

COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN BACTERIAS: CONVERSACIONES ENTRE ESPECIES

Marlen Barreto R., (Q. F.)
Dr. Patricio Retamal M. (M.V.; M.Sc.)

Introducción

En los organismos pluricelulares se desarrolla una inmensa variedad de conexiones y comunicaciones entre las células que los constituyen, generándose procesos complejos y coordinados que les permiten sobrevivir como tales. En toda la fisiología de estos individuos se encuentran ejemplos de la comunicación intercelular, destacando el sistema inmune con la existencia de citoquinas que permiten la acción ordenada de sus componentes para la eliminación de un agente extraño, el sistema endocrino que a través de las hormonas es capaz de regular el desarrollo y metabolismo de los tejidos, y el sistema nervioso que a través de los neurotransmisores es capaz de detectar, transmitir y responder a señales específicas.

¿Y que pasa en el mundo de las bacterias?. Muchas especies de bacterias controlan la expresión de diversos genes en comunidades de microorganismos a través de la producción, secreción y detección de moléculas de señalización extracelular, conocidas como autoinductores (AIs), que se acumulan en el ambiente en relación a la densidad celular. Este proceso es denominado "quorum sensing" (QS) y se gatilla cuando la señal alcanza una concentración umbral estimuladora. Los primeros estudios en esta área comenzaron con la expresión de bioluminiscencia en las bacterias marinas *Vibrio fischeri* y *V. harveyi*. En estas especies, a mayor densidad poblacional mayor es la acumulación extracelular del AI, el que a cierta concentración umbral será capaz de activar a las mismas bacterias para que comiencen a expresar una proteína luminiscente. Estas fueron las primeras

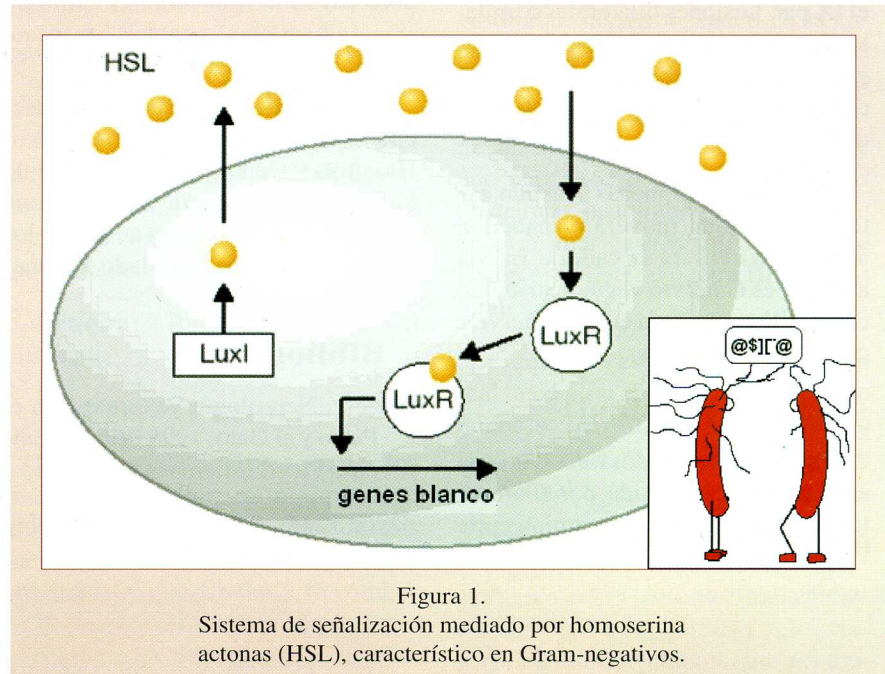


Figura 1.

Sistema de señalización mediado por homoserina actonas (HSL), característico en Gram-negativos.

evidencias que asociaban expresión génica con densidad poblacional, ya que posteriormente se estableció como un mecanismo común de comunicación entre microorganismos de muchas especies gram positivas y gram negativas.

Si son organismos unicelulares ¿que utilidad les significaría tener algún tipo de comunicación?

