acetilglucosaminidase (exocitinase) e produção de violaceína	Teplitski <i>et al</i> , 2004; Gonzalez e Keshavan, 2006; Fatima <i>et al</i> , 2010
	<i>S. liquefaciens</i> MG1	Swarming	Teplitski <i>et al</i> , 2004
<i>P. sativum</i> (raízes)	<i>C.violaceum</i> CVblu	Produção de violaceína	Karamanoli e Lindow, 2006
<i>P. sativum</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CVblu	Inibição fraca	Karamanoli e Lindow, 2006
Extrato de mirtilo	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Vattern, <i>et al</i> , 2007
<i>Romneya trichoclyx</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CVblu	Inibição fraca	Karamanoli e Lindow, 2006
<i>Ruta graveolens</i> (folha)	<i>C.violaceum</i> CVblu	Inibição fraca	Karamanoli e Lindow, 2006
Extrato de <i>Scorzonera sandrasica</i>	<i>C.violaceum</i> ATCC12472 e CV026	Produção de violaceína	Bosgelmez-Tinaz <i>et al</i> , 2007
	<i>Erwinia caratovora</i>	Produção de antibióticos carbapenemos	Bosgelmez-Tinaz <i>et al</i> , 2007
Exsudate: $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB)	<i>A. tumefaciens</i>	Sinalização por AHL	Chai <i>et al</i> , 2007
Exsudado de tomate: $\gamma$ -hidroxibutirato (GHB)	<i>A. tumefaciens</i>	Sinalização por AHL	Chai <i>et al</i> , 2007
Extrato de <i>vanilla planifolia</i>	<i>C.violaceum</i> CV026	Produção de violaceína	Choo <i>et al</i> , 2006
Extratos de plantas medicinais: folha de <i>Conocarpus erectus</i> , partes aéreas de <i>Chamaecybe hypericifolia</i> , folha de <i>Callistemon viminalis</i> , folha de <i>Bucida buccera</i> , folha de <i>Tetrazygia bicolor</i> , folha de <i>Quercus virginiana</i>	<i>C.violaceum</i>	Produção de violaceína	Adonizio <i>et al</i> , 2006
	<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	Beta-galactosidase	Adonizio <i>et al</i> , 2006
Extratos de plantas	<i>P. aeruginosa</i>	Produção de elastase,	Adonizio <i>et al</i> , 2006

medicinais: folha de <i>C. erectus</i> , folha de <i>C. viminalis</i> , folha de <i>B. buceras</i>		pioverdina e protease e formação de biofilme	
Medicina Tradicional Chinesa	<i>A. tumefaciens</i>	Inibidor do TraR	Zeng <i>et al</i> , 2008
	<i>P. aeruginosa</i>	Formação de biofilme	Zeng <i>et al</i> , 2008
Casca de <i>Combretum albiflorum</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Formação de biofilme e elastase	Vandeputte <i>et al</i> , 2010
Metabolitos secundários			
Ácido p-cumarínico (composto fenólico precursor da lenhina)	<i>C.violaceum</i> 5999	Produção de violaceína	Bodini <i>et al</i> , 2009
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Produção do antibiótico ácido fenazine-1-carboxílico (PCA)	Bodini <i>et al</i> , 2009
	<i>A. tumefaciens</i>	Beta-galactosidase	Bodini <i>et al</i> , 2009
Ácido salicílico (metabolito secundário fenólico de plantas)	<i>A. tumefaciens</i>	Estimula a expressão de AHL-lactonase	Yuan <i>et al</i> , 2007
Vanilina	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Formação de biofilme	Choo <i>et al</i> , 2006 Ponnusamy <i>et al</i> , 2009
<i>Luffariella variabilis</i> (“manolide and secmanoalide monoacetate”)	<i>E.coli</i> (LuxR de <i>V. fischeri</i> )	Beta-galactosidase e trazolium	Skindersoe <i>et al</i> ,
	<i>P. aeruginosa</i>		
Animal			
Paraoxonases dos mamíferos	<i>P. aeruginosa</i>	Diminuição da atividade dependente de 3OC12HSL	Teiber <i>et al</i> , 2008

### 3.1.4- QSI baseado em organismos marinhos:

Foram realizados alguns estudos no sentido de averiguar o potencial dos organismos marinhos como fonte de moléculas inibitórias do processo de QS. Verificou-se a existência de moléculas com atividade QSI, bem como a presença de genes de QQ. O organismo *Delisea pulchra* tem a capacidade de produzir furanonas halogenadas semelhantes às AHLs que se ligam ao recetor LuxR, levando rapidamente à desativação do mesmo e assim, interrompe-se o processo. (Ren, D., *et al*, 2004). À semelhança deste organismo, também *Chlamydomonas reinhardtii* mimetiza as moléculas sinalizadoras bacterianas comprometendo o QS. (Teplitski, M., *et al*, 2004). A alga *Laminaria digitata* é capaz de oxidar a molécula 3OC6HSL por meio de uma enzima designada bromoperoxidase. (Borchardt, S.A., *et al*, 2001).

Ao longo da costa da Austrália, recolheram-se 284 extratos de organismos marinhos entre 1 a 10 metros de profundidade e concluiu-se que 64 eram ativos em relação a um derivado do LuxR, o QSIS1. A esponja marinha *Luffariela variabilis* mostrou-se ativa contra QSIS2 de *P. aeruginosa*. Existem no ecossistema marinho alguns seres como as cianobactérias com capacidade de inibir a expressão de genes de QS. Assim, verificou-se que o organismo *Lyngbya majuscula* produz simultaneamente “malingolide acid” que inibe a produção de violaceína em *C. violaceum* e “lyngbyoic acid” que compromete a produção de elastase e piocianina em *P. aeruginosa*. Para além destes compostos, *Lyngbya majuscula* também sintetiza malingamida C e 8-epi-malingamida que inibe outros processos mediados pelo QS em *P. aeruginosa*. (Kwan, J.C., *et al*, 2010)

### 3.1.5- QSI de origem fúngica:

Para além da produção de antibióticos (nomeadamente penicilina) como metabolito secundário, verificou-se que algumas estirpes de *Penicillium spp.* também tinham a capacidade de sintetizar compostos que atuam como QSI: ácido penicílico e “patulin”. Para tal, utilizou-se como modelo ratos com infeção pulmonar por *P. aeruginosa*, verificando-se a melhoria dos animais quando se administrava “patulin”. (Rasmussen, T.B., *et al*, 2005b).

A associação de fungos com plantas pertencentes a *Ascomycota* e *Basidiomycota* revelou-se interessante pois consegue degradar C6HSL e 3OC6HSL via lactonase. (Uroz e Heinonsalo, 2008).

A produção de violaceína por *C. violaceum* pode também ser inibida pelos pigmentos naturais de *Auricularia auricular*. (Zhu, Z., *et al*, 2011).

### 3.1.6- QSI baseado em anticorpos:

Quando existe uma molécula estranha no organismo, o sistema imunológico do hospedeiro produz anticorpos na tentativa de a neutralizar e remover para que não exerça qualquer influência no funcionamento do organismo. Assim, realizaram-se estudos de investigação no sentido de avaliar a possibilidade de se utilizarem anticorpos para interromper o

processo de QS. Inicialmente assumia-se que as moléculas sinalizadoras, por terem baixo peso molecular e serem de origem não-proteica não teriam a capacidade de levar à produção de anticorpos no hospedeiro. Contudo, verificou-se que estas moléculas influenciavam a expressão de mecanismos como a apoptose, entre outros. (Kravchenko, W., *et al*, 2006).

Os estudos iniciais para a produção de anticorpos anti-AHL (designados por RS2-IG9), foram efetuados utilizando uma molécula sintética análoga de 3-oxo-AHL. Verificou-se que havia QQ para 3OC12HSL de *P. aeruginosa* mas não para AHLs com uma cadeia lateral mais curta. (Kaufmann, G.F., *et al*, 2008)

Efetuuou-se um estudo onde se imunizaram ativamente alguns ratos com a proteína conjugada 3OC12HSL – BSA o que levou à formação de anticorpos específicos no soro do animal. Posteriormente expuseram-se os ratos à bactéria *P. aeruginosa* PAO1 numa quantidade de  $3 \times 10^6$  CFU. Ao quarto dia após o contato dos animais com a bactéria, 36% dos ratos imunizados estavam vivos, enquanto que ao final do segundo dia os ratos controlo (expostos à mesma quantidade de bactéria sem imunização ativa prévia) morreram todos. Supõe-se que o mecanismo adjacente a estes resultados está relacionado com a diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro, uma vez que os ratos imunizados apresentavam uma concentração pulmonar de fator tumoral de necrose (TNF- $\alpha$ ) mais baixa em comparação com os controlos. (Miyairi, S., *et al*, 2006).

