

# Fatores inibitórios do *Quorum sensing* e sua relação com o biofilme

## Inhibitory factors of *Quorum sensing* and its relationship with biofilm

Vinicius Freitas Oliveira<sup>a</sup>, Charlotte Cesty Borda de Saenz<sup>b</sup>

a: Graduando do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

b: Bióloga, Profa. Dra. do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU, Brasil

### RESUMO

O *Quorum sensing* é o sistema de comunicação celular amplamente utilizado na natureza responsável pela expressão de fatores de virulência, resistência e formação do biofilme em ambientes que demandam maior prevalência bacteriana. Esta comunicação bacteriana, presente nos biofilmes, também é frequentemente encontrada em pacientes com doenças crônicas. A partir do levantamento bibliográfico, avaliar os fatores inibitórios do *Quorum sensing* e produção de biofilme foi o objetivo do presente estudo, no qual busca avaliar o potencial terapêutico da inibição dos respectivos mecanismos, assim como potencial atuação nos tratamentos já empregados apresentados na literatura. Foram identificadas as enzimas AHL-lactonases e AHL-acilases que atuam como inibidoras capazes de limitar a liberação de sinais, através da clivagem de moléculas liberadas ou através da competição por receptores de membrana. Por outro lado, também foram identificadas as enzimas antagonistas do *Quorum sensing*, sendo elas, furanonas halogenadas que atuam na deslocação das moléculas e impedindo o funcionamento dos sinais liberados. Pode-se concluir que o tratamento específico pode gerar impacto positivo ao paciente, auxiliando na efetividade do tratamento e facilitando a recuperação do paciente.

**Descritores:** percepção de *Quorum*, bioluminescência, biofilme

### ABSTRACT

*Quorum sensing* is the cellular communication system widely used in nature responsible for the expression of virulence factors, resistance and biofilm formation in environments that demand greater bacterial prevalence. This bacterial communication, present in biofilms, is also frequently found in patients with chronic diseases. Based on the bibliographical survey, evaluating the inhibitory factors of *Quorum sensing* and biofilm production was the objective of the present study, which seeks to evaluate the therapeutic potential of inhibiting the respective mechanisms, as well as the potential effect on treatments already used presented in the literature. The enzymes AHL-lactonases and AHL-acylases were identified that act as inhibitors capable of limiting the release of signals, through the cleavage of released molecules or through competition for membrane receptors. On the other hand, enzymes that are antagonistic to *Quorum sensing* were also identified, namely halogenated furanones that act to displace molecules and prevent the released signals from functioning. It was concluded that specific treatment can generate a positive impact on the patient, helping to make the treatment more effective and facilitating the patient's recovery.

**Descriptors:** *Quorum sensing*, bioluminescence, biofilm

### INTRODUÇÃO

No meio ambiente, os microrganismos estão constantemente em situações cuja necessidade

de administrar seu crescimento e consumo de nutrientes, assim como o reconhecimento uns dos outros, é fundamental para sua prevalência, sendo comunicação a peça chave para o direcionamento e sobrevivência da colônia frente aos mais diversos ambientes em que estão inseridas.<sup>(2)(4)</sup> Através da comunicação, especificamente, as bactérias, podem receber instruções externas ou de sua própria colônia, havendo mudanças diretas na expressão de genes específicos, bem como para o controle de crescimento e o metabolismo.<sup>1,2</sup>

O *Quorum sensing* (QS) é o mecanismo de comunicação de extrema importância para a vida bacteriana, sendo encontrado não só em populações com ascendente crescimento, mas também em colônias onde a expressão de genes específicos é necessária<sup>3,4</sup>, permitindo a transmissão de informações, que por sua vez possibilitam uma resposta aos estímulos externos.<sup>1</sup> O mecanismo de QS é baseado em autoindutores que penetram a membrana celular e desencadeiam uma série de respostas, por exemplo: a bioluminescência em *V. Fischer*<sup>7</sup> ou a produção de biofilme em situações de estresse<sup>3</sup>, bem como a transcrição de fatores de virulência.<sup>3,4</sup> Os autoindutores são moléculas as utilizadas que atuam na sinalização e possuem diferenças quando encontrados em diferentes tipos de bactérias, ou seja, em Gram-positivas são baseados em peptídeos, enquanto em Gram-negativas, majoritariamente, são regidas por acil-homoserina lactona (AHLs).<sup>1</sup>