Desde la expresión de bioluminiscencia en bacterias marinas, se descubrió que el QS regulaba procesos tan variados como la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa*, expresión de genes de virulencia en *Escherichia coli*, producción de antibióticos en *Photorhabdus luminiscences*, competencia en *Bacillus subtilis*, crecimiento en *B. anthracis*, y muchos otros eventos en diversas especies bacterianas. El análisis de tales fenómenos ha estable-

cido de manera muy interesante, que cada una de estas respuestas al QS le permiten a la comunidad completa de microorganismos adaptarse mejor a su entorno, optimizando la sobrevivencia de los mismos.

A lo largo de la vida de una célula bacteriana existirán muchas moléculas que serán eliminadas al espacio extracelular, como desechos metabólicos, toxinas, iones, bacteriocinas, etc. Entonces es posible pensar que cualquiera de estos elementos se convertirán potencialmente en AIs, especialmente cuando existan muchas bacterias coexistiendo en un mismo ambiente. Sin embargo, la situación es un poco más compleja ya que se han definido algunos requisitos que deben cumplir las moléculas de QS para ser consideradas como tales:

- La producción de la señal debe

ocurrir en etapas específicas del crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a cambios ambientales.

- La señal se acumula en el espacio extracelular y es reconocida por un receptor específico.
- La acumulación de la señal genera una respuesta concertada, una vez que el nivel umbral de su concentración se ha alcanzado.
- La respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos requeridos para metabolizar o detoxificar la señal.

Tipos de autoinductores

Hasta hace unos años se pensaba que cada especie bacteriana producía y respondía a una única señal de QS. Sin embargo, en la actualidad se conocen moléculas cuya producción es compartida por un gran número de especies bacterianas, lo que sugiere al existencia de comunicación intra e inter-especies. Los autoinductores se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- Homoserina lactonas (HSLs), utilizadas por bacterias gram negativas. La producción de estas señales se realiza por las LuxI sintetasas y su detección depende de activadores transcripcionales del tipo LuxR (Figura 1).
- Oligopéptidos, moléculas de señalización utilizadas por las bacterias gram positivas, cuya síntesis depende de la expresión de genes codificantes de péptidos precursores que se procesan, modifican y exportan a través de sistemas de eflujo del tipo ABC, y son detectados a través de sistemas de dos componentes (Figura 2).
- Moléculas de furanosil borato diéster, también conocidas como AI-2. Este autoinductor se ha des-

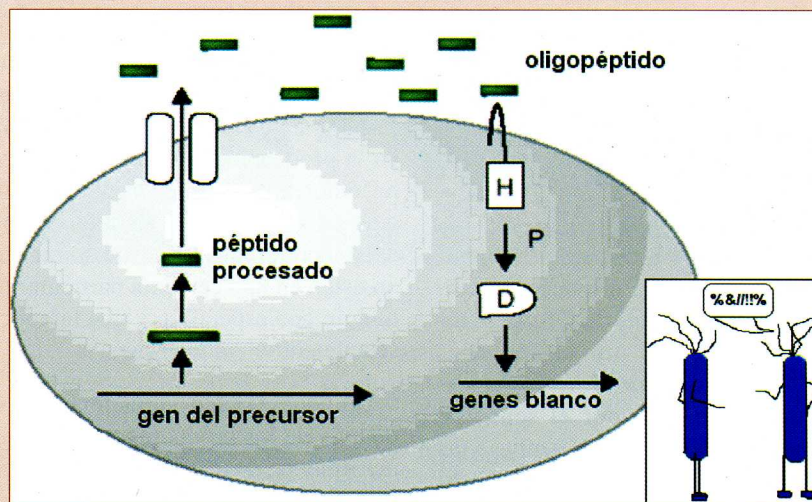


Figura 2. Sistema de señalización mediado por oligopéptidos, característico en Gram-positivos.

crito recientemente, y se sintetiza por una amplia variedad de bacterias gram positivas y gram negativas. En cada caso su producción requiere de una proteína conocida como LuxS y, a diferencia de los autoinductores HSLs y oligopéptidos, la vía biosintética y los intermediarios químicos de la producción de AI-2 son idénticos en todas las bacterias que la producen. Estos hallazgos han llevado a proponer a este autoinductor

como una señal universal que funciona en la comunicación intra e inter-especies (Figura 3).