### 3.2- QS de Origem Sintética:

A utilização de moléculas inibidoras do QS é de facto um método bastante interessante no que diz respeito ao combate a infeções causados por mecanismos que se multiplicam por processos inerente ao QS. Como explicitado anteriormente, existe uma enorme variedade de fontes e moléculas com efeito inibitório do referido mecanismo, no entanto, o uso restrito das moléculas disponíveis na natureza pode ser insuficiente face às necessidades. A baixa concentração de moléculas inibitórias e as reações tóxicas que poderão ocorrer, são as maiores limitações do QSI natural. Assim, surgiu a necessidade de sintetizar quimicamente compostos para o mesmo efeito. Para além do evidente interesse comercial na produção de moléculas análogas às do QS, QSI e sua interação com genes reguladores



da transcrição, estas moléculas antagonistas são raras. A síntese química foca-se na produção de moléculas que atuam na via metabólica da produção de moléculas sinalizadoras, na substituição de sinais, alterações no comprimento da cadeia lateral, entre outros.

### 3.2.1- Síntese de moléculas sinalizadoras:

Estudos realizados em *P. aeruginosa*, permitiram produzir compostos semelhantes àqueles que intervêm na síntese de moléculas de QS. Assim, a condensação de antranilato com ácidos gordos  $\beta$ -ceto, como o ácido  $\beta$ -cetodecanóico leva à produção de metabolitos secundários como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, uma molécula sinalizadora (quinolona) existente em *P. aeruginosa*. O metil-antranilato (análogo do antranilato) mostrou-se eficaz na inibição da produção de quinolonas e redução da síntese de elastase sem afetar o crescimento de *P. aeruginosa* PAO1. (Calfée, M.W., *et al*, 2001).

### 3.2.2- Modificações na cadeia lateral das AHLs:

A funcionalidade das moléculas sinalizadoras está dependente da sua estrutura química, geometria e quiralidade. As AHLs existentes na natureza têm isomeria L e não possuem ligações insaturadas, pelo que os D-isómeros são desprovidos de atividade biológica. Assim, a junção de uma insaturação perto da ligação amida impede a ligação da molécula ao recetor. (Zhu, J., *et al*, 1998).

O comprimento da cadeia lateral também tem uma influência significativa na ação, uma vez que a adição de um grupo metileno leva à diminuição da atividade molecular em cerca de 50%, enquanto que a adição de dois grupos metileno conduz a uma perda de atividade na ordem dos 90%. Assume-se, portanto, que as moléculas que apresentam uma cadeia lateral maior que a molécula nativa são os inibidores mais eficazes no que diz respeito ao comprimento da cadeia lateral. ((Hentzer e Givskov, 2003).

A. *tumefaciens*, produz a molécula 3OC8-HSL e a substituição do grupo carbonilo por um grupo metileno na posição 3 da cadeia lateral, leva ao surgimento de uma molécula antagonista com atividade semelhante. (Zhu, J., *et al*, 1998).

A bioluminescência de *V. fischeri* pode ser inibida de vários modos: quando existem várias substituições no carbono 4 das cadeias laterais das moléculas 3OC6HSL ou C6HSL (Zhu, J., *et al*, 1998); o processo pode também ser interrompido quando se sintetizam análogos de AHLs substituindo um ligação carboxamida por uma sulfonamida. Verificou-se que o aumento da cadeia lateral levava à diminuição da atividade antagonista. Outro dado importante está relacionado com a configuração espacial da molécula, verificando-se que quando o grupo sulfonamida e fenil se encontravam separados por dois carbonos a atividade antagonista era mais eficaz. (Castang, S., *et al*, 2004).

Em *P. aeruginosa* o processo de QS pode ser inibido por moléculas análogas às AHL, as N-acil ciclopentil aminas (Cn-CPA), sendo C10-CPA a mais ativa em relação aos sistemas Las e Rhl (Ishida, T., *et al*, 2007). Já em *S. marcescens* a C9-CPA revelou-se a mais eficaz como QSI (Morohoshi, T., *et al*, 2007). Paralelamente, C6, C7 e C8-CPA pode conduzir à redução em cerca de 90% do mecanismo de QS em *V. fischeri*. As moléculas Cn-CPA, em comparação com as furanonas halogenadas mostraram maior potencial inibitório. (Wang, W., *et al*, 2008).

### 3.2.3- Alterações na estrutura do anel da AHLs:

Alguns estudos revelaram que modificações no anel  $\gamma$ -butirolactona das AHLs influenciam a atividade biológica da molécula. Deste modo, verificou-se que, por exemplo, o análogo lactâmico de AI-3OC12HSL de *P. aeruginosa* levava a uma acentuada redução da sua atividade; alterações nas 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> posições no anel do QSI sintético HSL 3OC8HSL originam estruturas químicas semelhantes a furanonas e portanto, com elevado potencial QSI. Contudo, os isómeros 3-hidroxi *cis* e *trans* apenas se mostraram eficazes a elevadas concentrações, sendo que *cis* foi mais eficaz. (Smith, K.M., *et al*, 2003).

A molécula N-(2-oxociclohexil)-3-oxododecanamina análoga de 3OC12HSL demonstrou poder antagonista do QS em *P. aeruginosa* levando à diminuição na produção de elastase, piocianina e formação de biofilme. (Smith, K.M., *et al*, 2003)

### 3.2.4- Antagonistas dos recetores:

#### 3.2.4.1- Recetores *LuxR*, *LuxO* e *LasR*:

Outra opção para quebrar a cadeia do QS é antagonizar os recetores de moléculas produzidas durante o processo com outras semelhantes mas sem o efeito indutor. Assim, foram produzidas algumas moléculas QSI com este propósito. Por exemplo, os compostos N-ciclopentil-2-heptil, sulfanil-acetamida e N-ciclohexil-2-heptil sulfanil-acetamida por lhes faltar o grupo 1-oxo comportam-se como antagonistas de *LasR*. A substituição nas moléculas sinalizadoras de algumas porções por átomos de enxofre conduziu ao surgimento de outra classe de antagonistas. Entre estes, N-(heptil sulfanil acetil)-L-HSL revelou-se o mais eficiente devido a duas características: possui uma cadeia acil mais curta que 3OC12HSL e o grupo 3'-oxo estar substituído por um átomo de enxofre. Esta substituição conduz a variações nas propriedades estéricas e, por isso, influencia a capacidade da molécula se ligar ao recetor. (Koch, B., *et al*, 2005; Persson, T., *et al* 2005).

As furanona sintéticas também têm a capacidade de inibir o QS ao nível do recetor. Assim, compostos como (Z)-4-bromo-5-(bromometileno)furan-2(5H)-ona e (Z)-5-(bromometileno)furan-2(5H)-ona inibem a formação de biofilme causada por AI-1 nos pulmões de ratos infetados por *P. aeruginosa*. (Wu, H., *et al*, 2004).

As furanonas halogenadas sintéticas Fimbrólida (F1) e N-(sulfanil acetil)-L-HSL inibem o QS porque competem com a molécula sinalizadora 3OC6HSL pela ligação ao recetor. (Koch, B., *et al*, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que a furanona C-30 interfere com a formação de biofilme na superfície dentária por *Streptococcus mutans*, pois é capaz de modificar a expressão de genes associados ao QS, à via metabólica de açúcares e à adesão e formação de biofilmes pelas bactérias. (He, Z., *et al*, 2012). Noutras espécies de *Streptococcus* a furanona C-56 demonstrou-se mais eficaz na inibição do biofilme. (Lönn-Stensrud, J., *et al*. 2007).

A bactéria *Salmonella enterica* é muitas vezes responsável por infeções alimentares devido à formação de biofilmes. Esta situação pode ser contornada com o auxílio das furanonas bromadas (com o elemento químico bromo) pois conseguem interromper o mecanismo de QS em muitas bactérias. Estudos realizados permitiram concluir que a uma CMI de 500

$\mu\text{M}$ , as furanonas sem cadeia alquílica eram tóxicas para *Salmonella*. (Janssens, J.C., *et al*, 2008).

Um estudo efetuado para revelar compostos inibidores do QS em *P. aeruginosa*, revelou que nove das moléculas testadas inibam o processo em mais de 50%, a uma concentração de 20  $\mu\text{M}$  em relação ao sinal 3OC12HSL a 50  $\mu\text{M}$ . Três destes compostos apresentavam algumas semelhanças estruturais, um tiocarbamato ligado a um anel anilina com grupos funcionais diferentes. Este facto ocorre devido à competição entre a molécula sinalizadora e a inibitória pelo mesmo local de ligação, *LasR*. (Borlee, B.R., *et al*, 2010).

Durante a avaliação de determinadas moléculas, verificou-se que três delas tinham potencial antagonista em relação a LuxO de *V. cholerae*. Estes três compostos possuem uma similaridade estrutural entre si, um núcleo 5-tio-6-azauracil e variações na cadeia lateral. O seu mecanismo de ação prende-se com a inibição da atividade da ATPase responsável pela via metabólica do QS, refletindo-se na inibição de fatores de virulência e citotoxicidade em *V. parahaemolyticus* e também na diminuição do potencial patogénico de outras bactérias pertencentes *Vibrio spp.* (Ng, W.L., *et al*, 2012).