Respectivamente, o mecanismo QS é população-dependente, necessitando de determinadas quantidades de microrganismos para que as moléculas atinjam a densidade necessária para alterações significativas na colônia.<sup>1,2</sup> Em grandes populações, em situação de competição ou estresse<sup>1,2</sup>, a transcrição de genes em toda a colônia é necessária e deve ser realizada de forma conjunta, de modo que não haja apenas bactérias isoladas expressando genes específicos, mas toda a colônia, possibilitando uma resposta acentuada ao estímulo.<sup>4</sup> Um exemplo de atuação do mecanismo de QOS são as colônias de *Vibrio fischeri*, cujo processo de bioluminescência é realizado através de AHL's transcritas pelo gene *LuxL*, onde, as moléculas sintetizadas são liberadas e detectadas por outras bactérias da colônia.<sup>2,7</sup> A detecção dos sinais externos é realizada através de receptores da superfície bacteriana que permitem a entrada das moléculas compartilhadas e, após entrarem, as moléculas, agregam-se à proteína transcrita pelo gene *LuxR*, sendo o produto da sua interação a estabilidade proteica para ativar o *operon* que libera novos autoindutores a partir de *LuxL* e *Luciferases* a partir do gene *luxCDABE*.<sup>2,7</sup> A partir da análise bibliográfica, foi notado que a utilização de QS nos tratamentos demonstra possibilidade no enfrentamento preciso contra os microrganismos e, tanto em pacientes com doenças crônicas quanto em infecções agudas, a inibição de *Quorum sensing* e biofilme através de novos métodos podem ser de grande auxílio nos tratamentos convencionais, bem como precursores dos novos.

## OBJETIVOS

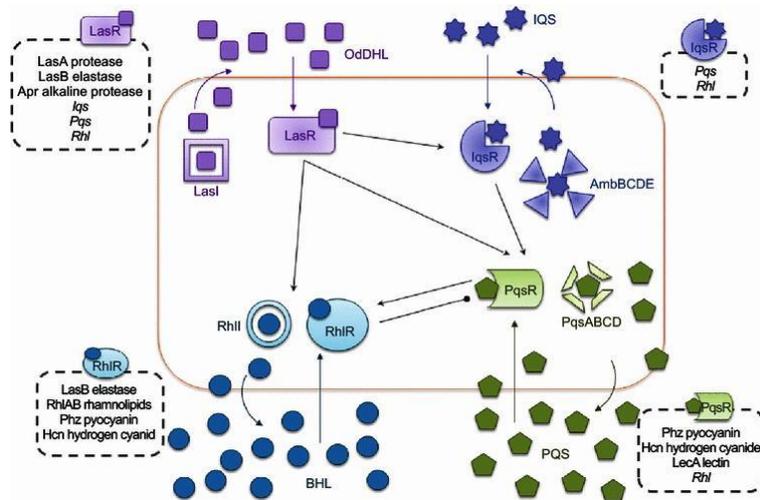
Avaliar os fatores inibitórios do *Quorum sensing* e sua relação com o biofilme.

## METODOLOGIA

A metodologia utilizada para a realização do presente estudo foi baseada na revisão literária de artigos científicos disponíveis em algumas das principais plataformas de divulgação, sendo elas: PUBMED, SciELO, e demais revistas e livros relacionados à microbiologia e biologia molecular. As palavras-chave utilizadas para a busca foram: *Quorum sensing*, comunicação bacteriana, inibição da comunicação, autoindutores, bioluminescência e biofilme.