Aunque se pueden abordar múltiples ejemplos de QS, resulta interesante destacar el efecto de este proceso en el desarrollo de una enfermedad. Las conversaciones mediadas por el gen luxS y aquellas que ocurren al interior de una biopelícula serán el enfoque de este artículo.

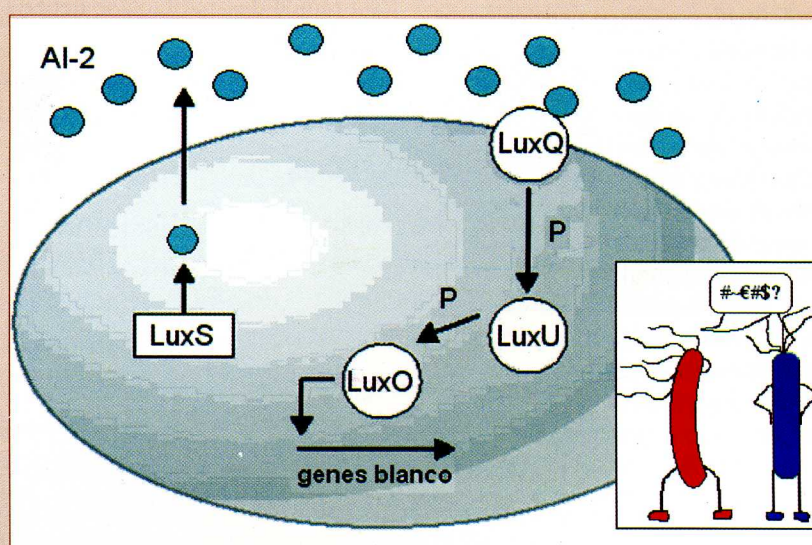


Figura 3. Sistema de señalización mediado por el autoinductor 2 (AI-2), que permite la comunicación entre especies bacterianas.

Conversaciones entre especies: el caso de LuxS

El primer sistema de comunicación intercelular dependiente de LuxS fue identificado en el microorganismo marino *V. harveyi*. En esta especie se han descrito dos vías de QS: el sistema 1, compuesto por el sensor 1 (LuxN) que responde al AI-1, y el sistema 2 compuesto por el sensor 2 (LuxQ) que detecta AI-2. Ambas vías de señalización funcionan en paralelo para controlar la expresión de bioluminiscencia y otros procesos celulares. AI-1 corresponde a una HSL y AI-2, como se mencionó anteriormente, a un furanosil borato diester. Cuando la densidad celular y la concentración de los AI es baja, los sensores funcionan como quinasas, conduciendo a la fosforilación de LuxO y a la represión del operón de luciferasa. En cambio, frente a una alta densidad celular los sensores se unen a sus señales y funcionan como fosfatasa, inactivando a LuxO y por tanto permitiendo la expresión de los genes de bioluminiscencia (Figura 3).

Una vez descubierto el gen luxS en *V. harveyi*, se realizaron análisis bioinformáticos de la secuencia de este gen buscando homología con secuencias genéticas de un amplio rango de microorganismos, incluyendo un número importante de especies patógenas. En total, 35 de las 89 secuencias bacterianas completas disponibles en la actualidad tienen este gen, aunque por pruebas de PCR se ha logrado detectar en una variedad de otras especies bacterianas para las cuales no existen secuencias

genómicas disponibles. En cada caso, si la bacteria produce AI-2 contiene luxS, y la inactivación de luxS elimina la producción de AI-2. Además se ha determinado que en general los genes luxS no residen en ninguna ubicación preferente del cromosoma, que no están en una cercanía particular de ningún gen específico y que tampoco se encuentran en operones.