#### 3.2.4.2- Recetor *RhlR*:

A furanona C-30 é capaz de inibir a expressão de alguns genes associados à virulência em *P. aeruginosa*, como, gene *lasB* (codifica para a elastase), o *lasA* (codifica para a protease), operão *rhl* AB (codifica para a produção de ramnolípido), entre outros. Contudo, não tem a capacidade de perturbar a transcrição de *lasRI* e *rhlRI*. (Hentzer, M., *et al*, 2003).

Na tentativa de colmatar estas limitações, investigaram-se novas moléculas como o 4-nitro-pyridine-N-oxide (4-NPO) que se ligava preferencialmente a *RhlR*. Este composto diminuía a tolerância do biofilme de *P. aeruginosa* à tobramicina, o que constitui uma evidência muito forte da ação inibitória deste composto sobre a expressão de genes de virulência desta bactéria. (Rasmussen, T.B., *et al*, 2005a)

Os compostos organossulfurados, os sulfóxidos de cisteína com substituição por enxofre, o seu derivado dissulfito e seu produto difenil dissulfito provaram serem bastante eficazes

na inibição da formação de biofilme em *P. aeruginosa* coma a mesma competência que 1mM de 4-NPO. (Cady, N.C., *et al*, 2012).

### 3.2.4.3- Recetor *QscR*:

Para além de *LasR* e *RhIR*, *P. aeruginosa* possui um terceiro recetor de sinais de QS, o *QscR*. As estirpes que possuem mutações nos genes que codificam para este recetor são mais virulentas, o que requer uma nova abordagem para a interrupção da produção de fatores de virulência. (Chugani, S.A., *et al*, 2001).

Três de algumas moléculas AHLs sintéticas ativadores de *QscR* analisadas mostraram inibir a atividade de *LasR* em cerca de 50%. Cinco dessas mesmas moléculas revelaram eficácia na inibição de *QscR* em cerca de 75%. O mesmo estudo mostrou que quatro fenilacetanoil HLs (PHLs) eram menos capazes de antagonizar o *QscR* e uma das PHLs inibia fracamente *LasR* (cerca de 20%). Estas moléculas são muito versáteis podendo atuar como ativadores ou inibidores do recetor *LasR*. (Mattman, M.E., *et al*, 2008).

De mais de 100 furanonas testadas, três apresentaram um efeito inibitório marcado e dose-dependente do recetor *QscR*. O composto F2 inibiu totalmente a atividade do recetor ligada a 3OC12HSL a uma concentração de 50 vezes superior à concentração da molécula sinalizadora. As furanonas com muitos grupos funcionais ou volumosos no anel lactona não mostraram atividade inibitória. Assim, conclui-se que grupos funcionais de volume adequado e lipofilia nas posições R1 e R2 são características importantes para a função inibitória das furanonas. (Liu, H-B., *et al*, 2010).

Tabela 5: Inibidores do QS de origem sintética. (adaptado de Kalia, V.C., 2013).

Origem do QSI	Efetivo contra		Referência
	Organismo	Atividade mediada pelo QS	
<u>Análogos de AHL</u>			
Macrólidos (azitromicina)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Produção de fatores de virulência	Tateda <i>et al</i> , 2001, 2004
Furanil hidrazida	<i>P. aeruginosa</i>	Regulador da transcrição de QS	Persson <i>et al</i> , 2005 <sup>a</sup>
Ciclohexanona	<i>P. aeruginosa</i>	Inativo na ativação de <i>LasR</i> mas ativo contra <i>RhIR</i>	Smith <i>et al</i> , 2003a, b

N-(indol-3-butanol)-L-HSL	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Formação de biofilme	Geske <i>et al</i> , 2005
3-oxo-C12-(2-amino ciclhexanona) substituição aril em AHLs e C8HSL	<i>Vibrio fischeri</i>	Inibição da bioluminescência	Reverchon <i>et al</i> , 2002
	<i>P. aeruginosa</i>	Antagonista de QS <i>in vitro</i> e formação de biofilme	Smith <i>et al</i> , 2003a
Análogo <i>cis</i> ou <i>trans</i> 4-hidroxi do anel de 3OC8HSL	<i>V. fischeri</i>	Ativador potente do QS baseado no recetor <i>LuxR</i>	Olsen <i>et al</i> , 2002
Substituinte carbonilo na posição 3 com metileno (C8HSL)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ativação do recetor <i>TraR</i>	Zhu <i>et al</i> , 1998
Análogo lactâmico de 3OC12HSL	<i>P. aeruginosa</i>	Diminuição marcada da atividade acil-HSL	Passador <i>et al</i> , 1996
N-(heptil-sulfanil acetil)-L-HSL (HepS-AHL)	<i>P. aeruginosa</i>	Inibição dogene regulador da transcrição- <i>LasR</i>	Persson, <i>et al</i> , 2005a
	<i>V. fischeri</i>	Inibição dogene regulador da transcrição- <i>LuxR</i>	
N-(propil-sulfanil acetil)-L-HSL (HepS-AHL) PenS-AHL e N-(heptil-sulfanil acetil)-L-HSL (HepS-AHL)	<i>Pectobacterium</i> A2JM	Atividade da protease	Rasch <i>et al</i> , 2007
N-sulfonil-HSL (com uma cadeia pentil)	<i>V. fischeri</i>	Bioluminescência, antagonismo de <i>LuxR</i>	Castang <i>et al</i> , 2004
4-fenilbutanoil HSL	<i>E. coli</i>	Ligação a OHC6HSL abrangendo <i>LuxR</i>	Geske <i>et al</i> , 2008
	<i>V. fischeri</i>	Antagonista <i>LuxR</i>	Schaefer <i>et al</i> , 1996
3-oxo-C12-(2-aminofenol)	<i>P. aeruginosa</i>	Produção de GFP (proteína verde fluorescente)	Smith <i>et al</i> , 2003a
3-nitro fenilacetanoil HL (C14)	<i>P. aeruginosa</i>	Inibição de <i>LasR</i>	Geske <i>et al</i> , 2008
	<i>A. tumefaciens</i>	Fraca inibição do recetor <i>TraR</i>	
Hexil-4,5-dihidroxi-2,3-pentaedione	<i>V. harveyi</i>	Bioluminescência	Lowery <i>et al</i> , 2009a,b
2-metoxiciclopentil diastereomérico	<i>P. aeruginosa</i>	Agonista com perda de pigmentação	Lee <i>et al</i> , 2008
	<i>Serratia</i> estirpe ATCC 39006	Pigmentação	
<u>Outros</u>			
Furanona F2	<i>P. aeruginosa</i>	3OC12HSL dependente do recetor <i>QscR</i>	Liu <i>et al</i> , 2010
Furanona F3 e F4, som estrutura semelhante a F2 mas com um grupo nitro	<i>P. aeruginosa</i>	Redução significativa da atividade dependente de <i>QscR</i> em 3OC12HSL	Liu <i>et al</i> , 2010

em vez de uma porção amina			
Furanona C30	<i>Vibrio anguillarum</i>	Expressão de fatores de virulência	Rasch <i>et al</i> , 2004
	<i>P. aeruginosa</i>	Expressão de fatores de virulência	Hentzer <i>et al</i> , 2003
Furanonas bromadas	<i>Salmonella enterica</i> serovar	Formação de biofilme	Janssens <i>et al</i> , 2008
	<i>Typhimurium</i>		
	<i>Streptococcus anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> e <i>S. mutants</i>	Bioluminescência e biofilme mediados por AI-2	Lonn-Stensrud <i>et al</i> , 2007
	<i>V. haveyi</i> BB152	Bioluminescência	Lonn-Stensrud <i>et al</i> , 2007
Fimbrólido (F1)	<i>A. tumefaciens</i>	<i>TraR</i> mediado por beta-galactosidase	Kim <i>et al</i> , 2005
Metil antranilate (precursor modificado de PQS)	<i>Pseudomonas sp.</i>	Virulência, elastase	Calfee <i>et al</i> , 2001
4-NPO	<i>P. aeruginosa</i>	Virulência	Rasmussen <i>et al</i> , 2005a
RIP	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	Adesão da bactéria	Balaban <i>et al</i> , 2001
			Dell'Acqua <i>et al</i> , 2004
RWJ-49815e closantel	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Histidina cinase, virulência	Hilliard <i>et al</i> , 1999 Stephenson <i>et al</i> , 2000
AIP-II (trAIP-II)	<i>S. aureus</i> (os quatro grupos)	Recetor AgrC-II, virulência	Lyon <i>et al</i> , 2000
B14, Cmp5 e Cmp9	<i>P. aeruginosa</i>	Inibição de <i>LasR</i>	Geske <i>et al</i> , 2008
			Ahumedo <i>et al</i> , 2010
	<i>A. tumefaciens</i>	Inibição de <i>TraR</i>	Geske <i>et al</i> , 2008
			Ahumedo <i>et al</i> , 2010

### 3.2.5- Sinal *QseC*:

*QseC* é um recetor membranar existente nas bactérias patogénicas que responde à molécula sinalizadora AI-3 e às moléculas endógenas do hospedeiro adrenalina e noradrenalina, levando à produção de fatores de virulência. (Clarke, M.B., *et al*, 2006).

