



Inhibidores del Quorum Sensing para el control de infecciones bacterianas

Quorum Sensing inhibitors to control bacterial infections

Hazel Álvarez-Cabalcaeta¹
Oscar Salas-Ocampo²

1. Licenciada en Microbiología y Química Clínica, Laboratorio Clínico Hospital La Anexión, CCSS; halvacaba@hotmail.com
2. Licenciado en Microbiología y Química Clínica, Laboratorio Clínico Hospital La Anexión, CCSS; o david2690@gmail.com

Recibido 15 de diciembre de 2018. Aceptado 09 de enero de 2019.

RESUMEN

Las infecciones bacterianas causan pérdidas humanas y económicas. Una de las principales causas de estas infecciones son las bacterias formadoras de biopelículas, que muchas veces son resistentes a antibióticos. Para el control de estas bacterias formadoras de biopelículas se requiere la creación de nuevas estrategias. Debido a que las biopelículas se crean mediante el quorum sensing (QS), se pueden utilizar inhibidores del QS para reducir la patogenicidad. El quorum sensing es un método mediante el cual las bacterias, por medio de señales moleculares generadas por ellas mismas, activan o reprimen ciertos genes para coordinar su comportamiento. Diversas enfermedades infecciosas han sido causadas por bacterias formadoras de biopelículas, por lo que la investigación en este campo ha tomado gran relevancia en los últimos años.

Palabras clave: Biopelículas; percepción de quórum; infecciones bacterianas.

ABSTRACT

Bacterial infections cause human and economic losses. One of the main causes of these infections are the biofilm-forming bacteria, which are often resistant to antibiotics. The creation of new strategies to control these biofilm-forming bacteria is required. Because biofilms are formed by quorum sensing (QS), QS inhibitors can be used to reduce pathogenicity. Quorum sensing is a method by which bacteria, through molecular signals generated by themselves, activate or repress certain genes to coordinate their behavior. Various infectious diseases have been caused by biofilm-forming bacteria, so research in this field has taken great relevance in recent years.

Key words: Biofilm; quorum sensing; bacterial infections.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El quorum sensing es un fenómeno que detalla la capacidad de las bacterias de percibir y responder a moléculas de señalización autogeneradas para coordinar su comportamiento a nivel grupal; de tal forma, las bacterias solo responden al QS cuando su densidad celular alcanza cierto nivel (quórum), en el cual la expresión de algunos genes es activada o reprimida. Dentro de las principales moléculas de señalización en el QS se encuentran las N-acil-homoserina

lactonas, que han sido ampliamente investigadas y que regulan la expresión de una variedad de comportamientos, como la virulencia, la simbiosis, la formación de biopelículas y la producción de toxinas (1, 2).

El fenómeno de QS fue reportado por primera vez en 1972 por Eberhard (3), cuando estudiaba la bacteria marina *Vibrio fischeri*, que emitía luminiscencia al ser cultivada en el laboratorio a altas densidades celulares. En el estudio Eberhard observó que esta bacteria formaba relaciones simbióticas con calamares de la especie *Euprymna scolopes*, los

cuales obtenían ventaja frente a los depredadores, gracias a la bioluminiscencia producida por las bacterias; por su parte, estas últimas se beneficiaban por encontrar un hábitat seguro. Posteriormente, Eberhard demostró que la luminiscencia se activaba en presencia de una molécula producida por las mismas bacterias y que solo ocurría cuando las bacterias alcanzaban ciertas concentraciones. Finalmente, la molécula producida por *Vibrio fischeri* fue identificada por Eberhard y colaboradores como AHL (4).

El término QS fue utilizado por primera vez en 1994, en una minirrevisión publicada en el *Journal of Bacteriology* (5). Según Greenberg, su origen provino del colaborador llamado Winans, quien relató que en una reunión familiar su cuñado escuchó el tema de su investigación y propuso que QS describía mejor el fenómeno, al darse cuenta de que se debía alcanzar un número mínimo para la inducción del proceso (6).

En general, diversas enfermedades infecciosas son causadas por bacterias asociadas a biopelículas, lo que ha llevado a un incremento en la investigación y la prevención de su desarrollo. Esto debido a que cuando las bacterias se encuentran en biopelículas presentan una resistencia a antibióticos, desinfectantes y defensas del hospedero, lo que contribuye a la persistencia de la infección.

