



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

Disponible en Internet el 1 de noviembre 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).

<https://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 dimetil-sulfóxido (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 poli-acrilamida 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 desfibrinados 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

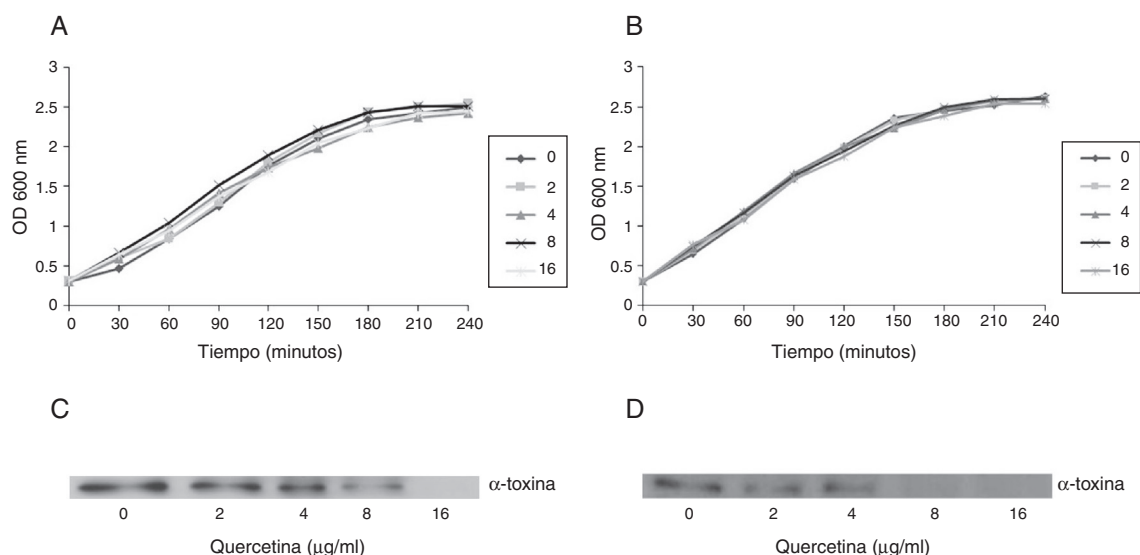


Figura 1 Curvas de crecimiento para *S. aureus* ATCC 29213 (A) y USA300 (B) cultivadas con diferentes concentraciones de quercetina. Análisis del efecto de quercetina en la secreción de alfa toxina mediante western blot para las cepas 29213 (C) y USA300 (D).

suspensión de *S. aureus* ($2,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias/ml) por pozo en medio DMEM sin antibióticos y se adicionaron concentraciones crecientes de quercetina, por triplicado⁹. El co-cultivo se incubó durante 6 h a 37 °C y la viabilidad celular se determinó mediante la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) empleando un kit de citotoxicidad (Promega) bajo las instrucciones del fabricante, realizando las lecturas a una OD_{490nm} en un lector de microplacas. Como controles se usaron tratamientos con 16 µg/ml del compuesto y las células incubadas solo con medio DMEM¹¹.

Los datos se presentan como el valor promedio \pm la desviación estándar y se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, empleando además una posprueba de Tukey usada para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos. El análisis se realizó haciendo uso del programa SPSS versión 22,0 (IBM Corp). El valor de *p* es considerado como significativo cuando es inferior a 0,05.

La concentración mínima inhibitoria de quercetina para cultivos de *S. aureus* 29213 y USA300 corresponde a 128 µg/ml, indicando que el compuesto presenta una débil actividad antibacteriana. Adicionalmente, se realizaron curvas de crecimiento para *S. aureus* 29213 (fig. 1A) y USA300 (fig. 1B) bajo tratamientos con diferentes concentraciones de quercetina. Los resultados muestran que concentraciones de quercetina en un rango de 2 a 16 µg/ml no tienen un efecto significativo en el crecimiento en ambas cepas.

Con la finalidad de evaluar el efecto de quercetina en la secreción de alfa toxina, se analizaron mediante ensayos tipo western blot sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* tratados con las concentraciones de quercetina a las cuales el crecimiento bacteriano no es afectado. Al comparar con el control sin compuesto, las bacterias tratadas con quercetina reducen de manera dosis dependiente la secreción de alfa toxina, tanto para la cepa sensible (fig. 1C) como para la cepa resistente a meticilina (fig. 1D). A partir de tratamientos con 8 µg/ml de quercetina se observó

una importante disminución de la inmunoreactividad de la proteína alfa toxina, siendo más evidente para la cepa USA300. Sin embargo, al realizar tratamientos con 16 µg/ml de quercetina y considerando el límite de detección de la técnica, no es posible identificar a la proteína alfa toxina en los sobrenadantes de ambas cepas. Al realizar un análisis mediante densitometría observamos valores de secreción de alfa toxina del 91, del 84 y del 58% para la cepa 29213 a concentraciones de 2, 4 y 8 µg/ml de quercetina, y para la cepa USA300 los valores corresponden a 84, 76 y 34%, respectivamente. Un control adicional con 2,2 µM de DMSO correspondiente a la concentración máxima de solvente utilizada para los tratamientos con 16 µg/ml de quercetina no mostró un efecto en la secreción de alfa toxina. Estos resultados muestran por primera vez que quercetina disminuye la secreción de alfa toxina de *S. aureus* sensible y resistente a meticilina.