Analisaram várias moléculas orgânicas com o objetivo de se identificarem aquelas com capacidade inibitória de *QseC*. Surgiu o composto designado LED209, que se verificou ser competente a inibir a expressão de genes de virulência sensíveis a AI-3 e adrenalina. Esta molécula provou ser eficaz na eliminação de *E. coli* enterohemorrágica a uma concentração de 5 pM. Para além disso, LED209 também diminui a expressão de genes que codificam

para a toxina Shiga, afetou a expressão de genes de virulência em *S. typhimurium* e em *Francisella tularensis*, em testes *in vitro*. (Rasko, D.A., *et al*, 2008).

Alguns estudos realizados em computador (simulações), permitiram realizar estudos genômicos no sentido de averiguar possíveis antagonistas do QS. Assim, desenharam-se compostos direcionados à interrupção da comunicação na bactéria *Burkholderia spp*. Entre estes compostos, três deles mostraram-se capazes de interferir com a produção de fatores de virulência e formação de biofilme no modelo *C. elegans*. A especificidade destes QSI é de tal modo elevada que se consideraram as moléculas como opção terapêutica para a debelar infecções por *Burkholderia*. (Riedel, K., *et al*, 2006).

### 3.2.6- Modificação no sinal AIP-II

*S. aureus* sintetiza as moléculas sinalizadoras AIP para que regulem o seu mecanismo de QS. Estas moléculas ligam-se ao recetor histidina cinase (RHK) levando à transcrição de vários fatores de virulência. O recetor AgrC-II é também ativado pela molécula AIP-II. Deste modo, moléculas semelhantes às AIP-II são capazes de se ligarem aos recetores mas sem os ativarem, ou seja, não haverá expressão de genes de virulência. (Lyon, G.M., *et al*, 2000).

Por outro lado, a utilização de inibidores da histidina cinase, como, RWJ-49815 e closantel, conduz à rutura da membrana celular e impede a agregação de proteínas. (Hilliard, J.J., *et al*, 1999).

### 3.2.7- Complexos metálicos:

O complexo metálico desferrioxamina-gálio (DFO-Ga) tem a capacidade de interagir com o metabolismo do ferro em *P. aeruginosa* bloqueando a formação do biofilme. Um estudo efetuado demonstrou que a associação deste complexo com gentamicina inibia a formação do biofilme na córnea de ratos infetados com a mesma bactéria. Avaliou-se esta combinação em coelhos e concluiu-se que diminuía a infeção por *Pseudomonas keratitis*. Este sistema apresenta potencial como agente terapêutico desde que as células possuam



uma baixa concentração de ferro como medida de precaução contra infecções e também porque, quer DFO, quer o gálio, podem ser utilizados em humanos. (Banin, E., *et al*, 2008).

### 3.2.8- Outros:

Um dos mecanismos de patogenicidade das bactérias prende-se com a indução da apoptose nas células do sistema imunológico do hospedeiro e controle da produção de compostos pro-inflamatórios, limitando a sua eficácia. A molécula 3OC8HSL tem ação agonista nos recetores  $\alpha$  e  $\beta$  e ação antagonista no recetor  $\gamma$  do peroxissoma proliferador-ativado. Assim, o uso de rosiglitazona como agonista  $\gamma$ , impede o estímulo para a produção de compostos pro-inflamatórios nas células epiteliais dos pulmões, causado por 3OC8HSL. (Jahoor, A., *et al*, 2008).

## VI- Sinergismo entre antibióticos e QSI.

A resistência a antibióticos é um dos maiores problemas de saúde pública que se enfrenta atualmente. A constante e, por vezes, desnecessária exposição aos antibióticos conduz as bactérias não só a desenvolverem novas formas de sobrevivência, como também a transmiti-las a outras, criando sérios problemas no combate às infecções. Os biofilmes conferem uma proteção semelhante, devido à membrana de exopolissacáridos, pois impede que os antibióticos entrem em contato com as bactérias. (Kokare, C.R, *et al*, 2009). Verificou-se que a rutura do biofilme tornava as bactérias mais suscetíveis aos antibióticos e permitia ativar o sistema imunológico do hospedeiro que até ao momento não tinha a capacidade de detetar a presença de células estranhas devido à proteção conferida pelo biofilme. (Bjarnsholt, T., *et al*, 2005).

A patogenicidade causada por *Staphylococcus* diminui quando se utilizaram antibióticos e o péptido inibidor da RNAlIIII simultaneamente. (Giacometti, A., *et al*. 2005). A suscetibilidade de *P. aeruginosa* à tobramicina e à fagocitose por leucócitos polimorfonucleares aumenta quando se utiliza alguns QSI como “patulin”, furanona C30, ácido penicílico ou extratos de alho. (Bjarnsholt, T., *et al*, 2005; Hentzer, M., *et al*, 2003; Rasmussen, T.B., *et al*, 2005a,b). No entanto, estes compostos não assumem grande importância no tratamento de humanos devido a vários fatores como, a instabilidade das

furanonas halogenadas, a toxicidade do ácido penicílico e “patulin” e a baixa concentração do princípio ativo do extrato de alho. (Rasmussen e Givskov, 2006).

No modelo *C. elegans* infetado por *Burkholderia* ou *Pseudomonas*, verificou-se uma taxa de sobrevivência maior quando se aplicou um tratamento conjunto de tobramicina (antibiótico) e baicalina hidratada (QSI). (Brackman, G., *et al*, 2011). Os biofilmes formados por *Burkholderia multivorans*, *B. cenocepacia* e *P. aeruginosa* e tratados com baicalina hidratada ou cinamaldeído não conseguiram garantir a sobrevivência das bactérias no seu interior. (Yang, L., *et al*, 2009).

Também o uso de vancomicina (antibiótico) em associação com hamamelitanina (QSI) induziu a diminuição da população bacteriana que infetava *C. elegans* e *Galleria mellonella* relativamente à utilização isolada de um ou do outro composto. (Brackman, G., *et al*, 2011).

## **VII- Resistência bacteriana aos QSI e alternativas.**

Ao contrário do que se verifica com os antibióticos, assumia-se que a utilização de QSI na terapêutica não exercia pressão seletiva sobre as bactérias, pois geralmente não interferia com o crescimento. Contudo, esta questão não se encontrava completamente esclarecida, pelo que existia a dúvida se os QSI seriam ou não capazes de induzir resistência nas bactérias. (Defoirdt, T., *et al*, 2010). Os estudos efetuados no sentido de averiguar a situação revelaram a existência de espécies de *P. aeruginosa* mutantes, designadas por *mexR* e *nalC*, que demonstraram resistência à furanona bromada C30. A espécie mutante *mexR* foi capaz de exercer patogenicidade em *C. elegans* mesmo na presença de C30. (Maeda, T., *et al*, 2012).

O surgimento de resistências aos QSI e aos antibióticos conduziu à procura de novas alternativas. Assim, foi descoberto que as enzimas desoxiribonuclease I,  $\alpha$ -amilase, alginato liase e diaspersina B possuíam capacidade de degradar moléculas responsáveis pela formação do biofilme, como, os exopolissacáridos e DNA extracelular. Este método revelou-se eficaz na inibição e/ou degradação do biofilme formado por *P. aeruginosa* e *S. aureus*. (Craiggen, B., *et al.*, 2011).