## DESENVOLVIMENTO

Além dos processos de bioluminescência, QS também atua na expressão de fatores de virulência em colônias de *Pseudomonas aeruginosa* (**Figura 1**), bactérias estas que possuem uma diversidade de moléculas que, em conjunto e hierarquia<sup>4</sup>, atuam na expressão de fatores de virulência e de sobrevivência quando encontradas em hospedeiro infectado ou no meio-ambiente onde estão inseridas.<sup>3,4</sup> Apesar de semelhantes os mecanismos, em *P. aeruginosa* há uma diversidade maior de genes a serem transcritos quando necessário, sendo um exemplo os genes *LasA* e *LasB*, respectivamente, precursores de *Proteases* e *Elastases* que facilitam a infecção e sobrevivência da bactéria a partir da absorção do ferro.<sup>4</sup> Para a expressão de determinados fatores de virulência, *P. aeruginosa*, como descrito anteriormente, possui um sistema de sinalização dividido e hierárquico que trabalha em conjunto, sendo *Las* o sistema mais operante, possuindo a capacidade de interferir nas demais cascatas de sinalização.<sup>4</sup> Em *Las*, os autoindutores são transcritos pelo gene *LasL* e trabalham juntamente com a proteína do gene *LasR*, deste modo, possibilitando a expressão de *LasA*, *LasB* e outros genes dos sistemas *Rhl* e *Pqs* responsáveis pela sobrevivência e virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>4</sup>

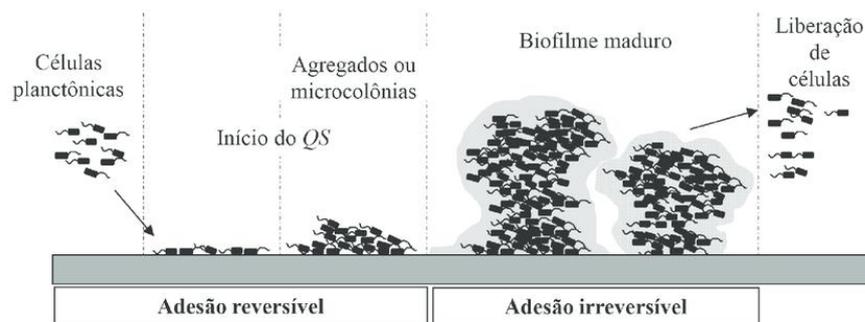


**Figura 1** – Rede hierárquica de *Quorum sensing* presente em *Pseudomonas aeruginosa*, sendo representados os genes e moléculas expressas na sinalização dos respectivos sistemas. Fonte: Lee and Zhang, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286720/>

Por ser um mecanismo amplamente distribuído entre microrganismos e apresentar papel fundamental na sobrevivência de bactérias, *Quorum sensing* abre oportunidade para novos tratamentos frente à constante necessidade dos mesmos, cuja atenuação da virulência das bactérias urge conforme adquirem resistência aos tratamentos convencionais.<sup>9</sup> Estudos sugerem que tratamentos híbridos utilizando a inibição de QS e fármacos podem ser uma saída em potencial no desenvolvimento de novas terapias, tornando possível o controle da virulência e acentuando o resultado em cada paciente, visto que a inibição de QS impede a comunicação e, conseqüentemente, a transcrição de genes com potencial de prejudicar o tratamento.<sup>9</sup> O biofilme, processo intimamente ligado a QS e que confere virulência às bactérias capazes de formá-lo em infecções<sup>3</sup>, é um dos mecanismos que porventura pode ser combatido através de terapias conjuntas<sup>9</sup> e, em pacientes com doenças crônicas cuja infecção possui alto índice de letalidade, o impedimento na comunicação dos microrganismos e o bloqueio da expressão de fatores de virulência podem tornar a recuperação facilitada e melhorar a qualidade de vida do indivíduo.<sup>9</sup>

