



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARVACROL COMO INHIBIDOR DE COMUNICACIÓN
INTERCELULAR RESPONSABLE DE LA FORMACIÓN
DE BIOPELÍCULAS DE *Pseudomonas aeruginosa***

Por:

Melvin Roberto Tapia Rodríguez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

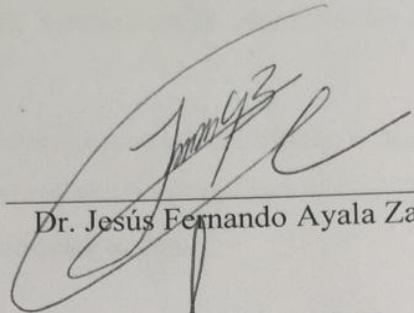
Hermosillo, Sonora.

Mayo 2018

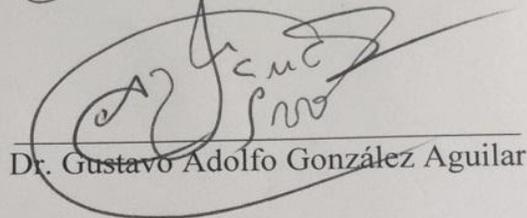
}+

APROBACIÓN

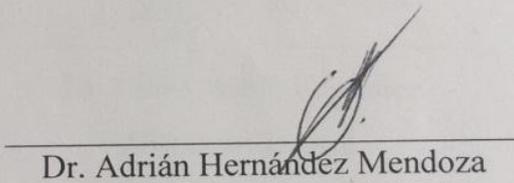
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del M.C. Melvin Roberto Tapia Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



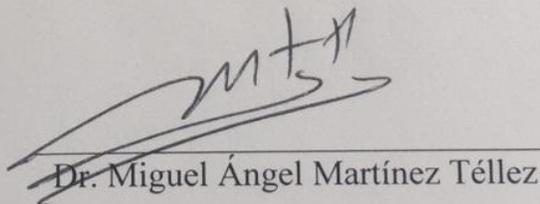
Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar



Dr. Adrián Hernández Mendoza

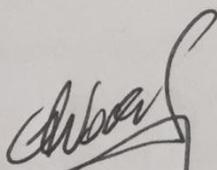


Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de doctorado en ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) por permitirme formar parte de esta institución y realizar mi formación profesional desde mis estudios de maestría y ahora lograr concluir esta importante etapa como Doctor en Ciencias.

Al proyecto CB-2013-01-222691 “Caracterización y evolución de carbohidratos y metabolitos señal en biopelículas de bacterias patógenas expuestas a antimicrobianos de origen vegetal” financiado por el fondo de ciencia básica del CONACYT.

Al personal de la Coordinación de Programas Académicos, en especial a Argelia Marín, M.E. Verónica Araiza y M.E. Laura García, gracias por todo su apoyo durante este tiempo.

A mi comité de tesis, Dr. Gustavo González Aguilar, gracias por sus observaciones y recomendaciones durante la realización de este trabajo; Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez, siempre le estaré agradecido por la disponibilidad y confianza que me brindo para trabajar en su laboratorio durante este tiempo; Dr. Adrián Hernández Mendoza, gracias por todas las asesorías y atenciones brindadas sin importar día y hora en el que le planteara mis dudas.

Quiero agradecer especialmente a la persona que fue mi asesor durante estos últimos años, al Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, le estaré eternamente agradecido por todo el tiempo e infinita paciencia que usted con la mejor disposición invirtió en mí para culminar esta etapa. Asimismo, por aceptarme en su grupo de trabajo y permitirme aprender cómo ser un buen investigador involucrándome en publicaciones, proyectos, congresos, talleres, etc. Siempre le estaré agradecido por su apoyo incondicional y amistad brindada. Espero de todo corazón poder seguir colaborando con usted. Muchas gracias doc.

Al M.C. Reynaldo Cruz, por todas las experiencias y los consejos compartidos durante este tiempo, muchas gracias por haber estado ahí cuando lo necesite.

A la M.C Brenda Silva, no tengo palabras suficientes para agradecerle por todo lo que me ha escuchado y ayudado durante estos últimos cuatro años, gracias por todo. Siempre recordaré que todo se oye en su oficina.

A la Q.B. Mónica Villegas, muchas gracias por todos los consejos y sugerencias durante este tiempo, espero poder seguir yendo a tu oficina a platicar cuando la ocasión lo amerite.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar la etapa experimental de este trabajo, agradezco al personal y estudiantes que me facilitaron mi estancia durante estos años. Especialmente a la Q.B. María del Carmen Granados (Pame), Biól. Georgina Vargas, M.C. Elizabeth Peralta y Biól. Gricelda García, muchas gracias por la convivencia y tazas de café durante este tiempo.

A las Doctoras Filomena Nazzaro y Florinda Fratianni, por sus atenciones en la estancia que realicé en el laboratorio de biotecnología de los alimentos en el Istituto di Scienze dell' Alimentazione en Avellino, Italia. Gracias por hacer más amena mi visita y tener paciencia para explicarme las cosas.

Al Dr. Gustavo Velderrain, por ser mi mejor amigo durante estos años de posgrado y que a pesar de nuestras diferencias y particular amistad, siempre me has acompañado y apoyado a tu manera desde que te conocí en la universidad. Sin tu ayuda esto no hubiera sido igual y espero que la vida nos permita seguir coincidiendo en un futuro, pero ahora como colegas.

Al Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, M.C. Ramón Pacheco, M.C. Jacqueline Ruiz y M.C. Alejandra Preciado, muchas gracias por la convivencia y compañerismo. Además, por la confianza y disponibilidad de su tiempo para permitirme trabajar en el laboratorio y ayudarme con los experimentos en el UPLC.

Al Laboratorio de Tecnologías Emergentes, M.C. Thalía Bernal, M.C. Francisco Vázquez, M.C. Melissa Gutiérrez, Ing. Jesús Luna y Dr. Luis Ortega. Gracias por la amistad y confianza brindada durante este tiempo. Siempre recordare todos los momentos que compartimos. Definitivamente los extrañare bastante y son más que compañeros de trabajo con aprecio para mí, fue un gusto poder formar parte de este grupo de trabajo y colaborar con ustedes.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, Q.B. Olivia Briceño, Q.B. Francisco Soto, M.C. Cristóbal González y especialmente al M.C. Emmanuel Aispuro, muchas gracias por tenerme paciencia para enseñarme como hacer una PCR en tiempo real.

A mis compañeras del programa de Doctorado en Ciencias, Dra. Sandra Aguayo, Dra. Fernanda Lazo y Dra. Lilia Beltrán gracias por el compañerismo y convivencia durante las clases que cursamos juntos.

Al M.C. Víctor Quintana, por la amistad y confianza desde que estudiábamos la maestría.

A la Dra. Anna González y M.C. Marina Arenas gracias por brindarme buenos momentos dentro y fuera de CIAD desde el inicio de mí maestría ya fuera para estudiar o des estresarnos. Marina, te estaré eternamente agradecido, por ser mí guía y no dejar que me perdiera en Ámsterdam y Londres. ¡Gracias por eso! dios te bendiga siempre.

A mi gran amiga, María Belem Nieblas, te estaré eternamente agradecido por escucharme y estar ahí. Gracias por tanta invitación a comer cuando la beca estaba ausente.

A mis amigos de Ciudad Obregón: Clarissa, Abel, Ana, Betty, Roberto, Víctor, Loth, Edgar, Antonio, José Luis, Orlando y Sergio, muchas gracias por todo lo que hemos convivido juntos y soportar mi particular forma de ser durante todos estos años. Especialmente, agradezco a Karen Villanueva, por ser mi mejor amiga y demostrar que poco importa en qué ciudad te encuentres, siempre estarás ahí para ponernos al día y tener nuestras llamadas habituales.

DEDICATORIA

Primeramente dedico este trabajo a Dios, por darme la fortaleza y resistencia para finalizar mis estudios de doctorado.

Este trabajo está dedicado principalmente con todo mi cariño a mis padres Gloria Rodríguez Navarro y Roberto Tapia Chan, cada día agradezco tenerlos en mi vida y no hay palabras que describan lo orgulloso que estoy de ser su hijo. Especialmente, le quiero dedicar este logro a mi papá, por que convivir contigo y conocerte más durante estos últimos años ha sido lo mejor, muchas gracias por tu confianza, todos tus consejos y tenerme paciencia cuando pasamos días difíciles.