Aunque existen variaciones en el tamaño de los productos de luxS (generalmente de 160 aminoácidos), se han definido aquellas regiones esenciales y conservadas entre los distintos géneros procariontes. Con las secuencias proteicas de 18 LuxS reportados, se realizó un análisis filogenético de esta proteína y se determinaron dos grupos principales, discriminando en la mayoría de los casos las especies gram-positivas de las gram-negativas. La secuencia del gen luxS no tiene homología con ningún otro gen involucrado en la producción de autoinductores.

En la mayoría de las bacterias la actividad extracelular de AI-2 es máxima durante la segunda mitad de la fase de crecimiento exponencial y declina abruptamente en la fase estacionaria. Esta rápida desaparición se debería a

que la acumulación de la señal en la fase estacionaria induce la expresión de genes que codifican un sistema transportador del tipo ABC, encargado de llevar AI-2 al interior de la célula. No se conoce con certeza el objetivo del comportamiento transitorio de la señal, pero se cree que determina una cascada de conductas de aparición diferencial. También se ha postulado algún papel en la interferencia de la comunicación entre otras especies bacterianas.

Diversos patógenos poseen el sistema de QS dependiente de LuxS, capaz de mediar la expresión genes asociados a virulencia. Tal conclusión ha surgido de estudios con bacterias mutantes, las que en presencia de AI-2 o de luxS, sean estos de la misma especie bacteriana o de otra distinta, son capaces de recuperar su fenotipo patógeno perdido con la mutación. De esta manera se han identificado múltiples efectos de este sistema de QS en la virulencia de los microorganismos que lo poseen (Cuadro 1). Considerando los hallazgos de varios estudios relacionados, se ha sugerido que distintas especies bacterianas son capaces de detectar y responder a una señal LuxS heteróloga, consistente con el papel de

**CUADRO 1.
ALGUNAS FUNCIONES CONTROLADAS POR LUXS EN BACTERIAS.**

ESPECIES	FUNCIÓN
<i>Clostridium perfringens</i>	Factores de virulencia: toxinas alfa, kappa y theta
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Factores de virulencia: hemolisina
<i>Bacillus anthracis</i>	Crecimiento
<i>Bacillus subtilis</i>	Formación de biopelículas
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Leucotoxina, transporte de hierro.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Factores de virulencia: captura de hierro.
<i>Neisseria meningitidis</i>	Infección sistémica
<i>Vibrio cholerae</i>	Factores de virulencia : toxina del cólera
<i>Escherichia coli</i>	División celular, motilidad, morfología, quimiotaxis
<i>Salmonella enterica</i>	Sistema de transporte tipo ABC, biopelículas.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Motilidad

AI-2 como una molécula de señalización inespecífica.

Un nuevo antecedente surge de un trabajo reciente en que se comprueba la presencia de AI-2 en muestras de heces humanas y en sobrenadante de cultivos de flora intestinal humana, sugiriendo que esta molécula se encuentra normalmente en el ambiente intestinal. A través de este hallazgo es posible pensar que algunas bacterias intestinales, comensales o patógenas, pueden detectar esta señal y en respuesta activar genes que favorezcan su adaptación al medio o la generación de una enfermedad, según corresponda.

Pero esto parece ser solo una pequeña parte de las funciones de LuxS, ya que esta enzima está involucrada en la síntesis de otra molécula de señalización, denominada AI-3, responsable en *E. coli* enterohemorrágica de la activación de genes de la isla de patogenicidad LEE y del flagelo. Por si fuera poco, se ha visto que bacterias mutantes en luxS son capaces de reestablecer su fenotipo de virulencia en presencia de AI-3 y también en presencia de epinefrina. Este hallazgo, sumado al hecho de que tanto los antagonistas α como β adrenérgicos son capaces de bloquear esta señalización, han llevado a plantear que AI-3 y la hormona mamífera epinefrina están participando en la comunicación entre la bacteria y su hospedero, toda una revelación para la investigación en el ámbito de la comunicación intercelular. Aparentemente AI-3 también es sintetizado por bacterias de la flora intestinal, ya que sobrenadantes de cultivos de esta flora activan la transcripción de los genes LEE.