## VIII- Aplicações do QS.

O processo de QS possui particularidades que o tornam interessante do ponto de vista científico e, como tal, alguns investigadores desenvolveram estudos no sentido de averiguar novas abordagens para solucionar alguns problemas associados à proliferação indesejada de microrganismos. Segue-se uma ilustração que traduz de modo muito genérico algumas das utilizações do mecanismo de QS na vida prática:

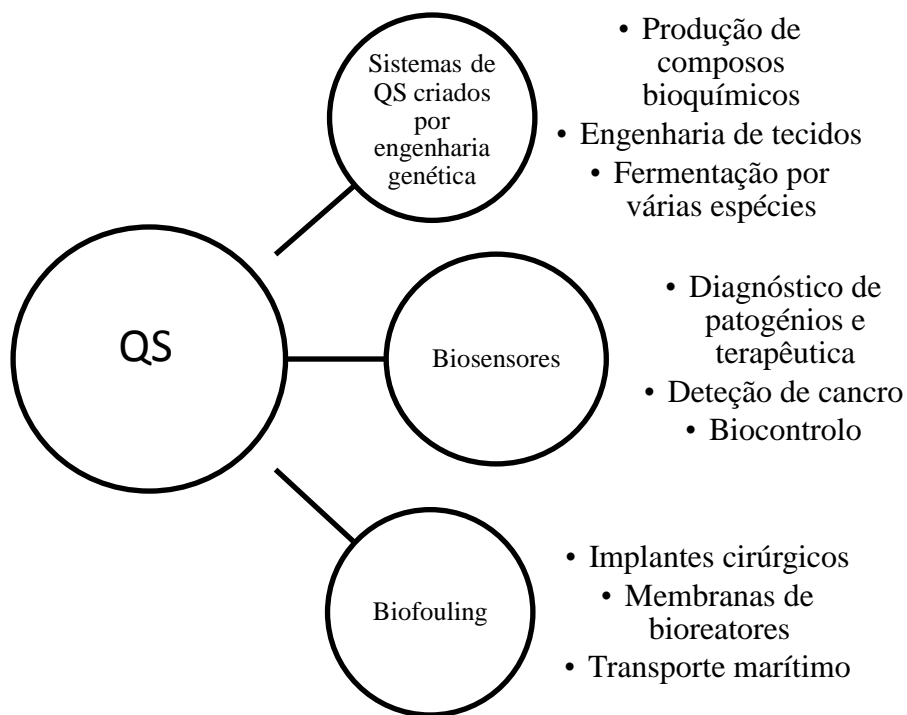


Ilustração 4 - Algumas aplicações do processo de QS (adaptado de Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

De facto, o processo de QS e as respetivas moléculas sinalizadoras e inibidoras podem ser usados em variadíssimas áreas, contudo, irei focar no que diz respeito às suas aplicações clínicas para promoção da saúde humana.

## 1- Aplicações do QS na prática clínica:

### 1.1- Aplicações do QS no diagnóstico e terapêutica:

Para se aplicar o processo de QS nas áreas de diagnóstico e terapêutica, recorre-se aos biossensores, que são bactérias que permitem detetar moléculas sinalizadoras de outras espécies bacterianas. A maioria destes organismos é capaz de reconhecer preferencialmente as AHLs das bactérias de Gram-negativo. Para que cumpra a sua função, um biossensor deverá conter um gene regulador de transcrição ativado pelas moléculas sinalizadoras e um gene promotor que reconheça a ativação do primeiro. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

No entanto, a identificação de bactérias patogénicas baseada na presença de molécula sinalizadoras do QS pode não ser conclusiva para se assumir a sua presença ou ausência, uma vez que existem algumas espécies com mutações nos genes que codificam para aquelas moléculas. Nestes casos o QS apenas se manifesta quando a colonização já está instalada. Assim, a aplicação de biossensores não se deve limitar à deteção de moléculas de QS, mas deve contemplar a sua amplificação através da modificação genética dos biossensores. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

Um exemplo da utilidade destes sistemas prende-se pela deteção da bactéria EHEC (*E. coli* enterohemorrágica) ou *E. coli* O157:H7, agente etiológico de infeções intestinais graves. Calcula-se que EHEC é responsável por cerca de 70000 casos de doença e 60 mortes por ano nos EUA. Os biossensores podem ser criados para reconhecer o antígeno O157 e o flagelo H7. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

Atualmente, estão em desenvolvimento alguns estudos com o objetivo de criar biossensores edíveis como bactérias lácticas para a deteção de agentes patogénicos na flora comensal intestinal. Paralelamente, também se conjectura a possibilidade de utilizar estas bactérias como veículo para transporte de fármacos e vacinas com libertação na mucosa intestinal. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

## 1.2- Aplicações do QS em oncologia:

A área da oncologia constitui um enorme desafio para os investigadores pois o cancro é uma das doenças que causa mais mortalidade e morbidade em todo o mundo. O diagnóstico e tratamento para alguns tipos de cancro são ainda muito limitados. Deste modo, a investigação de novas opções terapêuticas para os doentes oncológicos é uma área em franco desenvolvimento no sentido da superação de obstáculos que surgem constantemente. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

Estudos realizados por Anderson *et al.* mostraram que bactérias modificadas geneticamente podem utilizar a sua densidade celular para controlar a invasão de células tumorais. Os investigadores criaram uma *E. coli* com o gene de *Yersinia pestis* que codifica para uma invasina, cujo processo é coordenado pelo QS de *Vibrio fischeri*. Esta *E. coli* é capaz de se ligar às células dos mamíferos que expressam o recetor de superfície  $\beta 1$ -integrina. Verificou-se que a partir de determinada concentração de AHLs, as invasinas permitem a entrada das *E. coli* em culturas celulares tumorais, o que permite concluir que estas bactérias podem funcionar como biossensores na deteção deste tipo de células. Esta metodologia requer uma boa diferenciação celular entre o tecido tumoral e o tecido saudável, bem como, a garantia que as bactérias não são capazes de desencadear uma resposta imunológica do hospedeiro nem de causar qualquer tipo de dano. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).

### 1.2.1- Justificações para a aplicação de péptidos do QS em oncologia:

Verificou-se que os péptidos agonistas e antagonistas utilizados pelas bactérias no processo de QS apresentavam características que possibilitavam a sua utilização na prevenção, diagnóstico e terapêutica no cancro, tais como: evidências da interação de células eucarióticas com procarióticas através de moléculas sinalizadoras, o fenómeno de apoptose verificado nas bactérias, as semelhanças entre o mecanismo de QS e o processo metastático dos tumores, os múltiplos recetores celulares nas células tumorais para as quais os péptidos têm grande afinidade, a possibilidade de manipular a estrutura química dos péptidos com o objetivo de melhorar a sua ação, as suas reduzidas dimensões que permitem melhor

penetração nas membranas celulares e baixas toxicidade e imunogenicidade. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

Seguem-se mais detalhes acerca das hipóteses que suportam a aplicação de péptidos na área da oncologia:

- 1- Verificou-se que as AHLs são capazes de reconhecer as células eucarióticas e modelar algumas atividades: a molécula 3OC12HSL inibe a secreção de interleucina-12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  pelo sistema imunológico; também se verificou que algumas AHLs têm a capacidade de induzir a vasodilatação. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).
- 2- A morte celular programada, ao contrário do que se conhecia, foi também identificada em células procarióticas bacterianas. Este fenómeno é modulado por um péptido interveniente no QS que se designa por fator extracelular de morte. Em *P. aeruginosa* a molécula 3OC12HSL induz a apoptose em vários tipos celulares de cancro da mama. (Wynendaele, E., *et al*, 2012; Li, L., *et al*, 2004). Esta molécula sinalizadora tem aplicação limitada pois pode induzir virulência principalmente em imunocomprometidos pelo que se poderá optar pela síntese de análogos sintéticos. Apesar destes apresentam a limitação de terem que ser criados através de engenharia genética especificamente para se ligarem a células tumorais, são um bom ponto de partida para investigações futuras. (Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C., 2010).
- 3- Como referido anteriormente, existem muitas semelhanças entre o QS e o processo metastático de determinados tumores, uma vez que as células malignas, como as bacterianas, “vivem” em comunidade, podem apresentar mobilidade, aderem a superfícies, ligam-se e interagem com outras células e formam complexos heterogéneos. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).
- 4- A utilização de péptidos no tratamento oncológico, em vez de compostos orgânicos, pode ser vantajosa uma vez que os péptidos apresentam várias estruturas químicas com diferentes farmacóforos, o que permite estabelecer ligação com vários recetores celulares. Este facto torna-se útil pois as células tumorais são uma

população habitualmente heterogénea e portanto, exibem diferentes recetores em grande escala, relativamente às células normais. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

#### 1.2.2- Mecanismos de ação dos péptidos antitumorais:

Os mecanismos de ação inerentes aos péptidos antitumorais estão poucos esclarecidos, contudo os estudos efetuados até à data revelam grande potencial para a sua utilização. Até à atualidade, estão identificados 15 péptidos passíveis de utilização da terapia anticancerígena e 218 estão a ser avaliados com o mesmo objetivo em mais de 437 projetos. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

Seguem-se alguns mecanismos de ação descritos para a atividade antitumoral dos péptidos:

- 1- Os NIPs (péptidos indutores de necrose) como “cecropins”, melittins” e defensinas promovem a rutura membranar e conduzem à necrose celular. Estas moléculas são pequenas, carregadas positivamente e anfipáticas em oposição à membrana das células tumorais que é carregada negativamente devido à grande expressão de fosfatidilserina e mucinas O-glicosiladas (expressão aumentada em relação às células não tumorais). Estas características tornam as células tumorais altamente seletivas ao “ataque” pelos NIPs. Estes compostos têm também as vantagens de possuírem maior afinidade para os tumores que os quimioterápicos usuais e também serem capazes de exercer a sua ação sobre as células tumorais resistentes à quimioterapia. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).
- 2- O facto de os tumores apresentarem um elevado número de células apoptóticas, constitui outra forma de inibir o seu crescimento por meio da utilização de péptidos, pois a megainina-2, a lactoferricina bovina e os péptidos derivados da catelicidina revelaram ser capazes de induzir a apoptose intrínseca dependente das mitocôndrias. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).
- 3- As capacidades invasivas e metastáticas dos tumores devem-se, em grande parte, à expressão aumentada de enzimas proteolíticas (catepsinas, uroquinase ativadora do plasminogénio, etc). Os péptidos inibidores da protease (PIPs) mostraram-se

eficazes na redução da migração de células tumorais e inibição da angiogénese devido à sua capacidade de se ligar às proteínas que promovem a adesão celular. Também os péptidos de reduzidas dimensões se revelaram interessantes pois são capazes de se conjugar com as cinases, altamente ativas nos processos tumorais, impedindo a sua ligação com o substrato. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

- 4- Por último, um outro mecanismo de ação prende-se com o facto de existirem péptidos com atividade imunoestimulatória, como o dipéptido muramil e análogos que induzem a imunidade inata e adquirida, ativam os macrófagos, as células Natural Killer e os linfócitos T para libertarem moléculas pro-inflamatórias como o interferão  $\gamma$ . Estes para além da referida função, também atuam como PIPs e como inibidores da angiogénese. (Wynendaele, E., *et al*, 2012).

### 1.3- Aplicações do QS nos dispositivos ortopédicos:

Apesar de as intervenções cirúrgicas para implantação de próteses ortopédicas serem precedidas da toma de antibióticos e da esterilização do local da intervenção, as infeções associadas a estes dispositivos constituem um sério problema. Existem várias razões que tornam os biomateriais utilizados suscetíveis à ação de agentes patogénicos: o tecido circundante ao implante protésico é um local imunodeprimido potencialmente colonizável, a dose infecciosa necessária para causar infeção nos tecidos quando estes materiais estão presentes é mais baixa e a forma do implante pode, por um lado, induzir alguns danos no tecido tornando-o mais sensível a invasões bacterianas e, por outro, cria zonas onde as condições para a colonização são favoráveis. (Campoccia, D., *et al*, 2006).

O facto de as bactérias aderirem à superfície da prótese por meio de adesinas, é um dos principais pilares para a formação de biofilmes. Como referido anteriormente, estas estruturas conferem proteção contra a ação dos antibióticos e do sistema imunológico do hospedeiro. Deste modo, quando os biofilmes se instalam a solução é a remoção da prótese o que pode levar ao aumento da morbilidade e mortalidade dos pacientes, bem como dos custos médicos. (Campoccia, D., *et al*, 2006).

Os agentes etiológicos mais frequentemente isolados das próteses ortopédicas pertencem ao género *Staphylococcus sp.*, com principal destaque para *S. aureus* e *S. epidermidis*. As



restantes espécies bacterianas representam cerca de 22% dos casos de colonização dos implantes e geralmente são bactérias saprófitas que apenas causam dano em ambientes imunodeprimidos. A Ilustração 5 mostra dados estatísticos relativos à problemática das infecções relacionadas com dispositivos ortopédicos. (Campoccia, D., *et al*, 2006).

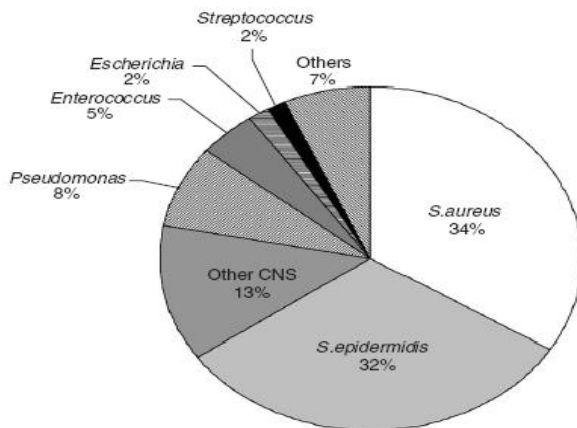


Ilustração 5 - Espécies bacterianas mais frequentemente associadas a infecções relacionadas com próteses ortopédicas. (adaptado de Campoccia, D., *et al*, 2006).

Para impedir a infecção destes implantes, a prevenção é a melhor estratégia a seguir. A interface superfície do biomaterial – tecido circundante representa o maior problema, pois é aqui que as bactérias se depositam. Foram avançadas várias formas de contornar esta questão como, a implantação de próteses revestidas com compostos desinfetantes ou antibióticos bacteriostáticos que são libertados até atingirem uma concentração crítica capaz de impedir a proliferação bacteriana; também se utilizam dispositivos revestidos com substâncias repelentes de bactérias que impedem a sua adesão entre outros. (Campoccia, D., *et al*, 2006).

Em 2004, Dell'Acqua *et al*, propuseram uma nova abordagem baseada também no revestimento das próteses ortopédicas com um composto designado por RIP, um inibidor do processo de QS verificado em *Staphylococcus sp.*, o principal agente etiológico das infecções nos implantes ortopédicos. (Campoccia, D., *et al*, 2006).

#### 1.4- Aplicações do QS no tratamento de feridas crónicas:

As infeções recorrentes de feridas crónicas, constituem uma grande limitação na qualidade de vida dos pacientes. Os diabéticos são um grupo bastante afetado por este tipo de patologias, principalmente nos membros inferiores, devido à elevada concentração de glicose no sangue e também devido à circulação que é deficitária neste grupo de indivíduos. (Wolcott, R., 2008).

Apesar de na última década terem ocorrido avanços científicos notáveis no que diz respeito ao diagnóstico e à terapêutica, a questão do tratamento de infeções crónicas de feridas não sofreu grandes progressos. De facto, o número de amputações de membros inferiores e a mortalidade dos pacientes com esta patologia, não diminui ao longo dos últimos anos, o que acarreta maiores custos para a saúde e, como referido, menor qualidade de vida dos pacientes. (Wolcott, R.,2008).

As feridas tornam-se crónicas quando há persistência de biofilmes bacterianos, resistentes aos antibióticos e aos agentes antissépticos, juntamente com inflamação crónica do tecido e um ambiente proteolítico circundante. Assim, conclui-se que a formação de biofilmes é o principal problema na debelação destas feridas. Neste contexto, estudou-se um caso de um paciente com *diabetes mellitus* que apresentava uma ferida ulcerosa no dedo do pé da qual foram isolados os seguintes microrganismos: MRSA, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter sp.*, *E. coli* e *Enterococcus sp.* do grupo D. Nos seis meses seguintes, o paciente recebeu cuidados intensivos e diários para o tratamento da ferida sem que se verificasse melhoria no seu estado. Realizaram-se exames para apurar se o fluxo sanguíneo seria capaz de proporcionar oxigenação suficiente aos tecidos, o que se verificou ser adequado, mas apesar disso, a ferida não mostrava sinais de remissão, pelo contrário, apresentava uma osteomielite muito avançada. Sete meses após o início da ferida, administrou-se cubicina (antibiótico) intravenosa a 6 mg/Kg e aplicou-se topicamente desinfetantes, durante duas semanas. A situação clínica não se encontrava melhor e foi proposto ao paciente a amputação do membro, opção que foi declinada. Como as opções terapêuticas tradicionais estavam esgotadas, prosseguiu-se para um tratamento experimental inovador. Ao oitavo mês, procedeu-se realização de um gel contendo 1,7 µg/ml de RIP que foi aplicado na ferida infetada. Juntamente com o gel, continuou-se a perfusão da cubicina 4 mg/Kg durante três semanas. No final deste período, a ferida

mostrava sinais claros de melhoria, pelo que se interrompeu a administração do antibiótico e se continuou com a aplicação do gel durante alguns meses. (Wolcott, R.,2008).

Este tratamento, apesar de ainda não ser amplamente utilizado, é claramente um procedimento a considerar e um excelente ponto de partida para investigações futuras no que diz respeito ao tratamento de feridas crónicas. (Wolcott, R.,2008).

## CONCLUSÃO

Os fundamentos relativos ao QS, são uma matéria em constante desenvolvimento e, como tal, merece toda a atenção por parte da comunidade científica devido à sua complexidade e às suas potencialidades.

Na última década foram levadas a cabo inúmeras investigações no sentido de explorar o processo de QS que revelaram resultados muito promissores, com aplicações nas mais variadas áreas: saúde, tratamento de águas, cultivo de plantas, indústrias marítima, alimentar, etc.

No entanto, apesar de os resultados obtidos nas pesquisas serem muito encorajadores, a aplicação do mecanismo na área da saúde ainda não se encontra amplamente difundida, pelo que é necessário continuar as investigações e aprofundar os conhecimentos. É neste sentido que os investigadores desenvolvem o seu trabalho: aperfeiçoar as metodologias para que futuramente possam estar ao serviço de todos.