Se ha descrito que la actividad hemolítica de alfa toxina de *S. aureus* es una de las principales funciones biológicas de esta proteína¹. La actividad hemolítica de sobrenadantes de cultivos bacterianos de *S. aureus* se debe en gran medida a la presencia de alfa toxina⁹. Es por ello que los ensayos de hemólisis pueden ser de gran utilidad para analizar el efecto de compuestos que afectan la secreción de esta toxina. Por lo anterior, realizamos un ensayo para evaluar la actividad hemolítica de sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* con y sin quercetina. En nuestro sistema, al comparar con la muestra control del cultivo sin compuesto, considerado como 100% de hemólisis, el tratamiento con 8 µg/ml de quercetina reduce de manera importante la actividad hemolítica, hasta un 25 y un 45% para las cepas 29213 (fig. 2A) y USA300 (fig. 2B), respectivamente. Adicionalmente, tratamientos con 16 µg/ml del compuesto mostraron ser más efectivos al disminuir la hemólisis hasta un 17 y un 35% para ambas cepas. Es importante señalar que aun cuando el efecto de quercetina en la disminución de la actividad hemolítica resultó ser dosis dependiente para ambas cepas,

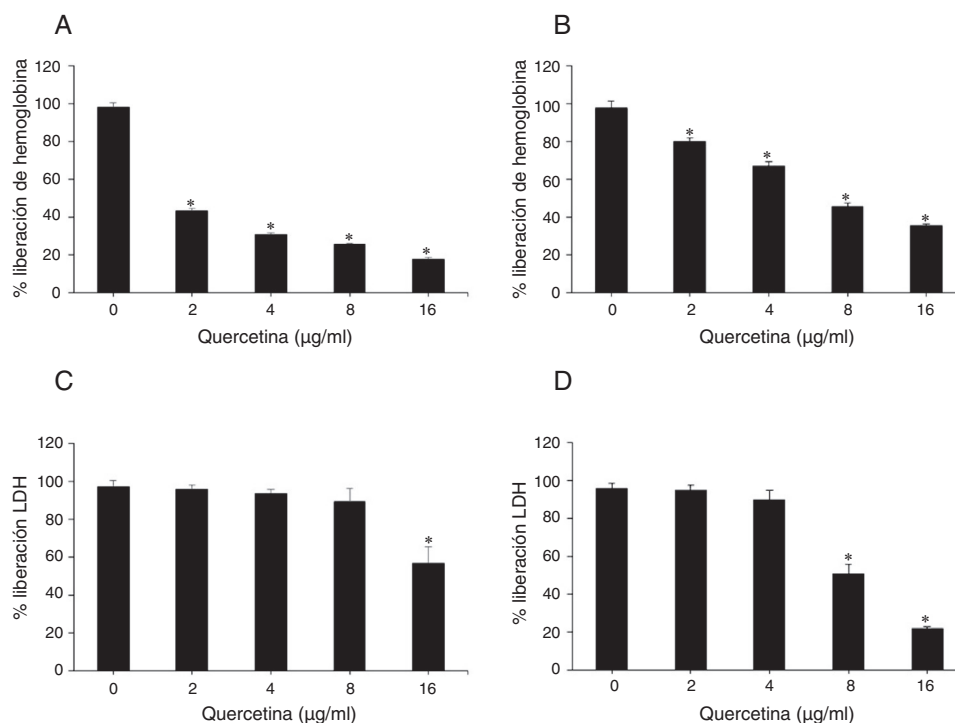


Figura 2 Actividad hemolítica de sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y USA300 (B) tratados con quercetina. Cuantificación de la liberación de LDH por células A549 co-cultivadas con las cepas 29213 (C) y USA300 (D) en presencia de las concentraciones indicadas de quercetina.

* $p < 0,0001$.

observamos un efecto mayor para la cepa 29213 sensible a meticilina. Adicionalmente, quercetina a concentraciones de 16 µg/ml mostró valores mínimos de hemólisis, los cuales fueron similares a los obtenidos con el control con PBS (12%). Nuestros resultados sugieren que quercetina reduce la actividad hemolítica de sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina.