En la actualidad se tiene conocimiento de que el QS está involucrado en el desarrollo del biofilm por parte de distintas bacterias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, entre otras. Por ejemplo, se ha demostrado que una cepa mutante de *Pseudomonas aeruginosa* defectuosa en el QS es incapaz de formar una biopelícula altamente diferenciada (7).

Una estrategia potencial para el control de infecciones bacterianas es el quorum quenching (QQ), proceso que además de interferir con el sistema del QS, reprime la expresión de virulencia en bacterias patógenas y ha mostrado potencial para superar infecciones complicadas provenientes de cepas bacterianas multirresistentes. En los últimos años se ha incrementado el interés por la función de inhibidores de QS para la protección contra las infecciones bacterianas; los compuestos de QQ han sido identificados en un número de especies bacterianas y han mostrado ser una alternativa importante desde su identificación en *Bacillus sp.* para atenuar la virulencia de *Erwinia caratovora* (8).

Existe una gran variedad de compuestos de QQ, dentro de los cuales se encuentran las lactonasa y las acilasas que degradan las AHLs, los inhibidores de sintasa, los análogos de inhibidor de receptores y los inhibidores de receptores, como las furanonas brominadas. Además de estos, las bajas concentraciones de antibióticos como la azitromicina, la ceftazidima y la ciprofloxacina han demostrado inhibir el QS en *P. aeruginosa*. Adicionalmente, algunas drogas aprobadas para uso clínico pueden actuar como inhibidores del QS, como es el caso del antihelmíntico niclosamida, que ha demostrado reducir la formación de biopelícula y la producción de

factores de virulencia. También se han encontrado compuestos de QQ naturales; por ejemplo, en un estudio realizado se observó que de 120 aislamientos de bacterias provenientes de especies de arrecifes de coral saludables, hasta un 24 % mostraban actividad de QQ (9).

MECANISMOS DE ACCIÓN

Para el desarrollo de inhibidores del QS se requieren ciertas propiedades para que sean efectivos y aplicables. Idealmente, se necesita que el inhibidor sea una molécula de bajo peso molecular y que su actividad cause una reducción significativa en la expresión de genes que controlan el QS. Además, es importante que el inhibidor exhiba un alto grado de especificidad para el regulador de QS y que no ejerza ningún efecto de toxicidad contra otras bacterias o células eucariotas del hospedero. De esta forma, si el inhibidor de QS no interfiere con los procesos vitales básicos, como la síntesis de ARN y proteínas de la bacteria, es probable que la presión selectiva para el desarrollo de resistencia sea minimizada. Por último, el inhibidor de QS debe ser un compuesto químicamente estable y resistente al metabolismo del organismo hospedero (10).

Las enzimas del QQ pueden ser agrupadas en dos clases: la clase I incluye enzimas que cortan la molécula de AHL, tales como la AHL-lactonasa, la AHL-acilasa y la paraoxonasa; mientras que en la clase II se incluyen las oxidoreductasas que reducen el grupo carbonil en hidroxil.

La enzima AHL-lactonasa de la clase I corta el anillo de la homoserina lactona de la molécula de AHL de una forma hidrolítica y reversible, para abrirlo, lo que provoca que la molécula de AHL sea incapaz de unirse al receptor, atenuando su efectividad. En general, se han encontrado dos familias de lactonasa: la AiiA lactonasa metalohidrolasa, que requiere dos iones de zinc (2+) para su completo funcionamiento, y la QsdA lactonasa, que no está relacionada con la familia AiiA lactonasa, pero que igual es dependiente de iones de zinc.

Otra enzima de la clase I es la AHL acilasa, que hidroliza de manera irreversible el enlace amida entre la cadena acil y la homoserina en la molécula de AHL; este proceso libera una homoserina lactona y un ácido graso libre (11). Esta enzima fue descrita por primera vez en una cepa de *Variovorax paradoxus* que mostraba una amplia capacidad de degradación de la molécula de AHL.