El espectro de acción de los autoinductores se extiende más allá del QS bacteriano, ya que se ha reportado la participación de estas moléculas en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, actuando como un factor de virulencia intrínseco. Se ha observado que en *P. aeruginosa*, un AI

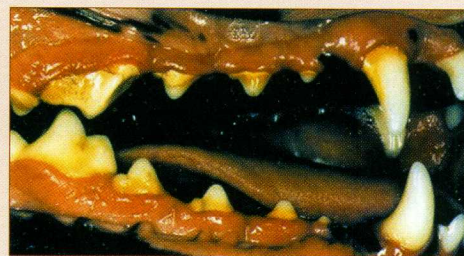
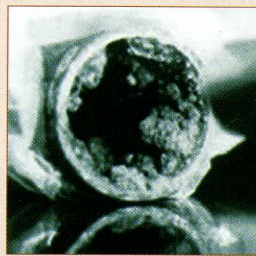


Figura 4.
Ejemplos de biopelículas. A la izquierda se muestra una biopelícula al interior de un ducto d

del grupo de HSLs es capaz, según su concentración, de estimular o inhibir la producción de anticuerpos desde esplenocitos, inhibir la proliferación de linfocitos T, estimular la secreción de IgE por linfocitos B humanos, e inhibir la producción de interleuquina 12 y del factor de necrosis tumoral a por parte de macrófagos peritoneales. Este efecto inmunomodulador de la HSL en *P. aeruginosa*, desemboca finalmente en una respuesta inmune del tipo Th-2 en vez de la respuesta protectora del tipo Th-1.

Este tipo de interacciones agente-hospedero también se ha reportado en plantas, ya que se ha observado la capacidad de una leguminosa (*Medicago truncatula*) de detectar HSLs bacterianas, respondiendo con cambios en la expresión de más de 150 proteínas según la estructura, concentración y tiempo de exposición a la señal de QS.

Conversaciones entre especies: el caso de las biopelículas

Por mucho tiempo el estudio de bacterias se ha hecho a partir de cultivos líquidos, donde se encuentran en suspensión (células planctónicas), describiendo a partir de ellos su fisiología y genética. Pero el redescubrimiento del fenómeno microbiológico descrito inicialmente por van

Leeuwenhoek, de que los microorganismos tienen la capacidad de unirse y crecer sobre diferentes tipos de superficies expuestas, ha permitido establecer que las bacterias asociadas a superficies (biopelículas) poseen un fenotipo distinto con respecto a la transcripción génica y velocidad de crecimiento.

La biopelícula se ha definido entonces como una comunidad bacteriana irreversiblemente unida a una superficie y rodeada por una matriz de exopolisacáridos (EPS), formando una estructura definida. En una biopelícula, el EPS representa entre el 50 al 90% del carbono orgánico total presente y es considerado el material principal en la matriz de la misma.

La naturaleza de las biopelículas es muy variable, pudiendo estar constituidas por una sola especie bacteriana, o bien ser más complejas e involucrar a varias especies de microorganismos. Cualquiera sea el caso, la comunidad metabólica coopera como si se tratase de un organismo multicelular. Las diferentes especies viven en un nicho mínimo especializado. Si una especie genera residuos tóxicos, la otra está encargada de degradarlos, coordinándose los recursos bioquímicos de todos los organismos presentes en la biopelícula. En otras palabras, se reúnen y complementan las enzimas presentes en los diferentes organismos para degradar un compuesto que no podría metabolizar una sola especie.

Las superficies en las cuales pueden formarse las biopelículas son muy diversas, como por ejemplo tejidos vivos, sistemas de transporte y almacenamiento de fluidos, dispositivos médicos, rocas, metales, vidrio, etc. (Figura 4). Las biopelículas pueden ser beneficiosas o perjudiciales dependiendo de la superficie en la que se encuentren y la bacteria que lo componga.