Relativamente à ortopedia e terapêutica, a interrupção do QS pode revelar-se bastante vantajosa, pois constitui uma alternativa aos antibióticos no tratamento de infeções e assim, permite obviar a problemática associada às resistências e à formação de biofilmes. Deste modo, será possível fornecer serviços de saúde mais eficazes e de menor custo, duas características muito relevantes para os pacientes.

Na oncologia e diagnóstico, o mecanismo de sinalização QS apresenta particularidades interessantes que abrem uma nova janela de oportunidade para os pacientes cujos procedimentos médicos existentes não são suficientes para dar resposta à sua situação. Especialmente na área da oncologia, a utilização de péptidos sinalizadores do QS, mostrou-se francamente interessante como alternativa à quimioterapia tradicional, que tantas vezes não é capaz de cumprir o seu propósito.

## BIBLIOGRAFIA

Al-Shuneigat, J., *et al.* (2005) Effects of a topical essential oil-containing formulation on bio-film-forming coagulase-negative *staphylococci*. In: *Letters in Applied Microbiology*; 41, pp. 52–55.

Amara, N., *et al.* (2011). Macromolecular inhibition of quórum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. In: *Chemical Reviews*; 111, pp. 195–208.

Bakkiyaraj, D. e Pandian, S.K. (2010) *In vitro* and *in vivo* antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. In: *Biofouling*; 26, pp. 711–717.

Banin, E., *et al.* (2008) The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 105 (43), pp. 16761–16766.

Bjarnsholt, T., *et al.* (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leucocytes is quorum-sensing dependent. In: *Microbiology*; 151, pp. 373–383.

Bentley, S.D., *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). In: *Nature*; 417 (6885), pp. 141–147.

Billecke, S., *et al.* (2000) Human sérum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. In: *Drug Metabolism Disposition*; 28 (11), pp. 1335–1341.

Bobadilla Fazzini, R.A., *et al.* (2012) Protoanemonin: a natural quorum sensing inhibitor that selectively activates iron starvation response. In: *Environmental Microbiology*; 15(1), pp. 111-120.

Borchardt, S.A., *et al.* (2001) Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 67(7), pp. 3174–3179.

Borlee, B.R., *et al.* (2010) Identification of synthetic inducers and inhibitors of the Quorum-sensing regulator LasR in *Pseudomonas aeruginosa* by high-throughput screening. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 76 (24), pp. 8255–8258.

Brackman, G., *et al.* (2008) Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio spp.* by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. In: *BMC Microbiology*; pp.135-149.

Brackman, G., *et al.* (2011) Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. In: *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; 55(6), pp. 2655–2661.

Cady, N.C., *et al.* (2012) Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. In: *PLoS One*; 7 (6), pp.1-12.

Calfee, M.W., *et al.* (2001) Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 98(20), pp. 11633–11637.

Campoccia, D., *et al.* (2006) The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. In: *Biomaterials*; 27(11), pp. 2331-2339.

Carrier, A., *et al.* (2004) The assimilation of  $\gamma$ -butyrolactone in *Agrobacterium tumefaciens* C58 interferes with the accumulation of the N-acyl-homoserine lactone signal. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 17(9), pp. 951–957.

Castang, S., *et al.* (2004) N-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 14(20), pp. 5145–5149.

Chai, Y., *et al.* (2007) Reconstitution of the biochemical activities of the AttJ repressor and the AttK, AtI and AttM catabolic enzymes of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Journal of Bacteriology*; 189, pp. 3674–3679.

Chan, K-G, *et al.* (2011) Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quórum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. In: *BMC Microbiology*; pp. 11:51.

Choi, H., *et al.* (2012) Potent inhibitors of inflammation and bacterial quorum sensing: synthetic derivatives and structure – activity relationships. In: *Chemistry & Biology*; 19(5), pp. 589–598.

Chorianopoulos, N.G., *et al.* (2008) Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. In: *Journal of Applied Microbiology*; 104(6), pp. 1586–1596.

Choudhary, S. e Schmidt-Dannert, C. (2010) Applications of quorum sensing in biotechnology. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*; 86(5), pp. 1267-1279.

Chugani, S.A., *et al.* (2001) QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Proceedings of the National Academy of Scienses of the United States of America*; 98(5), pp. 2752–2757.

Chun, C.K., *et al.* (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. In: *Procedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 101(10), pp. 3587–3590.

Clarke, M.B., *et al.* (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 103(27), pp. 10420–10425.

Craigen, B., *et al.* (2011) The use of commercially available alpha-amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms. In: *The Open Microbiology Journal*; 5, pp. 21–31.

Defoirdt, T., *et al.* (2010) Can bacteria evolve resistance to quorumsensing disruption? In: *PLoS Pathogens*; 6(7), pp. 1-6.

Dembitsky, V.A., *et al.* (2011) Natural and synthetic small boroncontaining molecules as potential inhibitors of bacterial and fungal quorum sensing. In: *Chemical Reviews*; 111(1), pp. 209–237.

Dong YH, Zhang LH.(2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. In: *Journal of Microbiology*; 43, pp. 101–109.

Giacometti, A., *et al.* (2005) RNAIII-inhibiting peptide improves efficacy of clinically used antibiotics in a murine model of *staphylococcal* sepsis. In: *Peptides*; 26(2), pp. 169–175.

Girenavar, B., *et al.* (2008) Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. In: *International Journal of Food Microbiology*; 125(2), pp. 204–208.

Givskov, M., *et al.* (2008). Bacterial Cell-to-Cell Communication (Quorum Sensing). In: N. Balaban, *Control of Biofilm Infection by Signal Manipulation*. EUA. Ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 13- 38.

Gonzalez, J.E. e Keshavan, N.D. (2006) Messing with bacterial quorum sensing. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 70(4), pp. 859–875.

Greenber, E., Banin, E. (2008) Ironing out the biofilm problem: the role of iron in biofilm formation. In: *Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation*. Ed.: Spinger. Vol. 2. pp. 141-156.



- Haudecoeur, E., *et al.* (2009) Proline antagonizes GABA-induced quenching of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 106(34): pp. 14587–14592.
- He, Z., *et al.* (2012) Use of the quorum sensing inhibitors furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its luxS mutant strain. In: *Internacional Journal of Antimicrobial Agents*; 40(1), pp. 30–35.
- Henke JM, Bassler BL.(2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. In: *Journal of Bacteriology*; 186(20), pp. 6902–6914.
- Hentzer, M. e Givskov, M. (2003) Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. In: *The Journal of Clinical Investigation*; 112(9), pp. 1300–1307.
- Hentzer, M., *et al.* (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. In: *The EMBO Journal*; 22(15), pp. 3803–3815.
- Higgins DA, *et al.* (2007) The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. In: *Nature*; 450, pp. 883–886.
- Hilliard, J.J., *et al.* (1999) Multiple mechanisms of action for inhibitors of histidine protein kinases from bacterial two-component systems. In: *Antimicrobial Agents Chemotherapy*; 43(7), pp. 1693–1699.
- Hornby JM, *et al.* (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 67(7), pp. 2982–2992.
- Ishida, T., *et al.* (2007) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by Nacyl cyclopentylamides. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 73(10), pp. 3183–3188.
- Jahoor, A., *et al.* (2008) Peroxisome proliferator activated, receptors mediate host cell pro-inflammatory responses to *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. In: *Journal of Bacteriology*; 190(13), pp. 4408–4415.

Janssens, J.C., *et al.* (2008) Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 74(21), pp. 6639–6648.

Kalia, V.C. (2013) *Quorum sensing* inhibitors: an overview. In: *Biotechnology Advances*; 31(2), pp. 224–245.

Kaufmann, G.F., *et al.* (2006) Antibody interference with N-acyl homoserine lactone-mediated bacterial quorum sensing. In: *Journal of the American Chemical Society*; 128(9), pp. 2802–2803.

Kaufmann, G.F., *et al.* (2008) Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant *Staphylococcal* infections by structure-based virtual screening *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone. In: *Molecular Immunology*; 45(9), pp. 2710–2714.

Kiran, M.D., *et al.* (2008) Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug-resistant *Staphylococcal* infections by structure-based virtual screening. In: *Molecular Pharmacology*; 73(5), pp.1578–1586.

Koch, B., *et al.* (2005) The LuxR receptor: the sites of interaction with quorum-sensing signals and inhibitors. In: *Microbiology*; 151(Pt11), pp. 3589–3602.

Koh, K.H., Tham, F.Y. (2011) Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorumsensing inhibitors activity. In: *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*; 44(2), pp. 144–148.

Kwan, J.C., *et al.* (2010) Isolation and biological evaluation of 8-epi-malyngamide C from the Floridian marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. In: *Jornal of Natural Products* ; 73(3), pp. 463–466.

Kokare, C.R., *et al.* (2009) Biofilms: importance and applications. In: *Indian Journal of Biotechnology*; Vol. 8, pp. 159–168.

Kravchenko, W., *et al.* (2006) N-(3-Oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways. In: *The Journal of Biological Chemistry*; 281(39), pp. 28822–28830.

Lal, A. (2009). Quorum Sensing: How Bacteria Talk to Each Other. In: *Resonance*. Índia. Ed.: Springer. pp. 866-871.

Lequette *et al.* (2006) A distinct Qsc regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. In: *Journal of Bacteriology*; 188(9), pp. 3365–3370.

Li, L., *et al.* (2004) Bacterial Nacylhomoserine lactone-induced apoptosis in breast carcinoma cells correlated with down-modulation of STAT3. In: *Oncogene*; 23(28), pp. 4894–4902.

Liu, H-B, *et al.* (2010) Inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* quorumsensing regulator, QscR. In: *Biotechnology and Bioengineering*; 106(1), pp. 119–126.

Long, R.A., *et al.* (2005) Antagonistic interactions among marine bacteria impede the proliferation of *Vibrio cholerae*. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 71(12), pp. 8531–8536.

Lönn-Stensrud, J., *et al.* (2007) Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral *streptococci*. In: *Oral Microbiology and Immunology*; 22(5), pp. 340–346.

Lu, L.G., *et al.* (2004) Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with food additives. In: *Journal of Food Protection*; 67(7), pp. 1457–1462.

Lyon, G.J., *et al.* (2000) Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 97(24), pp. 13330–13335.

Maeda, T., *et al.* (2012) Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. In: *The ISME Journal*; 6(3), pp. 493–501.

Marketon MM, *et al.* (2002). Identification of two quorum sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. In: *Journal of Bacteriology*; 184(13), pp. 3466–3475.

Mathesius, U., *et al.* (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*; 100(3), pp. 1444–1449.

Mattmann, M.E., *et al.* (2008) Synthetic ligands that activate and inhibit a quorum-sensing regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18(10), pp. 3072–3075.

Martinelli, D., *et al.* (2004) Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. In: *BMC Microbiology*; 2, pp. 4-25.

McDougald D, *et al.* (2007) Bacterial quorum sensing and interference by naturally occurring biomimics. In: *Analytical Bioanalytical Chemistry*; 387(2), pp. 445–453.

McLean, R., *et al.* (2008) Detection in vitro of quorum sensing molecules and their inhibitors. In: *Control of Biofilms Infections by Signal Manipulation*. Ed.: Springer. Vol. 2. pp. 39-50

Miyairi, S., *et al.* (2006) Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. In: *Journal of Medical Microbiology*; 55(Pt 10):1381–1387.

Morohoshi, T., *et al.* (2007) Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-Acylhomoserine lactone. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 73(20), pp. 6339–6344.

Musthafa, K.S., *et al.* (2011) Antipathogenic potential of amrine *Bacillus sp.* SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). In: *Journal of Bioscience*; 36(1), pp. 55–67.

Ni, N., *et al.* (2008) Pyrogallol and its analogs can antagonize bacterial quorum sensing in *Vibrio harveyi*. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 18(5), pp. 1567–1572.

Nithya, C., *et al.* (2011) A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in Gram-positive and Gram-negative species. In: *Biofouling*; 27(5), pp. 519–528.

Ng, W.L., *et al.* (2012) Broad spectrum pro-quorum-sensing molecules as inhibitors of virulence in *Vibrios*. In: *PLoS Pathogens*; 8(6), pp. 1-14.

Ortiz-Castro, R., *et al.* (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant, Cell & Environment*; 31(10), pp. 1497–1509.

Packiavathy, I *et al.* (2012) Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. In: *Food Chemistry*.

Paul, D., *et al.* (2009) Application of quorum quenching to inhibit biofilm fermentation. In: *Environmental Engineering Science*; 16(8), pp. 1319–1324.

Persson, T., *et al.* (2005) Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. In: *Organic & Biomolecular Chemistry*; 3(2), 253–262.

Rasko, D.A., *et al.* (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. In: *Science*; 321:1078–1080.

Rasmussen, T.B., *et al.* (2005a) Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. In: *Journal of Bacteriology*; 187(5), pp. 1799–1814.

Rasmussen, T.B., *et al.* (2005b) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. In: *Microbiology*; 151(Pt 5), pp. 1325–1340.

Rasmussen, T.B., Givskov, M. (2006) Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs. In: *International Journal of Medical Microbiology*; 296(2-3), pp. 149–161.

Ren, D., *et al.* (2004) Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. In: *Biotechnology and Bioengineering*; 88(5), pp. 630–642.

Ren, D., *et al.* (2005) Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 71(7), pp. 4022–4034.

Riedel, K., *et al.* (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. In: *Microbiology*; 147(Pt 12), pp. 3249–3262.

Riedel, K., *et al.* (2006) Computer-aided design of agents that inhibit the cep quorum-sensing system of *Burkholderia cenocepacia*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50(1), pp. 318–323.

Schipper, C., *et al.* (2009) Metagenome derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 75(1), pp. 224–238.

Shepherd, R.W., Lindow, S.E. (2009) Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 75(1), pp. 45–53.

Sio, C.F., *et al.* (2006) Quorum quenching by na N-Acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. In: *Infection and Immunity*; 74(3), pp. 1673–1682.

Smith, K.M., *et al.* (2003) Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum

sensing by synthetic autoinducer analogs. In: *Chemistry & Biology*; 10(1), pp. 81–89.

Sola, M., et al. (2012). Mecanismos de Quorum Sensing e Sua Relevância na Microbiologia de Alimentos. In: *Enciclopédia Biosfera*, vol. 8, nº 14, pp. 1419-1441.

Someya, N., et al. (2009) Distribution of N-acylhomoserine lactone-producing fluorescent *Pseudomonas* in the phyllosphere and rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). In: *Microbes Environments*; 24(4), pp. 305–314.

Storti, A. et al (2005) Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from intensive care unit patients. In: *Brazilian Journal of Microbiology*. 36(3), pp. 275-280.

Teasdal, M.E., et al. (2009) Secondary metabolites produced by marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing controlled phenotypes in gram-negative bacteria. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 75(3), pp. 567–572.

Teplitski, M., et al. (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. In: *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 13(6), pp. 637–648.

Teplitski, M., et al. (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. In: *Plant Physiology*; 134(1), pp. 137–146.

Tortosa P, et al. (2001) Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. In: *Journal of Bacteriology*; 183(2), pp. 451–460.

Uroz, S. e Heinonsalo, J. (2008) Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. In: *FEMS Microbiology Ecology*; 65(2), pp. 271–278.

Vandeputte, O.M., et al. (2010) Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-

controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. In: *Applied and Environmental Microbiology*; 71(1), pp. 243–253.

Van Houdt *et al.* (2006) N-acyl-L-homoserine lactone signal interception by *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Letter*; 256(1), pp. 83–89.

Vattem, D.A., *et al.* (2007) Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. In: *Fitoterapia*; 78(4), pp. 302–310.

Vikram, A., *et al.* (2010) Suppression of bacterial cell-cell signaling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. In: *Journal of Applied Microbiology*; 109(2), pp. 515–527.

Walker, T.S., *et al.* (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions, pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. In: *Plant Physiology*; 134(1), pp. 320–331.

Wang, W., *et al.* (2008) Inhibition of Lux quorum-sensing system by synthetic N-acyl-L-homoserine lactone analogous. In: *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*; 40(12), pp. 1023–1028.

Waters CM, Bassler BL. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. In: *Annual Review of Cell and Development Biology*; 21, pp. 319–346.

Widmer, K.W., *et al.* (2007) Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to Antoinducers-2 (AI-2). In: *Journal of Food Science*; 72(9), M363–368.

Wolcott, R. (2008) Clinical wound healing using signal inhibitors. In: *Control of Biofilm Infections by Signal Manipulation*. Ed.: Springer. Vol. 2. pp. 157-170.

Wu, H., *et al.* (2004) Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. In: *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 53(6), pp. 1054–1061.



Wynendaele, E., *et al.* (2012) The potential role of quorum-sensing peptides in oncology. In: *Medical Hypothesis*; 78(6), pp. 814-817.

Yang, F., *et al.* (2005) Quorum quenching enzyme activity is widely conserved in the sera of mammalian species. In: *FEBS Letters*; 579(17), pp. 3713–3717.

Yang, L., *et al.* (2009) Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing inhibitors. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 53(6), pp. 2432–2443.

Zhang RG, *et al.* (2002) Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. In: *Nature*; 417(6892) pp. 971–974.

Zhao, W.H., *et al.* (2001) Inhibition by epigallocatechin gallate (EGCg) of conjugative R plasmid transfer in *Escherichia coli*. In: *Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*; 7(3), pp. 195–197.

Zhu, J., *et al.* (1998) Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Journal of Bacteriology*; 180(20), pp. 5398–5405.

Zhu, H., *et al.* (2011) Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. In: *Letters in Applied Microbiology*; 52(3), pp. 269–274.