A mi hermana Miriam Tapia, siempre has estado ahí cada que te necesito dándome tu apoyo, aunque me llames cuando esté ocupado trabajando. Muchas gracias por toda la compañía durante todo lo que hemos vivido juntos.

A mis sobrinos Luis Fernando y María Fernanda, por estar conmigo en la distancia e inspirarme a ser mejor.

A mi tía la Dra. Xóchitl López, este logro no se hubiera podido concretar sin tu ayuda al inicio de todo esto, realmente gracias por estar al pendiente.

Finalmente esto va dedicado a los demás miembros de mi familia de la cual estoy muy orgulloso de formar parte, siempre los tengo presentes aunque no coincidamos seguido.

CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como Causantes de Enfermedades	19
2.2 Relación entre la Comunicación Intercelular, Formación de Biopelículas y Virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.3 Aceites Esenciales y sus Componentes como Potenciales Inhibidores de Comunicación Intercelular y Formación de Biopelículas.....	31
2.4 Carvacrol como Agente Antibacteriano y Bloqueador de la Comunicación Intercelular de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
4.1. Objetivo General.....	36
4.2. Objetivos Específicos	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1 Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación de Biopelículas (CMEB) de Carvacrol contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
5.2 Mecanismo Inhibitorio del Carvacrol sobre la Adhesión de Células de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a Superficies de Acero Inoxidable.....	38

CONTENIDO (continuación)

5.3 Análisis Microscópico de los Cambios Morfológicos durante la Formación de Biopelículas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Superficies de Acero Inoxidable Expuestas a Carvacrol	39
5.4 Cambios en la Síntesis de Píocianina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Expuesta al Carvacrol	39
5.5 Cambios en la Motilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Expuesta al Carvacrol	40
5.6 Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Moléculas Autoinducidas Acil-homoserina Lactonas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
5.7 Efecto del Carvacrol sobre la Expresión Relativa de los Genes lasI/lasR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
5.8 Perfil de Proteínas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Expuestas a Carvacrol.....	43
5.9 Anclaje Molecular in silico (Docking) de Proteínas LasI y LasR de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con Carvacrol	44
5.10 Diseños Experimentales y Análisis de Datos.....	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7. CONCLUSIÓN.....	63
8. REFERENCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Etapas de la formación de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> . El proceso inicia con la adhesión reversible de células planctónicas a superficies a colonizar, enseguida las células adheridas realizan comunicación intercelular para producir sustancias poliméricas extracelulares y formar la biopelícula. Finalmente se alcanza un crecimiento máximo y se liberan bacterias para colonizar nuevas superficies.....	22
2 Sistema de expresión de la comunicación intercelular de <i>P. aeruginosa</i> . La comunicación intercelular inicia a partir de células planctónicas que producen moléculas autoinductoras acil-homoserina lactonas a nivel basal que se encargan de activar la expresión de genes asociados a la formación de biopelículas. Al paso del tiempo incrementa la densidad celular y con ello la producción de autoinductoras incrementando la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares con la finalidad de formar biopelículas....	24
3 Regulación de comunicación intercelular por proteínas Las/Rhl en <i>P. aeruginosa</i> . La regulación del sistema de comunicación intercelular de <i>P. aeruginosa</i> inicia cuando la sintasa LasI produce la molécula oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C12-AHL), la cual es detectada por la proteína receptora LasR para llevar a cabo la transcripción de genes asociados con la virulencia. Por otra parte, al activarse el sistema Las se auto-induce el regulador RhlR, activando el sistema Rhl, el cual utiliza butiril- (C4-AHL) y hexanoil-homoserina lactonas (C6-AHL), producidas por la sintasa RhlI y detectadas por la proteína RhlR.....	26
4 Sitio de interacción de proteína LasR con C12-AHL en <i>P. aeruginosa</i>	29
5 Sitio activo de la proteína LasI donde se lleva a cabo la síntesis de AHL en <i>P. aeruginosa</i>	30
6 Dosis efectivas de carvacrol para inhibir y erradicar la presencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estado planctónico y sésil. CMI = Concentración mínima inhibitoria, CMB = Concentración mínima bactericida, CMIB = Concentración mínima inhibitoria de biopelícula, CMEB = Concentración mínima de erradicación de biopelícula. Literales diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de carvacrol ($P \leq 0.05$).....	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
7	Efecto del aumento de la dosis de carvacrol sobre la viabilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en estado planctónico (b) y adheridas a superficies de acero inoxidable (a). ND = no detectado. Literales diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de carvacrol ($P \leq 0.05$).....	48
8	(A) Producción de dodecanoil-homoserina lactonas (C12-AHL) de <i>P. aeruginosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de carvacrol (0-3.9 mM). Diferentes literales indican diferencias estadísticas con el control ($P \leq 0.05$). (B) Área cubierta durante el desarrollo de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> en ausencia y presencia de carvacrol (a); células viables durante la formación de biopelícula de <i>P. aeruginosa</i> en acero inoxidable a 37 °C en presencia de carvacrol (b). * valores medios de tres repeticiones. (C) Microscopías de epifluorescencia (40X) de biopelículas de <i>P. aeruginosa</i> en cubreobjetos incubadas a 37 ° C durante 6, 12, 24 y 48 h en caldo LB en ausencia y presencia de carvacrol a 1.9 mM.....	50
9	Expresión relativa del gen <i>lasI</i> (a) y <i>lasR</i> (b) en <i>P. aeruginosa</i> expuesta a carvacrol (0.9 y 1.9 mM). * Significativamente diferente en comparación con el control ($P \leq 0.05$).....	52
10	(a) Producción de butiril-homoserina lactonas (C4-AHL) de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a diferentes concentraciones de carvacrol (0-7.9 mM). (b) Cambios en la síntesis de pirocianina de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a carvacrol (0-7.9 mM). Diferentes literales indican diferencias estadísticas con el control ($P \leq 0.05$).....	53
11	(a) Producción de hexanoil-homoserina lactonas (C6-AHL) de <i>P. aeruginosa</i> expuestas a diferentes concentraciones de carvacrol (0-7.9 mM). (b) Motilidad de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a carvacrol e incubada a 37 ° C. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (SD) de tres muestras. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).....	55
12	Perfil de proteínas de <i>P. aeruginosa</i> expuesta a carvacrol (0-3.9 mM) después de 48 h a 37 ° C. banda 1: control, banda 2: 0.9 M, banda 3: 1.9 mM, banda 4: 3.9 mM de carvacrol, banda L: marcador de peso molecular (kDa).....	56

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Representación de las interacciones por anclaje molecular <i>in silico</i> entre el carvacrol y los residuos de aminoácidos (Arg104, Phe105, Thr142, Phe27, Arg30, Thr145, Met79, Trp33, Thr144, Val148, Ser103, Val143) de la proteína LasI (PDB: 1RO5) de <i>P. aeruginosa</i>	60
14	Representación de las interacciones por anclaje molecular <i>in silico</i> entre el carvacrol y los residuos de aminoácidos (Asp73, Trp88, Thr75, Tyr93, Val76, Trp60, Thr115, Leu110, Phe101, Tyr56, Tyr64, Ser129, Leu36, Ala127) de la proteína LasR (PDB: 2UV0) de <i>P. aeruginosa</i>	61

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contra tratamientos de antibióticos.....	20
2	Cambios fenotípicos regulados por AHL durante la comunicación intercelular.....	27
3	Afinidad de posibles interacciones del carvacrol con proteínas LasI/LasR.....	58

RESUMEN

La resistencia de *P. aeruginosa* a los tratamientos con antibióticos y procesos de desinfección se encuentra asociada con su capacidad de formar biopelículas en superficies. Esta agregación bacteriana es controlada por comunicación intercelular, dependiente del reconocimiento de moléculas autoinductoras acil-homoserina-lactonas por proteínas Las/Rhl involucradas con la regulación de factores de virulencia. Por lo que un mecanismo para controlar la formación de biopelículas puede ser interrumpir la comunicación intercelular. Por otro lado, el carvacrol, presente en la mayoría de los aceites esenciales, muestra potencial antibacteriano contra *P. aeruginosa* a nivel planctónico, así como para reducir algunos factores de virulencia regulados por comunicación intercelular en otros sistemas bacterianos. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar concentraciones de carvacrol que inhiban los niveles de moléculas autoinductoras responsables de la formación de biopelículas en acero inoxidable, motilidad y síntesis de piocianina de *P. aeruginosa*. Este compuesto fue eficaz para inhibir y erradicar a *P. aeruginosa* en estado planctónico (3.9 y 5.9 mM, respectivamente) y en biopelícula (7.9 y 10 mM, respectivamente). A concentraciones menores a 1.9 mM, se redujo la producción de acil-homoserina-lactonas y factores de virulencia piocianina y motilidad hasta en un 50%, sin afectar la viabilidad celular. Por otra parte, el acoplamiento molecular demostró posibles interacciones del carvacrol con aminoácidos del sitio activo de la proteína LasI (-5.6 kcal/mol) y del punto de unión específico de la proteína receptora LasR (-6.7 kcal/mol) con las acil-homoserina lactonas (-5.7 kcal/mol). Finalmente, el carvacrol disminuyó la expresión relativa del gen *lasR*, sin afectar la expresión de *lasI*. Por lo tanto, el carvacrol afectó la formación de biopelículas en acero inoxidable y factores de virulencia de *P. aeruginosa*, lo cual se relacionó con afectar la actividad de LasI, causando una disminución de acil-homoserina lactonas y expresión del gen regulador de la comunicación intercelular.