Etapas de la formación de una biopelícula

Se conocen 5 estados de desarrollo de una biopelícula. La primera etapa consiste en la unión reversible de las células a la superficie; en la segunda etapa la unión es irreversible, donde se forma una monocapa bacteriana. En la tercera etapa las células están muy cerca unas de otras y se inicia la formación de microcolonias, y en la cuarta etapa ocurre la maduración de la biopelícula con la producción de EPS, generando la estructura final con la respectiva formación de canales de agua. La quinta etapa consiste en la dispersión de células a partir de la biopelícula, las cuales inician la colonización de una nueva superficie (Figura 5).

En una biopelícula madura las microcolonias poseen canales de agua a través de los cuales se transportan nutrientes, metabolitos, productos de desecho, enzimas y las moléculas de QS que permiten la comunicación entre sus habitantes. Estos AIs son esenciales para la comunidad, ya que controlan la expresión de genes involucrados en la mantención, maduración y disolución de la biopelícula, favorecen la producción de EPS y otras sustancias que las bacterias no producen habitualmente en un cultivo líquido.

En los últimos años, los estudios de biopelículas se han intensificado debido a la importancia clínica que estas tienen, colonizando tejidos vivos o implantes médicos y participando en

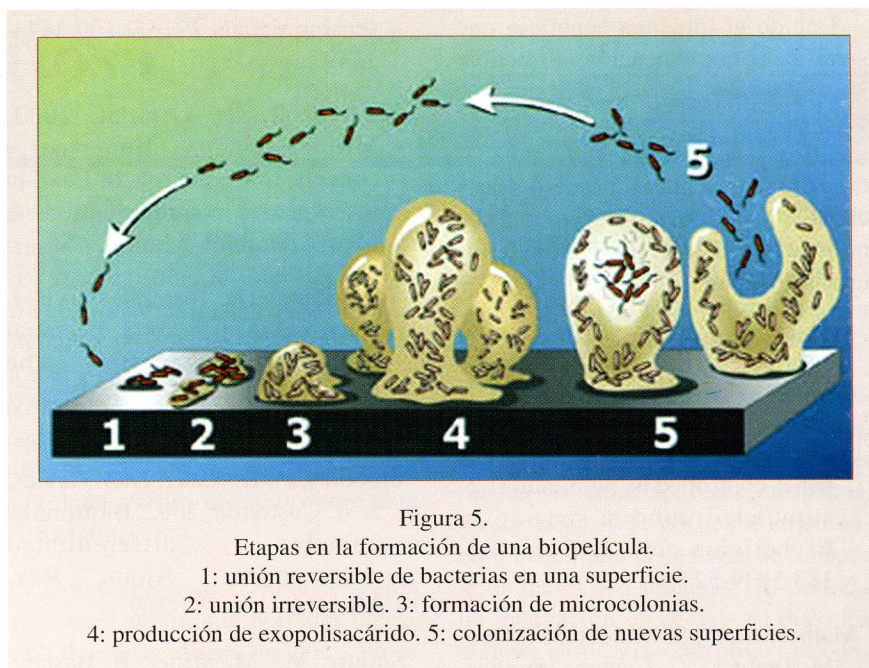


Figura 5.

- Etapas en la formación de una biopelícula.
- 1: unión reversible de bacterias en una superficie.
 - 2: unión irreversible. 3: formación de microcolonias.
 - 4: producción de exopolisacárido. 5: colonización de nuevas superficies.

el desarrollo de cuadros crónicos tales como otitis media, neumonía, infecciones urinarias, etc. En una comunidad de este tipo, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos. Por lo tanto, los pacientes no responden adecuadamente a tratamientos antibióticos y sufren episodios recurrentes de la enfermedad. Esto se debe a que las bacterias en una biopelícula pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias en un medio líquido. Esta resistencia puede explicarse por 3 hipótesis que no son necesariamente excluyentes. 1: el antibiótico penetra la biopelícula pero no alcanza concentraciones suficientes en algunas partes de la misma. 2: las células ubicadas en la base de la biopelícula son metabólicamente inactivas, y por eso resistentes al ataque por antibióticos. 3: en la biopelícula existen mecanismos de degradación de antibióticos lo que no permite que se alcancen concentraciones efectivas.