Se ha reportado que tratamientos con *S. aureus* DU 1090, una cepa mutada en el gen *hla*, no causan un daño significativo cuando se co-cultiva con células A549¹⁴. Con base en el antecedente anterior y en los resultados obtenidos hasta el momento, nosotros especulamos que quercetina puede proteger a las células A549 de la muerte provocada por *S. aureus*. Por lo tanto, evaluamos la viabilidad celular cuantificando la liberación de LDH de células A549 en co-cultivos con *S. aureus* 29213 y USA300 tratados con concentraciones crecientes de quercetina. Los resultados mostraron una reducción en la liberación de LDH para la cepa 29213 solo bajo tratamientos con 16 µg/ml del compuesto (fig. 2C). Sin embargo, para la cepa resistente a meticilina USA300 la protección celular es evidente a concentraciones de 8 y 16 µg/ml de quercetina, al disminuir la liberación de LDH un 50 y un 21%, respectivamente (fig. 2D). El tratamiento solo con 16 µg/ml quercetina mostró resultados similares al control con medio DMEM (19%). En este modelo es posible que el efecto protector de quercetina ocurra a mayores concentraciones debido a que las células A549 son co-cultivadas con las bacterias y no solo son expuestas al efecto de sobrenadantes filtrados, como se realizó en los ensayos de hemólisis. Por lo tanto, es posible que factores adicionales a alfa toxina puedan ser expresados de manera diferencial dependiendo

de la cepa de *S. aureus* utilizada y estén contribuyendo en la muerte de las células A549. Como se esperaba, quercetina ejerce un efecto protector del daño celular provocado por *S. aureus* sensible y resistente a meticilina.

Nuestros resultados sugieren que, a las concentraciones evaluadas en este estudio, quercetina no tiene efecto en el crecimiento de *S. aureus*; sin embargo, disminuye significativamente la secreción de alfa toxina, reduciendo así la actividad hemolítica y confiriendo protección del daño en células A549.

La disminución en la efectividad de los antibióticos empleados en el tratamiento de las infecciones comunes se ha acelerado en los últimos años⁷. Actualmente los antibióticos administrados para el tratamiento de infecciones severas por *S. aureus* resistentes a meticilina son daptomicina, vancomicina y linezolid; sin embargo, ya existen reportes de cepas resistentes a estos antibióticos¹³. Es por ello que, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud¹⁵, se deben priorizar las investigaciones en el desarrollo de nuevos antibióticos que puedan cubrir la urgente necesidad de alternativas a las terapias tradicionales⁹. Se ha propuesto como estrategia adicional el uso de fármacos anti-virulencia en una terapia combinada, en la cual la eliminación de las bacterias sea mediada por los antibióticos estándar y los síntomas de la virulencia sean suprimidos por estos nuevos fármacos³.

S. aureus secreta diversas toxinas que dañan al hospedero. Entre ellas, una de las más estudiadas es la proteína formadora de poros, alfa toxina. Inicialmente nombrada con base en su actividad lítica en glóbulos rojos, se ha sugerido un complejo mecanismo de acción en respuesta a la intoxicación

ción de células nucleadas¹. Previamente se ha propuesto que alfa toxina juega un papel esencial en la patogenia de la neumonía provocada por *S. aureus*². Además, se ha demostrado que la disrupción de la función de alfa toxina proporciona un excelente mecanismo para prevenir o tratar la neumonía asociada a *S. aureus*¹². Estos hallazgos indican que alfa toxina puede ser considerada como un blanco potencial para la terapia anti-virulencia contra las infecciones provocadas por *S. aureus*.

En este trabajo demostramos que quercetina, un flavonoide natural con actividad antibacteriana y antibiofilm en *S. aureus*⁸, disminuye la secreción de la proteína alfa toxina. Además, quercetina confiere un efecto protector de la actividad hemolítica y del daño celular provocado por *S. aureus* en cultivos de células A549. Nuestros resultados sugieren el papel de quercetina como un agente anti-virulencia dirigido contra alfa toxina de *S. aureus*.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Salud de México.

Bibliografía

1. Berube BJ, Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*. 2013;5:1140–66.

2. Bubeck Wardenburg J, Patel RJ, Schneewind O. Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun*. 2007;75:1040–4.
3. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of anti-virulence therapies. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:17–27.
4. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23:616–87.
5. Gordon JR, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2008;46:S350–9.
6. Kong C, Neoh HM, Nathan S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*. 2016;8:E72, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8030072>.
7. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wettheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*. 2013;13:1057–98.
8. Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*. 2013;29:491–9.
9. Liu Y, Shi D, Guo Y, Li M, Zha Y, Wang Q, Wang J. Dracorhodin perchlorate attenuates *Staphylococcus aureus* USA300 virulence by decreasing α -toxin expression. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33.
10. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med*. 1998;339:520–32.
11. Qiu J, Niu X, Wang J, Xiang Y, Leng B, Dong J, Li H, Luo M, Zhang Y, Dai X, Luo Y, Deng X. Capsaicin protects mice from community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *PLoS One*. 2012;7:e33032.
12. Ragle BE, Karginov VA, Bubeck-Wardenburg J. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* pneumonia with a β -cyclodextrin derivative. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:298–304.
13. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;18:56–60.
14. Wang J, Zhou X, Liu S, Li G, Shi L, Dong J, Li W, Deng X, Niu X. Morinhydrate attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by inhibiting the self-assembly of α -hemolysin. *J Appl Microbiol*. 2015;118:753–63.
15. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: Swiss; 2017 [consultado 1 Jun 2017]. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM-WHO.pdf.