Palabras clave: Carvacrol, comunicación intercelular, resistencia bacteriana, autoinductoras, anti virulencia.

ABSTRACT

The resistance of *P. aeruginosa* to antibiotic treatments and disinfection processes is associated with its ability to form biofilms on surfaces. This bacterial aggregation is controlled by intercellular communication, dependent on the recognition of autoinducer molecules acyl-homoserine-lactones by Las/Rhl proteins involved with the regulation of virulence factors. So a mechanism to control the formation of biofilms can be to interrupt intercellular communication. On the other hand, carvacrol, present in most essential oils, shows antibacterial potential against *P. aeruginosa* at planktonic level, as well to reduce some virulence factors regulated by intercellular communication in other bacterial systems. Therefore, the objective of this work was to evaluate carvacrol to inhibit the levels of autoinducer molecules responsible of biofilm formation on stainless steel, motility and pyocyanin production of *P. aeruginosa*. This terpene was effective to inhibit and eradicate *P. aeruginosa* in planktonic state (3.9 and 5.9 mM, respectively) and biofilm form (7.9 and 10 mM, respectively). At concentrations below 1.9 mM, the production of acyl-homoserine-lactones and virulence factors pyocyanin and motility were reduced up to 50%, without affecting cell viability. On the other hand, molecular docking demonstrated possible interactions of carvacrol with amino acids from the active site of LasI protein (-5.6 kcal/mol) and the specific binding pocket of the receptor protein LasR (-5.7 kcal/mol) with the acyl-homoserine-lactones (-6.2 kcal/mol). Finally, carvacrol decreased the relative expression of the *lasR* gene, without affecting the expression of *lasI*. Therefore, carvacrol affected the formation of biofilms on stainless steel surfaces and virulence factors of *P. aeruginosa*, which was related to affect LasI activity decreasing acyl-homoserine lactones content and expression of the regulatory gene of intercellular communication.

Key words: Carvacrol, intercellular communication, bacterial resistance, autoinducer, anti-virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista Gram negativa responsable de infecciones humanas, principalmente respiratorias en personas inmunocomprometidas. Esta bacteria en los últimos años ha generado resistencia contra distintos tratamientos con antibióticos y desinfectantes debido a su sistema de comunicación intercelular que le permite regular diversos factores de virulencia como motilidad, formación de biopelícula y producción de toxinas (Wagner et al. 2016). Durante la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, las células planctónicas se diferencian para formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llega a constituir una película (Ghafoor et al. 2011). Estos agregados tienen una estructura formada de distintas sustancias poliméricas extracelulares, siendo estas las que les proveen mayor resistencia a antibióticos y otros agentes tóxicos. Durante el inicio de la formación de biopelículas ocurre una adhesión reversible de células libres sobre una superficie. Posteriormente, comienza a crecer la población y por medio de la comunicación intercelular inicia la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares y finalmente se liberan células adheridas para colonizar nuevas superficies (Henke y Bassler 2004).

Actualmente se ha demostrado que el proceso de comunicación intercelular por el cual se forman las biopelículas y otros factores de virulencia es controlado por distintos sistemas de proteínas reguladoras y moléculas autoinductoras. En el caso de *P. aeruginosa* participan principalmente las proteínas Las/Rhl y las autoinductoras acil-homoserina lactonas (De Kievit 2009). Anteriormente se ha evidenciado la importancia de este sistema de comunicación en *P. aeruginosa*, ya que en un estudio donde se utilizaron mutantes carentes del gen de la proteína receptora *lasR*, no se logró observar formación de biopelículas ni de producción de piocianina, un factor de virulencia de vital importancia en la patogenicidad de esta bacteria (Cabeen 2014). Sin embargo, al adicionar dodecanoil-homoserina lactonas de manera exógena se restauró la formación de biopelículas y de piocianina, lo que indica que el sistema permanece activo a través de la proteína LasR.

Recientemente se ha mencionado que inhibiendo la comunicación intercelular entre bacterias puede ser un punto clave para reducir la expresión de factores de virulencia y así lograr controlar la presencia de microorganismos resistentes a antibióticos (Nazzaro et al. 2013). Además, no se ha esclarecido cual es el mecanismo más idóneo para interrumpir esta comunicación, se han resaltado los posibles puntos diana de los compuestos anti-virulencia, como lo son afectar a las sintasas responsables de la producción de acil-homoserina lactonas, bloquear proteínas receptoras o afectar directamente a la molécula autoinductora.

Debido a la necesidad de explorar distintos tratamientos antibacterianos, la aplicación de aceites esenciales y sus componentes se ha estudiado como alternativa para inhibir bacterias patógenas (Ortega-Ramirez et al. 2014). En este contexto, el carvacrol componente mayoritario del aceite esencial de orégano, ha sido efectivo para inhibir el crecimiento de biopelículas de distintas bacterias patógenas como *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Burt et al. 2014; Nostro et al. 2007; Nostro et al. 2012). Sin embargo, la evaluación de la actividad anti-biopelícula solo fue evaluada sobre la producción de biomasa, sin evaluar el posible mecanismo de inhibición. Asimismo, se han realizado pruebas con la cepa biosensora de comunicación intercelular *Chromobacterium violaceum*, la cual nos indica por medio de la síntesis de un pigmento llamado violaceína la presencia de acil-homoserina-lactonas (Alvarez et al. 2014), en este trabajo, se redujo la síntesis de este pigmento hasta un 40% utilizando aceite esencial de orégano en un rango de 0.25-2 mg/mL, sin afectar la viabilidad celular, atribuyéndole este potencial al carvacrol. Sin embargo, se desconoce cuál es el posible mecanismo de acción del carvacrol para interrumpir la comunicación intercelular de bacterias y afectar su formación de biopelículas, en específico de *P. aeruginosa*

Se ha reportado que el carvacrol puede inhibir la producción de octanoil-homoserina lactona de *Pseudomonas fluorescens* a concentraciones de 0.6 mM, relacionando este efecto con la inhibición de la motilidad de esta bacteria, lo cual podría implicar una interrupción de la comunicación intercelular (Myszka et al. 2016). Además, en otro estudio este terpeno inhibió la actividad de distintas enzimas bacterianas como

pectatoliasa y poligalacturonasa de *Pectobacterium carotovorum* (Joshi et al. 2016a). En este trabajo se demostró que este compuesto redujo hasta el 60% la actividad proteolítica de estas enzimas a concentraciones de 0.25 mM, relacionando este efecto con una posible interacción con la sintasa de acil-homoserina-lactonas EsaI, lo cual se realizó por modelaje molecular indicando la interacción de este terpeno con el sitio activo (Asp45, Glu97, Ser 99 y Thr140) de esta proteína, además de reducir la expresión del gen *esaI*, indicando un posible mecanismo de acción de este compuesto para inhibir la comunicación intercelular de *P. carotovorum*. Además, se demostró *in silico* que el carvacrol podría interactuar con residuos de aminoácidos presentes en la proteína LasR pudiendo afectar la detección de dodecanoil-homoserina lactonas de *P. aeruginosa* (Joshi et al. 2016a).