Sendo produto da expressão de genes específicos, o biofilme possui grande participação na sobrevivência bacteriana, não somente conferindo virulência a bactérias como *P. aeruginosa* em infecções<sup>4,10</sup>, como permitindo a sobrevivência dos microrganismos em situações de estresse, carência nutricional e demais outros fatores externos do ambiente no qual estão inseridos<sup>10</sup>. Quando em seu habitat natural ou meio artificial, as bactérias capazes de formar biofilme se aderem às superfícies para adquirirem nutrientes e proteção, iniciando o processo que será capaz de proporcioná-las a estabilidade necessária para sua sobrevivência através de uma série de mecanismos.<sup>10,11</sup>

A formação do biofilme (**Figura 2**) acontece em etapas, começando com a adesão de um pequeno grupo de microrganismos numa determinada superfície, em seguida, é iniciada a comunicação entre as bactérias colonizadoras e realizada síntese de polissacarídeos fundamentais à formação da matriz.<sup>10</sup> A formação da matriz primária é seguida do desenvolvimento da colônia, onde há crescimento bacteriano e aumento da matriz e, ao final do processo, acontece a dispersão ativa dos microrganismos, podendo também ser relacionada a fatores ambientais.<sup>(10)</sup> Quando formado, o biofilme é capaz de gerar proteção contra danos às bactérias em seu interior e difundir nutrientes<sup>(11)</sup> fundamentais ao crescimento das mesmas, tornando a prevalência elevada em ambientes com carência ou disponibilidade nutricional mínima.<sup>10,11</sup>



**Figura 2** – Etapas do desenvolvimento do biofilme, demonstrando a adesão e formação da estrutura, bem como a utilização da rede *Quorum sensing*. Fonte: Adaptado de Macedo and Abraham, 2019

Dentre os ambientes em que o biofilme pode ser encontrado, os que possuem nutrientes limitados podem ser propensos ao crescimento destes respectivos microrganismos, bem como no meio hospitalar em cateteres contaminados e pacientes com doenças crônicas como a fibrose cística.<sup>10,11</sup> O biofilme nos casos de contaminação ou colonização em hospedeiros infectados pode dificultar o tratamento e até mesmo ser letal, visto que sua disseminação em pacientes com fibrose cística impede a penetração acentuada dos antibióticos empregados nas terapias convencionais.<sup>11</sup> Além de dificultar a penetração de antibióticos, alguns genes reguladores de bombas de efluxo podem ser positivamente afetados na presença de biofilme, bem como o ganho da resistência aos antibióticos através da disseminação de plasmídeos através da matriz.<sup>11</sup> Visto que o biofilme, intimamente ligado ao *Quorum sensing* e a virulência de bactérias<sup>4</sup> possui tamanha relevância no resultado dos tratamentos atuais, a inibição de ambos se torna indispensável no desenvolvimento de novos tratamentos, havendo necessidade da criação de novas terapias envolvendo mecanismos de inibição da detecção dos autoindutores e agentes anti-biofilme, podendo haver também a sua aplicação em conjunto com os antibióticos já conhecidos pela indústria e usados nos tratamentos atuais.

## RESULTADOS

### Fatores de Inibição de *Quorum sensing*

Quando necessária, a comunicação bacteriana permite que haja expressão de genes que possibilitam a sobrevivência da colônia, e por meio de autoindutores que atravessam a membrana das bactérias é realizada a síntese de biofilme e demais fatores de virulência que direcionam esses microrganismos.<sup>10</sup> A captação desses sinais é realizada por receptores específicos de cada bactéria e podem ser usados também como alvo na inibição de QS, bem como o bloqueio dos sinais através de enzimas, moléculas produzidas por outras bactérias ou demais técnicas que realizem a inibição do mecanismo e seus derivados, sendo denominados de acordo com sua funcionalidade: inibidores de *Quorum sensing* (QSI - Quorum Sensing Inhibitor) e extinção de *Quorum* (QQ - Quorum Quencher).<sup>13</sup>

Para a inibição da comunicação, o uso de enzimas pode ser escolhido para determinados tipos de moléculas expressas por bactérias, gerando a sua degradação ou inativação.<sup>12,13</sup> Os sinais liberados pelas bactérias podem ser degradados através do uso de enzimas que clivam em locais específicos dos autoindutores, de modo que as moléculas sejam inativadas e se tornem incapazes de agir na colônia. Por serem capazes de clivar a porção de ligação amida das moléculas, AHL-lactonases e AHL-acilases degradam moléculas e impedem a comunicação, havendo limitação também em fatores de virulência.<sup>12</sup> Outro exemplo de degradação de sinais pode ser observado também na natureza, onde bactérias como *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* possuem a capacidade de produzirem moléculas homólogas, cuja finalidade é atuar como mecanismo de defesa contra invasores.<sup>13</sup>

O bloqueio dos sinais também pode ser realizado a partir de soluções não-enzimáticas, as quais possuem finalidade de bloquear a captação dos sinais através dos receptores.<sup>13</sup> A inibição acontece a partir de moléculas análogas naturais ou sintetizadas que possuem capacidade de bloquear os sinais recebidos, por exemplo, a produção de furanonas halogenadas por *Delisea pulchra* que atuam como antagonistas de QS, inibindo AHLs através de deslocação.<sup>12,13</sup> Demais modificações e análogos de furanonas podem ser utilizados como inibidores, demonstrando efetividade na redução da patogenicidade em ratos infectados com *P. aeruginosa*, inibição da formação de biofilme em *S. epidermidis* e atividade significativa em colônias de *E. coli*.<sup>12,13</sup>

Além de serem produzidas de forma sintética ou naturalmente por bactérias como mecanismo de defesa, as moléculas que possuem a capacidade inibitória podem ser encontradas também em plantas rotineiramente observadas.<sup>12,13</sup> Um exemplo de potencial inibitório é o extrato de alho, tendo a capacidade de controlar a expressão de genes responsáveis por *Quorum*

*sensing* em *P. aeruginosa* e podem auxiliar no tratamento com antibióticos através de sua interação com o biofilme, tornando-o mais susceptível ao tratamento.<sup>13</sup>

### **Fatores de Inibição do biofilme**

O crescimento do biofilme possui uma série de implicações na natureza, sendo de suma importância para as bactérias em ambientes hostis<sup>10</sup> e, quando submetidas a tratamentos com antibióticos, o biofilme pode gerar maior resistência e prevalência às bactérias.<sup>14</sup> Quando formado, possibilita que as bactérias permaneçam por um período maior de tempo no ambiente que estão inseridas, tornando vantajoso o uso de agentes antibiofilme para lidar com esse tipo de virulência e inibir a prevalência bacteriana. Os agentes antibiofilme, de forma similar aos inibidores de *Quorum sensing*, podem ser encontrados naturalmente ou produzidos de forma sintética,<sup>14,17</sup> atuando de forma direta ou indiretamente na produção do biofilme<sup>15</sup>.

Um dos mecanismos encontrados é a clivagem por enzimas, sendo um alvo o peptidoglicano presente na parede celular das bactérias que gera efeitos inibitórios ao biofilme quando clivado.<sup>17</sup> O galato de epigalotequina, composto encontrado naturalmente no chá-verde, possui a capacidade de ligar-se ao peptidoglicano e causar morte as bactérias através de danos a membrana, impedindo a ancoragem e, conseqüentemente, a formação do biofilme.<sup>17</sup> Danos à parede celular podem ser observados também a partir das reações entre hidrolases de bacteriófagos, cujas endolisinas expressas possuem a capacidade de causar danos à parede celular e lise hipotônica, porém, por serem específicos a cada bactéria, dependem da identificação do microrganismo para que o tratamento seja eficaz.<sup>17</sup> Por serem capazes de gerar efeitos adversos, os fagos ainda não são empregados nos tratamentos hospitalares, porém, possuem capacidade promissora para terapias contra biofilme.<sup>14</sup>

Não só na formação do biofilme estão concentrados os fatores inibitórios, mas também quando já formada pelas bactérias, a matriz pode ser degradada<sup>14</sup> e possui grande relevância nos tratamentos, visto que atua de forma conjunta com diversos outros fatores relacionados à resistência bacteriana ao tratamento empregado, atuando em conjunto com as bombas de efluxo bacterianas, por exemplo.<sup>16</sup> A degradação da matriz pode ser obtida através de enzimas que degradam o DNA extracelular<sup>14,17</sup>, sendo a atuação das DNases um fator que possibilita a penetração de antibióticos e, em bactérias patogênicas como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *V. cholerae*,  $\alpha$ -amilase possui a capacidade de inibir a formação do biofilme e degradar matrizes já formadas.<sup>14</sup> A atividade antibiofilme, apesar de possuir caráter específico para determinados tipos de bactérias<sup>17</sup>, pode ser observada em diversas moléculas in vitro, possibilitando a avaliação das mesmas como potenciais alternativas em tratamentos contra bactérias e o combate à formação do biofilme, apresentando até 86% de inibição<sup>17</sup> e, deste modo,

possivelmente poderão ser utilizadas em novas terapias ou fármacos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Terapias envolvendo *Quorum sensing* e seus inibidores possuem potencial significativo na área clínica, sugerindo não só uma opção alternativa de tratamento, mas possibilitando o enfrentamento de microrganismos de forma efetiva e, conseqüentemente, a recuperação do paciente com doenças crônicas. A utilização de mecanismos já presentes nas bactérias possibilitam uma precisão nos tratamentos e, em alguns casos, podem evitar o uso de altas concentrações de antibióticos. Além da inibição de QS, o biofilme também é um obstáculo em determinados tratamentos, havendo necessidade de novas terapias inibitórias que permitam a ação dos outros fármacos, evitando a contribuição na resistência dos microrganismos a partir da utilização de grandes quantidades de antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- 1- Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial Quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*. 2019 Apr 3;17(6):371–82.
- 2- Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. Garsin DA, editor. *mBio*. 2018 Jul 5;9(3).
- 3- Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 Nov 17;21(22):8671. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7698413/>
- 4- Lee J, Zhang L. The hierarchy Quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*. 2014 Sep 25;6(1):26–41.
- 5- Steindler L, Venturi V. Detecção de moléculas de sinal de N -acil homoserina lactona com detecção de Quorum por biossensores bacterianos, *FEMS Microbiology Letters* , Volume 266, Issue 1, January 2007, Pages 1–9, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00501.x>
- 6- Williams P, Cámara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, et al. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. Smith H, Dorman CJ, Dougan G, Holden DW, Dougan G, Williams P, editors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2000 May 28;355(1397):667–80.
- 7- Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018;16:551–64.
- 8- Cámara M, Williams P, Hardman A. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002 Nov;2(11):667–76.
- 9- Nadar S, Khan T, Patching SG, Omri A. Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms*. 2022 Jan 27;10(2):303.

- 10- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buck DH, Stahl DA. Ecosistemas microbianos. In: Microbiologia de Brock 14 ed. Porto Alegre: Artmed; 2016. p. 600–5.
- 11- Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry*. 2015 Mar;7(4):493–512.
- 12- Haque S, Ahmad F, Dar SA, Jawed A, Mandal RK, Wahid M, et al. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance. *Microbial Pathogenesis* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2020 May 29]; 121:293–302.
- 13- Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial Quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* [Internet]. 2013 Apr 1;8(1):68–83.
- 14- Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*. 2013 Jul;8(7):877–86.
- 15- Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiology* [Internet]. 2015;10(11):1743–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517598/>
- 16- Soto SM. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* [Internet]. 2013 Apr;4(3):223–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711980/>
- 17- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* [Internet]. 2017 Mar 31;9(1):522–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5955472/>

## CONTATO

Vinícius Freitas de Oliveira: [vifreitas159@hotmail.com](mailto:vifreitas159@hotmail.com)