El adecuado conocimiento de los procesos involucrados en la formación de biopelículas permitirá generar mejores estrategias para combatirlas. Por este motivo, los estudios actuales están enfocados a bloquear las señales de comunicación intercelular, ya que estas gatillan o favorecen la expresión de genes involucrados en la expresión de EPS y en definitiva, en la formación de biopelículas.

En conclusión, el mecanismo de quorum sensing es un tema emergente, cuya acción relaciona estrechamente el estado metabólico de las poblaciones bacterianas con la señalización intercelular. Los antecedentes que se han publicado dejan en evidencia la complejidad de la comunicación entre organismos unicelulares, generando de paso un mundo de incógnitas por resolver, principalmente en relación al papel que tienen las moléculas de señalización en la adaptación de las bacterias a su ambiente, en la comunicación que se puede generar entre la bacteria y su hospedero y en las enfermedades cuya causa es en último término, el desarrollo de QS entre los patógenos.

Debido al inmenso beneficio que significa la comunicación, es factible suponer que todas las especies bacterianas existen gracias a los sistemas de QS que poseen, en lo que claramente representa un proceso seleccionado y perfeccionado durante los millones de años de evolución de los microorganismos.

Bibliografía

DeLisa, M., C. Wu, L. Wang, J. Valdes, W. Bentley. 2001. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:5239-5247.

Mathesius, U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anolles, B. Rolfe, W. Bauer. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-

sensing signals. *PNAS.* 100:1444-1449.

McNab, R., R. Lamont. 2003. Microbial dinner-party conversations: the role of LuxS in interspecies communication. *J. Med. Microbiol.* 52:541-545.

Sperandio, V., A. Torres, B. Jarvis, J. Nataro, J. Kaper. 2003. Bacteria-host communication: The language of hormones. *PNAS.* 100:8951-8956.

Stoodley, P., K. Sauer, D.G. Davies, J. W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209

Surette, M., M. Miller, B. Bassler. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Vibrio harveyi* :

A new family of genes responsible for autoinducer production. *PNAS.* 96:1639-1644.

Xavier, K., B. Bassier. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 191-197.

Marlen Barreto R., (Q. F.)
Candidata a Doctor en Cs. Biológicas,
Mención Microbiología.
Laboratorio de Bioinformática
y Biología Genómica,
Facultad de Química y Biología,
Universidad de Santiago.
Dr. Patricio Retamal M. (M.V.; M.Sc.)
Departamento de Medicina
Preventiva Animal.
Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias,
Universidad de Chile.

Sitio Web Favet

www.veterinaria.uchile.cl

The screenshot shows the homepage of the website 'www.veterinaria.uchile.cl'. At the top, it identifies the 'Universidad de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias'. Below this, there are navigation tabs for 'Admisión', 'Asignaturas y Pregrado', 'Historia Cs. Veterinarias', 'Organigrama Facultad', 'Plano Facultad', and 'Teléfono y Email'. The main content area is divided into several sections: 'Secciones destacadas' with links to 'Perfeccionamiento' and 'Sitios Web de Cursos'; 'Vet-Noticias' featuring 'Curso Centro de Estudios de la Carne II' and 'Perfeccionamiento al Productor'; 'Artículos de interés' with 'X Simposio Internacional de Epidemiología y Economía Veterinaria'; 'Exámenes de Pregrado' listing 'Sita, Macarena Rodríguez Valenzuela'; and 'Noticias de Pregrado' mentioning 'Convocatoria para alistar exámenes'. There are also advertisements for 'Mundo Granja', 'MIXES EN CERCAS VETERINARIAS', 'UNIDAD DE GENÉTICA Y MEJORAMIENTO ANIMAL', and 'TecnoVet'. The footer includes contact information for the 'Dirección de Extensión Favet'.

- Artículos On-line de Congresos y Jornadas
- Entérate de los Congresos, Jornadas y Congresos Favet
- Información de las actividades de perfeccionamiento de la facultad
- Artículos On-line de la Revista "Avances en Ciencias Veterinarias"



Suscríbete a la REVISTA TECNOVET completando la ficha ubicada en el sitio.

Contacto Sitio Web: webfavet@uchile.cl