A pesar de estos avances, es necesario relacionar el potencial del carvacrol con la inhibición de la formación de biopelículas, motilidad y producción de piocianina, factores de virulencia muy importantes para regular la patogenicidad de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio del carvacrol sobre la formación de biopelícula, producción de piocianina y motilidad con la síntesis de acil-homoserina lactonas de *Pseudomonas aeruginosa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* como Causantes de Enfermedades

Pseudomonas aeruginosa ha sido identificada como un patógeno Gram negativo desde 1882. Este microorganismo se ha reconocido como un habitante de aguas, suelos y algunas plantas, por su versatilidad metabólica y sus rangos de temperaturas de crecimiento (30-42 °C). Por otra parte, también es causante de problemas dentro del ambiente nosocomial ya que se ha encontrado en respiradores, humidificadores, regaderas, catéteres y en algunas mangueras (Kerr y Snelling 2009). Esta bacteria puede causar enfermedades siendo responsable de distintas infecciones, principalmente en personas con su sistema inmunológico comprometido o aquellas que padezcan de problemas respiratorios. Por otra parte, la persistencia de esta bacteria está ampliamente relacionada con su resistencia a distintos tratamientos con antibióticos (Strateva y Yordanov 2009). Los brotes de infección por este patógeno oportunista se relacionan mayormente al uso indebido de antibióticos, por lo que estas bacterias generan resistencia a dichos tratamientos incrementando la concentración de antibióticos utilizados para su control (Cuadro 1). En reportes previos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos de América se ha señalado que esta bacteria ha causado hasta 51,000 infecciones al año, de las cuales 6,400 han presentado resistencia a antibióticos y 440 han sido letales, ocupando el 15% de infecciones bacterianas (CDC 2015). Por ello, es necesario destacar la problemática que causa este patógeno oportunista.

En México existen reportes sobre la incidencia de esta bacteria en distintos hospitales, indicando que la resistencia de estas infecciones es mayor en personas con complicaciones en las vías respiratorias, persistiendo en tratamientos con antibióticos como cefotaxima, ciprofloxacina y ceftriaxona (Murillo et al. 2009). Por otra parte, en Latinoamérica se ha observado un incremento en la prevalencia de enfermedades de *P. aeruginosa*, principalmente en infecciones que afectan al torrente sanguíneo (6.5 %) y

respiratorias como neumonía y fibrosis quística (25%). Además, en Asia se ha reportado que predominan infecciones urinarias por esta bacteria alrededor del 11.1%, teniendo que incrementar las dosis de los antibióticos carbapenemas y amikacina para reducir la infección (Jones 2003).

Cuadro 1. Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* contra tratamientos de antibióticos.

Antibiótico	CMI (mM)
Ceftazidima	>29
Cefepima	>33
Aztreonam	>36
Ticarcilina	>330
Piperacilina	>123
Imipenem	>26
Meropenem	>20
Amikacina	>54
Gentamicina	>33
Tobramicina	>34
Ciprofloxacina	>6
Levofloxacina	>11
Gatifloxacina	>10
Garenoxacina	>9
Tetraciclina	>18

(Sader et al. 2004)

Como se ha mencionado anteriormente, *P. aeruginosa* está asociada a graves infecciones respiratorias como la fibrosis quística, debido a su potencial para adherirse a las células del hospedero y producir una mucosa formada principalmente de polímeros. Actualmente, no se ha encontrado un tratamiento efectivo disponible para este padecimiento, solo se aplican terapias para controlarlo (Pérez Monrás et al. 2006). Durante la infección causada por *P. aeruginosa* se expresan distintos factores de

virulencia, como proteasas, elastasas, lipasas y toxinas, que ayudan a vencer la respuesta inmune del hospedero y a ser antagónicas contra otros microorganismos patógenos (Newman et al. 2017). *P. aeruginosa* también presenta diversos factores de virulencia asociados a la motilidad, como pili, flagelos y lipopolisacáridos, que favorecen la adhesión celular para colonizar al hospedero. Con base a la información anterior podemos detectar la problemática que representa *P. aeruginosa* para la salud humana y la importancia de controlar su patogenicidad.

2.2 Relación entre la Comunicación Intercelular, Formación de Biopelículas y Virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Durante la formación de biopelículas (Figura 1) ocurren varias etapas en las cuales las bacterias modifican su desarrollo de forma planctónica para establecer comunidades bacterianas. En este agregado se llevan a cabo diversas funciones como acumulación de nutrientes, regulación genética, producción de antibióticos y de factores de virulencia (Mann y Wozniak 2012). Una célula planctónica que vence las fuerzas de repulsión utilizando sus apéndices puede llegar a una superficie en específico y formar una biopelícula mediante: 1) la adhesión reversible de células planctónicas sobre la superficie a colonizar; 2) posteriormente, por medio de la comunicación intercelular inicia la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares, causando una adhesión irreversible; 3) al incrementar la densidad celular se forma una microcolonia; 4) ocurre la maduración de la biopelícula debido a un incremento en la comunicación intercelular; y por último, 5) al agotarse los nutrientes se da la liberación de células adheridas para formar otras biopelículas (Ghafoor et al. 2011).

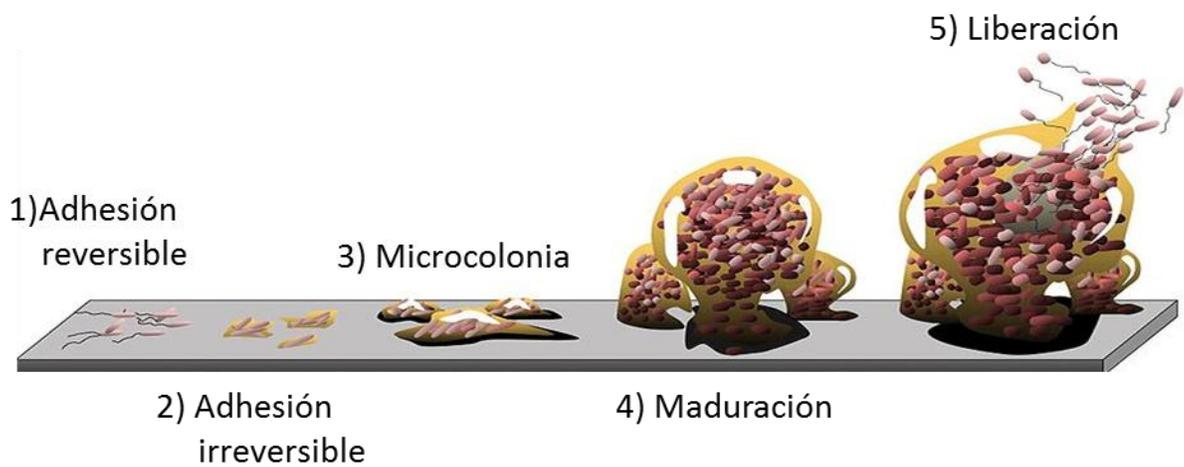


Figura 1. Etapas de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* (Zhang y Li 2016). 1) El proceso inicia con la adhesión reversible de células planctónicas a superficies a colonizar, 2) enseguida las células adheridas realizan 3) comunicación intercelular para producir sustancias poliméricas extracelulares y 4) formar la biopelícula. 5) Finalmente se alcanza un crecimiento máximo y se liberan bacterias para colonizar nuevas superficies.

P. aeruginosa produce sustancias poliméricas extracelulares como polisacáridos, ramnolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, con la finalidad de formar biopelículas que fomenten una adhesión mayor en las superficies a colonizar siendo una problemática tanto en el ambiente hospitalario, como en la industria alimentaria (Phillips 2016). Aunque se ha reportado que esta bacteria produce principalmente alginato, existen evidencias de otros polímeros involucrados en su composición, dependiendo de la superficie a colonizar (Ryder et al. 2007). Por otra parte, se ha evidenciado que cuando las células de *P. aeruginosa* se encuentran embebidas en una biopelícula estas presentan un incremento en la expresión de algunos factores de virulencia (Asfour 2017). Tales factores pueden incluir la síntesis de toxinas como la pirocianina, la cual está involucrada con la patogenicidad de esta bacteria, además de incrementar la actividad de enzimas elastasas y proteolíticas, involucradas en la síntesis de ramnolípidos y motilidad.

Se ha mencionado que la comunicación intercelular que regula este proceso les permite a las bacterias censar a otras bacterias cercanas, esto ocurre por medio de autoinductores que inician la producción de moléculas auto-sintetizadas llamadas autoinductores, y además de proteínas receptoras que regulan la expresión de genes para formar biopelículas (Figura 2) (Popat et al. 2012). Adicionalmente, se ha comprobado que conforme incrementa la densidad poblacional de bacterias adheridas a una superficie, se incrementa la concentración de moléculas autoinductores, lo que induce cambios fenotípicos en las bacterias generando la formación de biopelículas más estables (Rosselló y Bouza 2013). Además, la presencia de estos agregados bacterianos es un problema por la tolerancia a tratamientos para su control, debido a que las células en esta forma se encuentran protegidas por la matriz extracelular que producen.

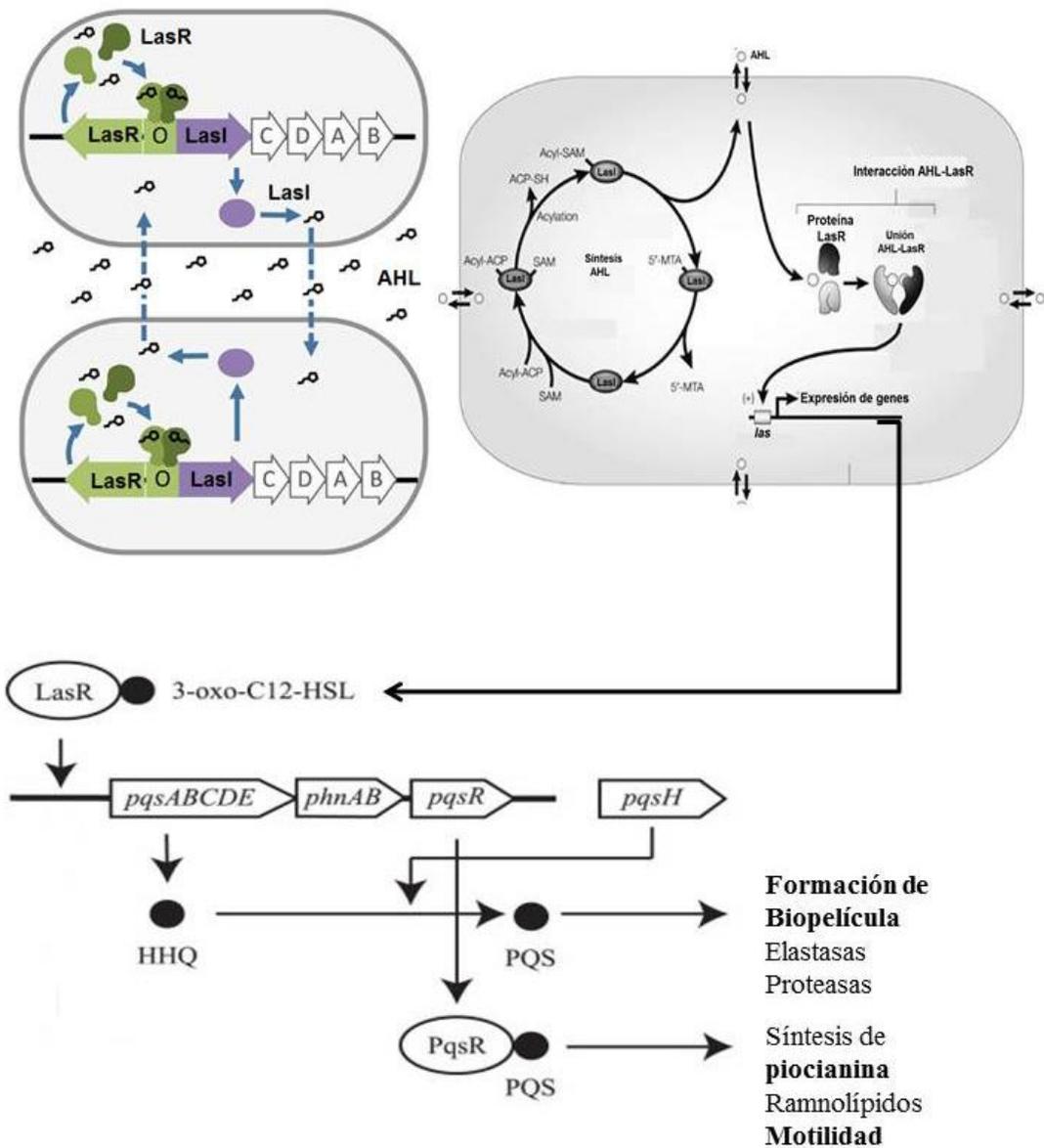


Figura 2. Sistema de expresión de la comunicación intercelular de *P. aeruginosa* (Barreto 2013; Davis et al. 2015). La comunicación intercelular inicia a partir de células planctónicas que producen autoinductoras acil-homoserina lactonas a nivel basal que se encargan de activar la expresión de genes asociados a la formación de biopelículas, piocianina, motilidad, entre otros.

P. aeruginosa utiliza moléculas autoinducidas llamadas acil-homoserina lactonas (AHL) formadas por un anillo lactona y una cola hidrocarbonada (De Kievit 2009). Estas moléculas se sintetizan y secretan por medio de las vías de proteínas Las y Rhl. Ambas rutas utilizan sintasas (LasI y RhlI) y proteínas receptoras (LasR y RhlR). Sin embargo, el sistema Rhl es controlado por las proteínas Las demostrando que estas proteínas son las primeras en participar en la comunicación intercelular y cuando se activa posteriormente se envían señales para inducir a Rhl (Arráiz 2001). Además, los sistemas Las/Rhl trabajan en conjunto para regular la expresión de más de 300 genes dentro del genoma de *P. aeruginosa* involucrados con la virulencia y formación de biopelículas (Wagner et al. 2003).

Como se mencionó anteriormente, LasI y RhlI son las responsables de producir AHL en *P. aeruginosa*, principalmente oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C12-AHL), butiril- (C4-AHL) y hexanoil-homoserina lactonas (C6-AHL), respectivamente. Estas sintasas catalizan específicamente la unión entre el enlace amida de la S-adenosilmetionina (SAM) con una proteína transportadora de ácido graso específica y su intermediario acil-SAM, la longitud de la AHL a sintetizar depende de cada especie bacteriana (Watson et al. 2002). Por otra parte, LasR y RhlR son las proteínas reguladoras de la transcripción de genes que solo se activa al unirse a AHL (Figura 3) por medio de interacciones entre sus residuos de aminoácidos expuestos en un sitio de unión específico con la parte hidrocarbonada de la AHL. En *Pseudomonas* las proteínas receptoras juegan un papel importante ya que al unirse a las AHL se expresan distintas respuestas fenotípicas (Cuadro 2) dependientes de la molécula detectada y especie bacteriana que la perciba (Williams 2007). En estudios previos, se ha observado que *P. aeruginosa* con el gen *lasR* silenciado presenta una reducción sobre la expresión de algunos factores de virulencia (Heurlier et al. 2005). Dentro de los principales factores reducidos se encuentra la síntesis de piocianina y actividad de algunas enzimas como β -galactosidasa y elastasa, demostrando la importancia de estas proteínas sobre la regulación de la virulencia en esta bacteria.

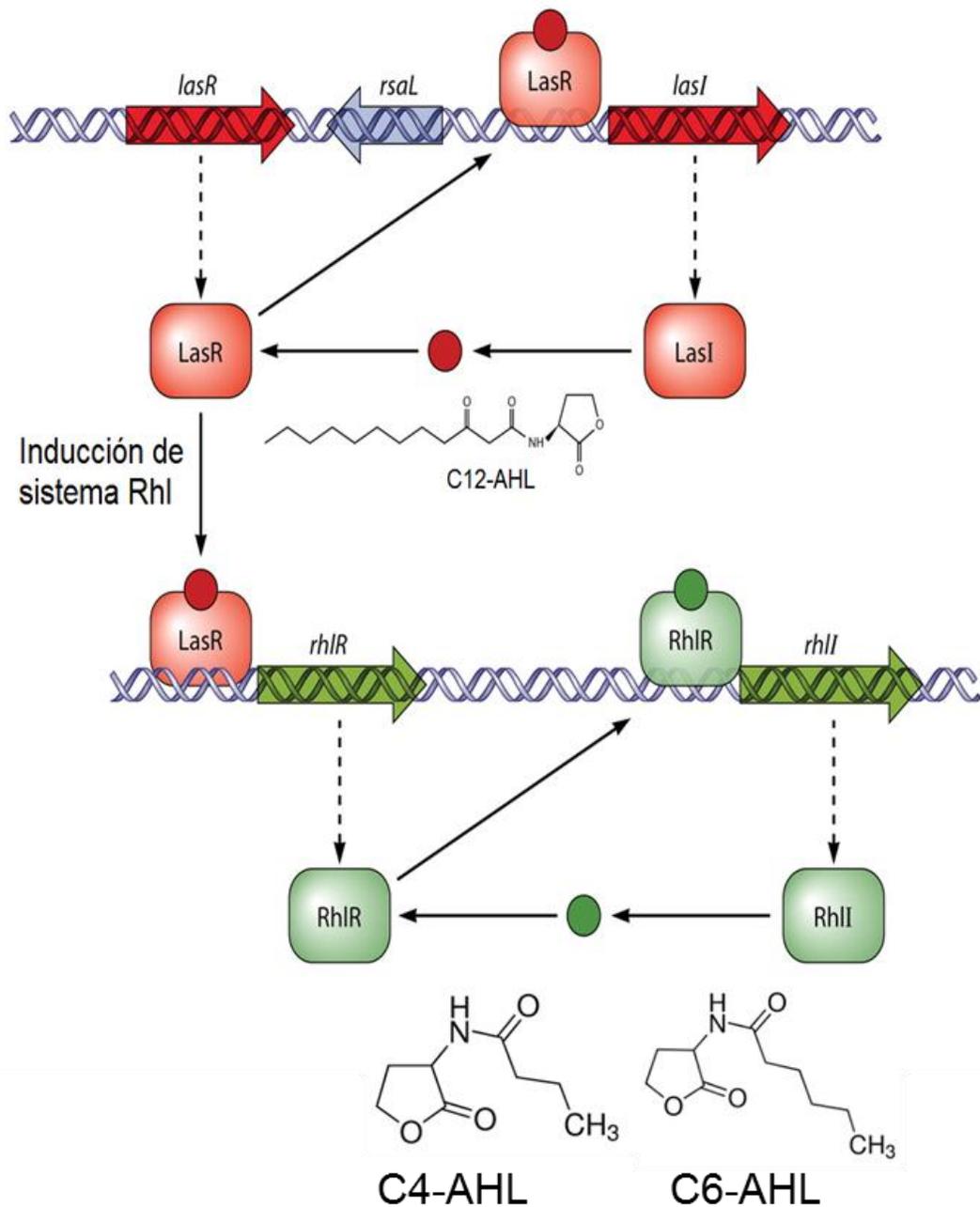


Figura 3. Regulación de comunicación intercelular por proteínas Las/Rhl en *P. aeruginosa* (Jimenez et al. 2012). La regulación del sistema de comunicación intercelular de *P. aeruginosa* inicia cuando la sintasa LasI produce la molécula oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C12-AHL), la cual es detectada por la proteína receptora LasR para llevar a cabo la transcripción de genes asociados con la virulencia. Por otra parte, al activarse el sistema Las se auto-induce el regulador RhlR, activando el sistema Rhl, el cual utiliza butiril- (C4-AHL) y hexanoil-homoserina lactonas, producidas por la sintasa RhlI y detectadas por la proteína RhlR.

Cuadro 2. Cambios fenotípicos regulados por AHL durante la comunicación intercelular.

Bacteria	Acil-homoserina lactona	Respuesta fenotípica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-AHL	Síntesis de toxinas: piocianina y pioverdina
	C6-AHL	Motilidad Secreción de proteínas
	C12-AHL	Producción de Exoenzimas Formación de biopelícula
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-AHL	Síntesis de fenazinas Producción de proteasas
	C6-AHL	Síntesis de antibióticos
<i>Pseudomonas putida</i>	C10-AHL	Formación de biopelícula
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	C10-AHL	Síntesis de antibióticos
<i>Pseudomonas syringae</i>	C6-AHL	Producción de exopolisacáridos Motilidad

C4-AHL: butiril-homoserina lactona, C6-AHL: hexanoil-homoserina lactona, C10-AHL: decanoil-homoserina lactona, C12-AHL: oxodocecanoil-homoserina lactona (Williams et al. 2007).

Actualmente, por medio de modelos cristalográficos y estudios *in silico* de modelaje molecular se han logrado identificar y/o proponer los sitios de unión específicos entre las moléculas AHL con la proteína receptora LasR (Grabski et al. 2017). En este sentido, se logró demostrar que C12-AHL se puede unir específicamente formando puentes de hidrógeno a residuos de aminoácidos (Leu40, Tyr47, Cys79, Thr80) por medio de su cola hidrocarbonada. Esta interacción ocurre específicamente en una cavidad de hojas β compactadas con hélices α , una vez unida en homo-dímeros de LasR con AHL se lleva a cabo la expresión de genes dependientes de comunicación intercelular (Figura 4). Además, se ha reportado que el sitio activo de LasI para sintetizar AHL (Figura 5), está conformado por una hendidura en forma de V entre las hojas anti paralelas 4β y 5β con una secuencia de aminoácidos conservada (Arg23, Asp42, Asp44, Asp47, Arg70, Glu101, Ser103 y Arg104). Adicionalmente, se encuentra un túnel de transporte de la

cadena acil hidrocarbonada formado mayormente por residuos de aminoácidos hidrofóbicos como leucina, isoleucina, valina, triptófano y alanina (Gould et al. 2004).

En este contexto, se han propuesto distintos compuestos químicos inhibidores como tetrazol, cloroacetamida y maleimida para bloquear de manera irreversible los sitios donde interactúan la proteína LasR con las AHL (O'Brien et al. 2014). Además, puede contemplarse bloquear la reacción de síntesis por LasI, como un posible punto de inhibición tanto de los factores de virulencia como la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos de inhibición de la comunicación intercelular por distintas vías, considerando las variables involucradas ya sea afectando los sitios activos de la sintasa, de la proteína receptora o interaccionando con las moléculas señal (Gutierrez-Pacheco et al. 2018). Por lo tanto, es necesario investigar posibles tratamientos y alternativas para interrumpir este proceso y así disminuir la virulencia y resistencia bacteriana en *P. aeruginosa*.

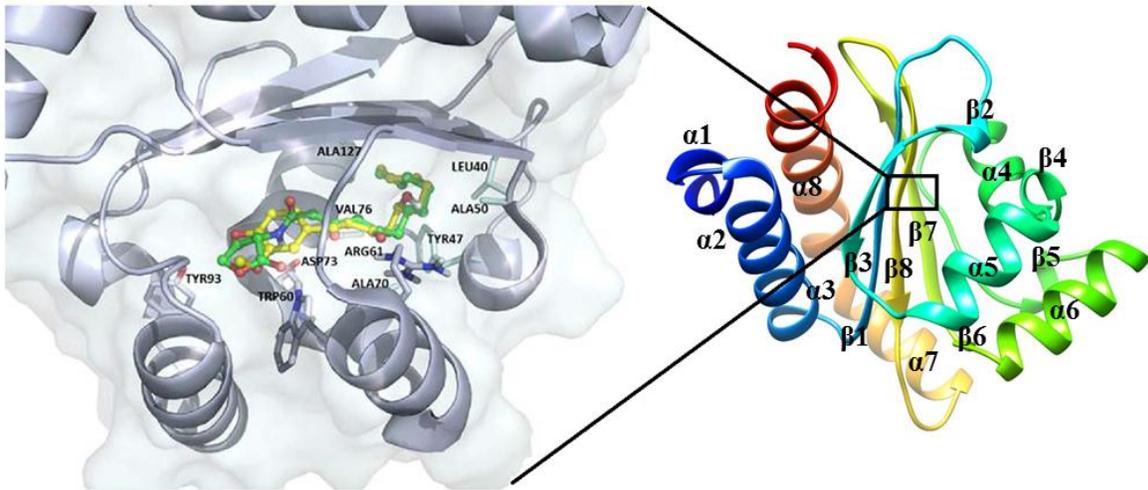


Figura 4. Sitio de interacción de proteína LasR con C12-AHL en *P. aeruginosa* (Kim et al. 2015; Zou y Nair 2009).

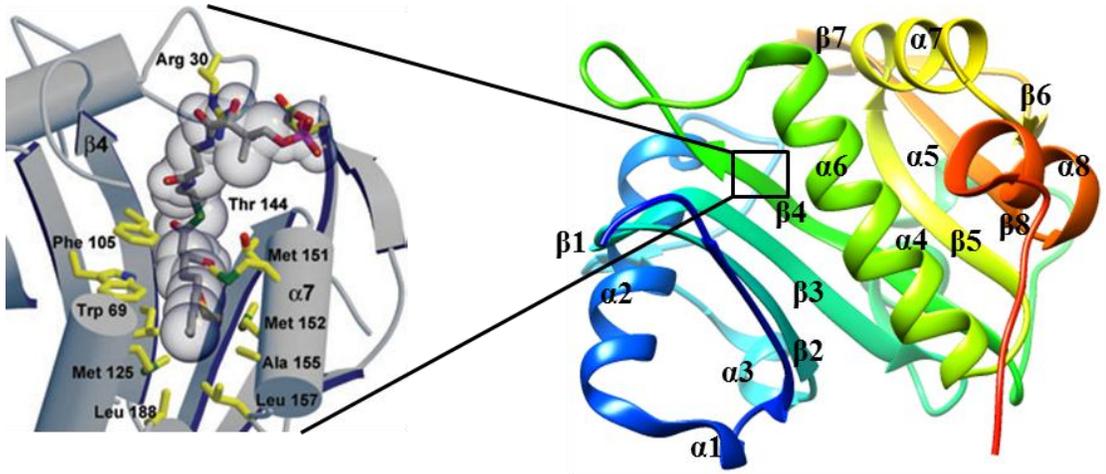


Figura 5. Sitio activo de la proteína LasI donde se lleva a cabo la síntesis de AHL en *P. aeruginosa* (Gould et al. 2004).

2.3 Aceites Esenciales y sus Componentes como Potenciales Inhibidores de Comunicación Intercelular y Formación de Biopelículas

Con el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos frente a muchos tratamientos utilizados para el control de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, surge la necesidad de nuevas terapias y el desarrollo de nuevos antibióticos. En este contexto, las plantas producen diversos compuestos fitoquímicos que actúan como antibióticos naturales, estos compuestos muestran baja toxicidad para las células eucariotas, por lo que pueden ser un tratamiento viable para el control de bacterias patógenas (Pezzani et al. 2017). Recientemente, han surgido tendencias de utilizar estos tratamientos alternativos de compuestos naturales de plantas para reducir el uso de químicos sintéticos y antibióticos (Schieber 2017). Actualmente, se han utilizado compuestos naturales para inhibir la producción de biopelículas bacterianas. Así mismo, los aceites esenciales derivados de plantas han sido ampliamente aplicados como agentes antibacterianos por los compuestos bioactivos como terpenoides y fenoles en su composición (Cruz-Valenzuela et al. 2016; Ortega-Ramirez et al. 2014). Estos aceites se han propuesto como agentes antimicrobianos para tratar de inhibir el crecimiento de bacterias que presenten resistencia a fármacos (Høiby et al. 2010). Por lo tanto, los aceites esenciales pueden ser estudiados como agentes que inhiban la virulencia de bacterias patógenas, así como la adhesión en formación de biopelículas y comunicación intercelular involucrados (Gutierrez-Pacheco et al. 2018).

Dentro de las fuentes de distintos compuestos fitoquímicos que presentan una inhibición del sistema de comunicación intercelular están la frambuesa, mora, arándano, uva, albahaca y cúrcuma (Guizar Ferrel 2014). En este estudio se evaluó el potencial de los extractos de plantas sobre un modelo biosensor *C. violaceum*, donde se demostró una inhibición de síntesis de violaceína hasta en un 50%. Por otra parte, en otro estudio se ha encontrado el potencial de distintos compuestos naturales sobre la reducción de formación de biopelículas, como el aceite de ajo y extractos acuosos de furanonas de algas, los cuales disminuyeron la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* y bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* (Bjarnsholt et al. 2005). Sin embargo, estos estudios

no esclarecen los mecanismos que pudieran presentarse mediante el uso de los compuestos naturales en la formación o destrucción de los agregados bacterianos. Lo anterior justifica la importancia de evaluar cambios en la comunicación intercelular asociados a un efecto sobre factores de virulencia y con la formación de las biopelículas bacterianas expuestas a procesos de desinfección.

El aceite esencial de orégano y tomillo se han aceptado como aditivos alimentarios y saborizantes por la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA 2011). Se ha demostrado la actividad antimicrobiana del aceite de orégano contra biopelículas de *Salmonella* Newport en vegetales de hoja verde y se obtuvieron reducciones de hasta 5 Log UFC a 4 y 8 °C, sin reportar células bacterianas sobrevivientes (Moore-Neibel et al. 2013). Además, otros estudios evaluaron el efecto del aceite de orégano y tomillo (75 ppm) en suspensión contra *S. Typhimurium* adherida en lechuga iceberg y tomates dando como resultado reducciones de hasta 2 Log UFC/g (Bhargava et al. 2015). Por otra parte, el aceite esencial de orégano ha demostrado afectar el crecimiento de células planctónicas, así como la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* a concentraciones de 20-200 µg/mL, reduciendo la formación de agregado hasta 50% sobre superficies de acero inoxidable (Schillaci et al. 2013). En otro estudio se demostró el potencial del aceite esencial de orégano y sus compuestos mayoritarios timol y carvacrol, para reducir la formación de biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis* (Nostro et al. 2007). Además, se ha reportado que por su hidrofobicidad podrían interactuar con las membranas lipídicas afectando la estabilidad de las células embebidas en biopelículas. Como se muestra en los estudios anteriores, existe evidencia que muestra que el aceite esencial de orégano presenta efectividad para inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, debido a sus componentes mayoritarios, pero no se ha reportado evidencia del efecto de estos terpenos dentro del mecanismo de comunicación intercelular que regulan la virulencia de este patógeno.

2.4 Carvacrol como Agente Antibacteriano y Bloqueador de la Comunicación Intercelular de *Pseudomonas aeruginosa*

El carvacrol es el compuesto mayoritario del aceite esencial de orégano, su potencial antibacteriano ha sido demostrado contra distintas bacterias como *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. Saintpaul*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. El mecanismo de acción antibacteriana del carvacrol está asociado con su capacidad de alterar proteínas de membrana externa de las células, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática y la pérdida de ATP (Pei et al. 2009; de Sousa et al. 2012). Por lo tanto, se puede establecer que podría intervenir con otras proteínas bacterianas. Un estudio previo por medio de modelaje molecular *in silico* demostró que el carvacrol podría interaccionar con la proteína LasR de *P. aeruginosa* y ExpR de *Pectobacterium carotovorum* (Joshi et al. 2016a). El mecanismo propuesto fue descrito como formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas del carvacrol con los aminoácidos (Tyr56, Trp60, Asp73, Thr75 y Ser129) del sitio de unión específico de AHL. Además de bloquear el sitio de unión de la proteína Esxp (homóloga de LasI) interactuando con los aminoácidos (Asp45, Asp48, Arg68, Glu97, Ser99 y Arg100) del sitio activo con los que se une S-adenosilmetionina para iniciar la síntesis de AHL. Adicionalmente, esto se relacionó con una reducción en la formación de biopelículas y una disminución de la expresión relativa de los genes de estas proteínas *expI* y *expR*. El análisis de esta evidencia y la similitud que existe entre las proteínas ExpI y ExpR de *P. carotovorum* con nuestro modelo de estudio de *P. aeruginosa* nos permite hipotetizar el efecto inhibitorio del carvacrol sobre las proteínas LasI-LasR y la virulencia de este patógeno.

El carvacrol también ha demostrado reducir factores de virulencia como la motilidad, exoenzimas, síntesis de pigmentos y la producción de biopelículas de *C. violaceum*, *S. auerus* y *S. Typhimurium* (Burt et al. 2014; Nostro et al. 2012). En este contexto, se ha relacionado este efecto con una inhibición de la comunicación intercelular, como se ha demostrado en *C. violaceum*, ya que la síntesis de violaceína y la motilidad son mediadas por la presencia de C6-AHL. Estudios previos han reportado el potencial del

carvacrol para inhibir formación de biopelículas de *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, durante las distintas etapas de formación del agregado a concentraciones de 2 mg/mL (Espina et al. 2017); sin embargo, solo evaluaron concentraciones inhibitorias. Por otra parte, se ha logrado evidenciar que este terpeno afectó la expresión del gen *cviI*, que codifica para la acil-homoserina sintasa CviI de *C. violaceum* relacionando este efecto con cambios en la producción de biopelículas y actividad enzimática mediadas por comunicación intercelular (Burt et al. 2014). Una vez más, esta evidencia nos permite plantear que el carvacrol puede afectar la formación biopelículas pudiendo estar implicada una interrupción en el proceso de comunicación intercelular en *P. aeruginosa*.

El aceite esencial de tomillo y sus componentes mayoritarios carvacrol y timol han sido efectivos en la inhibición de la motilidad en *Pseudomonas fluorescens* a concentraciones sub-letales en un rango de 0.4-20 µg/mL, con valores en el rango de 78-90 % e inhibiendo la presencia de hexanoil-homoserina lactonas y octanoil-homoserina lactonas (Myszka et al. 2016). Por lo tanto, los estudios sobre la inhibición de formación de biopelículas y disminución en los factores de virulencia de *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol están relacionados con una interrupción de la comunicación intercelular, como se relaciona con los análisis predictivos de modelaje molecular. Sin embargo, no existe evidencia del efecto de este terpeno contra el sistema de comunicación intercelular y las moléculas autoinductoras que regulan la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

3. HIPÓTESIS

La capacidad inhibitoria del carvacrol sobre la formación de biopelícula, producción de piocianina y motilidad se relaciona con una interrupción del sistema LasI/LasR causando una disminución de la síntesis de acil-homoserina lactonas de *Pseudomonas aeruginosa*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar la relación del efecto inhibitorio del carvacrol sobre la formación de biopelícula, producción de piocianina y motilidad con la síntesis de acil-homoserina lactonas de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2. Objetivos Específicos

Determinar la capacidad antibacteriana y anti-biopelícula del carvacrol sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Evaluar el efecto anti-biopelícula del carvacrol y su capacidad para inhibir la síntesis de dodecanoil acil-homoserina lactona de *Pseudomonas aeruginosa*.

Cuantificar el efecto inhibitorio del carvacrol sobre la producción de piocianina y la síntesis de butiril acil-homoserina lactona de *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinar el efecto anti-motilidad del carvacrol y la reducción de la producción de hexanoil acil-homoserina lactona de *Pseudomonas aeruginosa*.

Evaluar los cambios en la expresión génica de *lasI-lasR* de *Pseudomonas aeruginosa* expuesta a carvacrol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), Bactericidas (CMB) y de Formación (CMIB) y Erradicación de Biopelículas (CMEB) de Carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa*

El efecto antibacteriano del carvacrol (W282197, Sigma Aldrich, Toluca, México) fue evaluado contra *P. aeruginosa* (ATCC® 10145) en su forma planctónica y adherida en biopelícula, respectivamente. Para el efecto sobre la forma planctónica se evaluaron diferentes concentraciones del carvacrol (0-10 mM) utilizando tubos de ensayo con 6 mL de medio de cultivo caldo Luria Bertani con un inóculo ajustado a 10^6 UFC/mL incubadas a 37 °C por 24 h (Burt et al. 2005). La CMI (mM) se determinó como la concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento bacteriano de células planctónicas. Para la determinación de la CMB (mM) se cuantificó el número de células viables de 3 concentraciones mayores a la CMI incluyendo a esta, para esto se sembraron 20 µL de cada pozo en placas con 20 mL de agar Luria Bertani y se enumeraron las colonias viables. La concentración de carvacrol que inhibió completamente la viabilidad bacteriana se consideró la CMB, este experimento se repitió tres veces.

Para la determinación de la CMIB (mM), se localizó la concentración más baja del compuesto para inhibir la adhesión celular de *P. aeruginosa* en acero inoxidable. En tubos de ensayo con 6 mL de caldo Luria Bertani previamente inoculados (10^6 UFC/mL) que contenía cupones de acero inoxidable (grado 304), se agregaron distintas concentraciones de carvacrol (0-10 mM) y se incubaron a 37 °C por 24 h (Hui y Dykes 2012). Posteriormente, los cupones fueron removidos del medio de cultivo y se lavaron con solución salina estéril (0.9%), para eliminar células débilmente agregadas al acero inoxidable. Los cupones se colocaron en 5 mL de solución salina estéril y fueron sometidos a un baño de ultrasonido (40 kHz) por 5 min para liberar células adheridas, estas fueron contadas en placas con 20 mL de agar Luria Bertani incubadas por 24 h a 37

°C. Finalmente, la concentración que inhibió completamente el crecimiento de bacterias adheridas se determinó como la CMIB (Kerekes et al. 2013).

La CMEB (mM) se evaluó exponiendo biopelículas preformadas durante 24 h de incubación de un inóculo de 1×10^6 UFC/mL de *P. aeruginosa* en 6 mL de caldo Luria Bertani en cupones de acero inoxidable (Chamdit y Siripermpool 2012). Posteriormente, se lavaron los cupones con solución salina estéril para eliminar células débilmente adheridas, y luego fueron expuestos (30 min) a carvacrol (7-10 mM). Los cupones fueron sometidos a un baño con ultrasonido en 3 mL de solución salina estéril, para desprender las células, la viabilidad de estas se determinó enumerando en diluciones seriadas en placas de agar Luria Bertani incubadas por 24 h a 37 °C. Finalmente, la concentración donde no se detectaron células sobrevivientes fue considerada como CMEB, este experimento se repitió tres veces.

5.2 Mecanismo Inhibitorio del Carvacrol sobre la Adhesión de Células de *Pseudomonas aeruginosa* a Superficies de Acero Inoxidable

Con el propósito de determinar el mecanismo inhibitorio del carvacrol sobre la adhesión de *P. aeruginosa* en superficies de acero inoxidable se prosiguió a determinar una concentración del compuesto (<CMIB) que disminuyera la adhesión bacteriana sin afectar la viabilidad. Esto se realizó para descartar el efecto de la pérdida de viabilidad por efecto del compuesto sobre la formación de biopelículas. Lo anterior se realizó aplicando las condiciones para la formación de biopelículas descritas en el apartado anterior, tomando diferentes tiempos de muestreo (6, 12, 24, 48 h). En cada tiempo se cuantificó la viabilidad de células planctónicas y adheridas en acero inoxidable, como se describió anteriormente, expresando estos resultados como Log UFC/mL para planctónicas y Log UFC/cm² para sésiles, este experimento se realizó por triplicado.

5.3 Análisis Microscópico de los Cambios Morfológicos durante la Formación de Biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en Superficies de Acero Inoxidable Expuestas a Carvacrol

El microscopio invertido de fluorescencia Axio Vert 1 (Carl-Zeiss, NY, EUA) se utilizó para observar cambios morfológicos y evaluar el área cubierta durante la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, aplicando las dosis de carvacrol (<CMIB) obtenidas en el apartado anterior sobre cubreobjetos de vidrio estériles. Por cuestiones técnicas y de funcionamiento del microscopio se utilizó una superficie de vidrio para este ensayo lo cual permitió una mejor apreciación de la formación de la biopelícula en comparación con la superficie de acero inoxidable. Inicialmente las muestras fueron lavadas con agua destilada estéril para remover células débilmente adheridas, después se realizó una tinción durante 30 min utilizando el fluoróforo Syto 9 (0.1%) para identificar células viables adheridas en los agregados. Las células agregadas se observaron con aceite de inmersión (Carl-Zeiss) en el objetivo 40x con filtro Alexa Fluor. El porcentaje de área cubierta se obtuvo utilizando el software ImageJ (KCL, Londres, UK) versión 2016, midiendo el porcentaje de área teñida de la superficie de vidrio donde se formaron las biopelículas, este experimento se realizó por triplicado.

5.4 Cambios en la Síntesis de Pilocianina de *Pseudomonas aeruginosa* Expuesta al Carvacrol

Para evaluar el efecto del carvacrol sobre la producción de la toxina pilocianina de *P. aeruginosa* se utilizó la técnica descrita por Adonizio et al. (2008). A partir del tratamiento de *P. aeruginosa* (1×10^6 UFC/mL) con carvacrol (0-7.9 mM), se tomaron 6 mL de cultivos expuestos a carvacrol por 48 h a 37 °C y se centrifugaron (5000 g/ 5 min) con 2 mL de cloroformo; la fase orgánica se solubilizó en 2 mL de ácido clorhídrico (HCl, 0.2 M). Posteriormente se midió la densidad óptica de cada tratamiento

a 520 nm en un espectrofotómetro UV-visible (JENWAY, Staffordshire, Reino unido), utilizando agua bidestilada con HCl como blanco. Los resultados se expresaron como porcentaje de producción de piocianina. Adicionalmente, se evaluó la viabilidad de los cultivos bacterianos por dilución seriada en placa como se describió anteriormente para descartar cambios en la producción de la toxina por pérdidas de viabilidad, este experimento se realizó por triplicado.

5.5 Cambios en la Motilidad de *Pseudomonas aeruginosa* Expuesta al Carvacrol

La motilidad de *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol se determinó utilizando la metodología propuesta por Cheng et al. (2016). El movimiento tipo "swarming" se atribuye a una translocación grupal de las poblaciones bacterianas en la superficie de un medio de cultivo semisólido. