



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



INFORME BREVE

Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina

Gabriela Carrada López^a y Carlos A. Castañón Sánchez^{b,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, México

^b Laboratorio de Investigación Biomédica, Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca, San Bartolo Coyotepec, Oaxaca, México

Recibido el 6 de marzo de 2017; aceptado el 2 de julio de 2017

PALABRAS CLAVE

Staphylococcus aureus;
Alfa toxina;
Virulencia;
Quercetina

KEYWORDS

Staphylococcus aureus;
Alpha-toxin;
Virulence;
Quercetin

Resumen Alfa toxina, una proteína formadora de poros con actividad citotóxica, es uno de los principales factores de virulencia secretados por la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Se ha establecido la relevancia de esta proteína en la patogenia de la neumonía asociada a infecciones por *S. aureus*. Por lo tanto, la inhibición de la secreción de alfa toxina puede ser una alternativa en el control de las infecciones causadas por este microorganismo. En este trabajo mostramos que quercetina, un flavonoide de origen natural, inhibe de manera dosis dependiente la actividad hemolítica y disminuye la secreción de alfa toxina en sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* sensible y resistente a meticilina. Además, quercetina previene de manera significativa el daño de células alveolares humanas cuando se co-cultivan con *S. aureus*. Nuestros datos sugieren que quercetina puede disminuir la virulencia de *S. aureus* al afectar la secreción de alfa toxina.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Quercetin attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by reducing alpha-toxin secretion

Abstract Alpha toxin, a pore-forming protein with cytotoxic activity, is one of the major virulence factors secreted by most strains of *Staphylococcus aureus*. The relevance of this protein in the pathogenesis of pneumonia associated with *S. aureus* infections has already been established. Therefore, inhibiting alpha toxin secretion can be an alternative for controlling these infections. This study shows that quercetin, a naturally occurring flavonoid, inhibits hemolytic

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: carlos.ctn@gmail.com (C.A. Castañón Sánchez)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.002>

0325-7541/© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

activity in a dose-dependent manner and reduces alpha toxin secretion in culture supernatants of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus*. Furthermore, quercetin significantly prevents damage to human alveolar cells when co-cultured with *S. aureus*. Our results suggest that quercetin can reduce *S. aureus* virulence by affecting alpha-toxin secretion.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena comúnmente aislada en humanos y es responsable de infecciones de la piel y tejidos blandos, endocarditis, osteomielitis, sepsis y neumonía⁴. El tratamiento de estas infecciones se ha complicado debido al surgimiento de cepas multirresistentes¹⁰. El repertorio de factores de virulencia que *S. aureus* posee es extenso, y tanto sus productos estructurales como los secretados juegan un papel importante en la patogenia de la infección por este microorganismo⁵.

Uno de estos factores es alfa toxina, una proteína secretada como un monómero soluble en agua, capaz de oligomerizar en una estructura heptamérica y de provocar la lisis de eritrocitos, linfocitos, macrófagos, monocitos y células epiteliales alveolares¹. La evidencia que posiciona el papel de alfa toxina en la patogenia de *S. aureus* ya ha sido documentada. Ensayos realizados en un modelo murino de neumonía, donde se empleó una cepa mutada en el gen *hla*, el cual codifica para la producción de alfa toxina, mostraron una reducción significativa en la mortalidad asociada a neumonía en comparación con los animales tratados con la cepa silvestre^{2,14}.

Diversos componentes bioactivos aislados de productos naturales, incluyendo capsaicina y morina, disminuyen la secreción de alfa toxina y protegen de la neumonía causada por cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina^{6,11,14}. Se ha demostrado que quercetina, un flavonoide de origen natural, disminuye la formación de biofilms y la hemólisis provocada por *S. aureus*⁸, procesos en los que participa alfa toxina; sin embargo, aún se desconoce su mecanismo. Por lo anterior, resulta interesante evaluar el efecto de quercetina en la secreción de alfa toxina y en la protección del daño celular ejercido por *S. aureus*.

Para ello se empleó como modelo de estudio la cepa de *S. aureus* sensible a meticilina ATCC 29213 y la cepa resistente a meticilina USA300 (ATCC, BAA-1717), ambas por su capacidad para secretar alfa toxina. Las bacterias se crecieron en 5 ml de caldo tripteína de soja (TSB, por sus siglas en inglés) a 37 °C durante 12 h y se transfirieron a 100 ml de caldo TSB hasta alcanzar una densidad óptica (OD_{600nm}, por sus siglas en inglés) de 0,3 a 37 °C en agitación constante a 150 rpm. El compuesto quercetina, con número de registro CAS 117-39-5 (Chemical Abstracts Service), se adquirió de manera comercial con una pureza del 95% (Sigma-Aldrich). El compuesto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) y se adicionó a los cultivos a concentraciones subinhibitorias de 2, 4, 8 y 16 µg/ml. Un cultivo sin compuesto se utilizó como control. El crecimiento

bacteriano se monitoreó a intervalos de 30 min hasta alcanzar una OD_{600nm} de 2,5. Los sobrenadantes de *S. aureus* se obtuvieron por centrifugación a 5.000 xg durante 5 min y las células residuales se eliminaron por filtración a través de poros de 0,2 µm.

La concentración mínima inhibitoria (CIM) de quercetina para ambas cepas de *S. aureus* se realizó por triplicado mediante el método de microdilución en caldo como se ha descrito anteriormente⁹. La CIM fue definida como la concentración más baja de quercetina capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Para realizar la inmunodetección de la proteína alfa toxina se emplearon 25 µl de sobrenadantes de cultivos y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecil sulfato de sodio¹¹. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos primarios anti-alfa toxina (Sigma-Aldrich) diluidos 1:8.000⁹ y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (Pierce) diluidos 1:10.000 y se reveló mediante quimioluminiscencia enzimática (ThermoScientific). Un análisis densitométrico se realizó mediante el programa ImageJ.

Los ensayos de hemólisis se realizaron como se ha descrito anteriormente⁹. Brevemente, se emplearon 200 µl de sobrenadantes de cultivos libres de bacterias tratados con concentraciones crecientes de quercetina. Los sobrenadantes se incubaron con 25 µl de glóbulos rojos desfibriados de carnero y se adicionaron 775 µl de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) y la mezcla se incubó durante 10 min a 37 °C. Las muestras se centrifugaron a 10.000 xg durante 2 min y la actividad hemolítica se cuantificó al medir la absorbancia de los sobrenadantes a una OD_{450nm}. Tratamientos con Tritón x-100 y PBS se emplearon como controles positivo y negativo, respectivamente. El porcentaje de hemólisis de cada tratamiento se calculó al comparar con el sobrenadante de un cultivo libre de quercetina, considerado como el 100% de hemólisis.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se ha descrito anteriormente^{11,14}. Para ello, se empleó la línea de células epiteliales alveolares humanas A549 (ATCC, CCL 185), las cuales se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) inactivado por calor y penicilina/estreptomina (50 U/ml/50 µg/ml) (Gibco). Se emplearon 2,0 × 10⁴ células, las cuales se inocularon en placas de 96 pozos y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante 12 h. Las células se co-cultivaron con 100 µl de una

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/8844396>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/8844396>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)