Posteriormente, se describieron otras enzimas, como la AiiD de *Ralstonia sp.*, la AhIM de *Streptomyces sp.*, la PvdQ y QuiP de *P. aeruginosa* y la AiiC de *Anabaena sp.*

Por otra parte, están las oxidoreductasas, que pertenecen a la clase II, las cuales actúan contra la cadena acil por acción oxidativa o reductiva y, por ende, catalizan una modificación de la estructura química de la señal, pero no por degradación. Esta modificación de la estructura química afecta la especificidad y el reconocimiento de la AHL, por lo

que se ve afectada la activación de los genes del QS. Hasta el momento, se han descubierto dos tipos de enzimas oxidorreductasas: la P-450/NADPH-P450 reductasa aislada de *Bacillus megaterium* y, recientemente, la BpiB09 derivada de una biblioteca metagenómica (8).

Además de utilizar esas enzimas mencionadas, existe otra manera para interferir con el QS bacteriano, y es evitando que la señal sea recibida por la bacteria, ya sea bloqueando o destruyendo su receptor. Esto es posible realizarlo mediante inhibidores de QS sintéticos; es decir, creando análogos de inductores que bloqueen los receptores. Dichos análogos pueden crearse de tres formas: 1) mediante la introducción de sustituciones en la cadena acil, que al mismo tiempo mantenga el anillo de lactona; 2) introduciendo sustituciones y alteraciones en el anillo de lactona que mantenga la cadena acil sin cambios; y 3) haciendo modificaciones extensas tanto en la cadena acil como en el anillo de lactona. Estas modificaciones provocan un bloqueo del receptor, pero no una producción de señal, ya que en principio la molécula señal modificada carece de actividad (10).

Otra estrategia utilizada para interferir con el QS es el bloqueo de la producción de AHL; sin embargo, es la menos estudiada. Se han utilizado diversos sustratos análogos como la holo-ACP, la L/D-S-adenosilhomocisteína, la sinefungina y la butiril-S-adenosilmetionina para bloquear la producción de AHL *in vitro*, pero ninguno de ellos ha sido probado *in vivo* y no se sabe si estos afectan otras funciones celulares (10).

ESTADO DEL ARTE

La principal desventaja que presenta la utilización de inhibidores del QS es el desarrollo de resistencia bacteriana, lo cual ha sido demostrado en diferentes estudios realizados, como el efectuado en el 2012 por Maeda y colaboradores (11), donde se utilizó la *P. aeruginosa* como bacteria de referencia, por ser un importante causante de severas infecciones y por ser uno de los modelos del QS. Como parte del estudio, se probó la capacidad que poseen las células para desarrollar resistencia a compuestos del QQ, utilizando adenosina como única fuente de carbono; esto considerando que el crecimiento en adenosina requiere una homoserina lactona del sistema del QS; si el compuesto del QQ inhibe a la homoserina lactona, las células proliferarán más despacio, pero si las células desarrollan resistencia al compuesto, proliferarán más rápido. El inhibidor de QS utilizado fue un compuesto sintético derivado de una furanona brominada extraída de un alga llamada *Delisea pulchra*. Se utilizaron concentraciones de furanona brominada que no afectaban el crecimiento de la bacteria en medios ricos, para asegurarse que el crecimiento no se viera afectado por toxicidad.

En otro estudio, en el que también participó Maeda (9), se demostró que las células generan resistencia a compuestos

del QQ por medio de diferentes mecanismos y que estas mutaciones pueden ocurrir dentro de un marco clínico.

Por otro lado, en el 2013, Chu y colaboradores realizaron un estudio donde demostraron la supresión de fenotipos reguladores de QS en varias bacterias Gram negativas, utilizando una cepa de *S. delphini*. El objetivo de la investigación fue determinar si ciertas especies de *Staphylococcus* eran capaces de suprimir fenotipos que son controlados por QS en bacterias gram negativas. Para ello, se probó primero la habilidad que poseen varias especies de *Staphylococcus sp.* para inhibir la producción de piocianina (toxina respiratoria controlada mediante QS) por parte de *P. aeruginosa*, en un ensayo de cocultivo. Se encontró que un *S. delphini* DSMZ 20771 inhibe completamente la producción de piocianina luego de 24 horas de cocultivación con *P. aeruginosa* PAO1, mientras que *S. aureus* no mostró actividad. De tal forma, se demostró que estas bacterias producen compuestos del QQ que pueden resultar útiles para el control de patógenos, ya que inhiben sustancias dependientes del QS y, por ende, se podrían inhibir los mecanismos de comunicación entre célula y célula relacionados con la patogenicidad bacteriana (12).

Previo a estas investigaciones mencionadas, Hentzer y colaboradores habían realizado experimentos *in vivo* para analizar inhibidores de QS en un modelo de infección pulmonar (13). Para ello, inocularon ratones con *P. aeruginosa* en perlas de alginato para establecer una infección pulmonar. Normalmente, el sistema mucociliar de los pulmones de ratones sanos elimina de manera efectiva la bacteria. Sin embargo, debido al tamaño de las perlas de alginato, la bacteria no pudo ser eliminada y se estableció una infección que simula los estados iniciales de una infección crónica pulmonar. La cepa de *P. aeruginosa* utilizada poseía el gen que codifica por la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de QS. Un inhibidor de QS, como la furanona brominada, se inyectó simultáneamente para que bloqueara la expresión del gen GFP, por lo que la señal fluorescente verde desaparecía de forma gradual de los pulmones del ratón en seis horas. De acuerdo con estos resultados, se puede indicar que la furanona brominada inyectada en un ratón es capaz de viajar hasta los pulmones y ejercer su efecto en una bacteria infectante. También se observó que este inhibidor posee un efecto en la mortalidad de los ratones infectados intrapulmonarmente. Los ratones se dividieron en dos grupos; un grupo recibió tratamiento con solución salina y el otro recibió el compuesto furanona. En el grupo tratado con salina se observó que el 88 % de los ratones murieron, mientras que en el grupo tratado con inhibidor se redujo a un 55 %.

CONCLUSIONES

Los inhibidores del quorum sensing (QS) han mostrado tener un potencial para cubrir un amplio rango de aplicaciones, incluyendo la industria y la medicina, pero se debe

determinar con mayor precisión mediante investigaciones *in vivo* su efectividad en el control de infecciones bacterianas.

AGRADECIMIENTOS

Para la doctora Jendry María Díaz Angulo, directora del Laboratorio Clínico del Hospital La Anexión, por fomentar la investigación y la mejora continua del servicio.

DECLARACIÓN SOBRE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores manifestamos que durante la redacción del manuscrito no han incidido intereses o valores distintos a los que usualmente tiene la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cárcamo G, Lumjiaktase P, Kummerli R, Eberl L. Quorum sensing triggers the stochastic escape of individual cells from *Pseudomonas putida* biofilms. *Nat Commun*. 2014; 6(1): 5945-5959.
2. Kalia VC, Patel SK, Kang YC, Lee JK. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnol Adv*. 2019; 37(1): 68-90.
3. Eberhard A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol*. 1972; 109: 1101-1105.
4. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry*. 1981; 20: 2444-2449.
5. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994; 176(2): 269-275.
6. Greenberg EP. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News*. 1997; 63: 371-377.
7. Yarwood J, Bartels D, Volper E, Greenberg E. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Bacteriol*. 2004; 186(6): 1838-1850.
8. Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(9): 17477-17500.
9. García R, Maeda T, Wood T. Resistance to quorum-quenching compounds. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79(22): 6840-6846.
10. Rasmussen T, Givskov M. Quorum sensing: a bargain of effects. *Microbiology*. 2006; 152(4): 895-904.
11. Maeda T, García R, Pu M, Sheng L, García L, Thomas M, Wood T. Quorum quenching quandary: resistance to antivirulence compounds. *ISME J*. 2012; 6(3): 493-501.
12. Chu Y, Nega M, Wolffe M, Plener L, Grond S, Jung K, Gotz F. A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of gram-negative bacteria. *PLoS Pathog*. 2013; 9(9): e1003654.
13. Hentzer M, Wu H, Andersen J, Riedel K, Rasmussen T, Bagge N, Kumar N, Schembri M, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton J, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Hoiby N, Givskov M. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J*. 2003; 22(15): 3803-3815.
14. Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen J, Heydorn A, Mathee K, Moser C, Eberl L, Molin S, Hoiby N, Givskov M. Detection of N- acilhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*. 2000; 146(Pt 10): 2481-2493.
15. March G, Eiros J. Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Med Clin*. 2013; 141(8): 353-357.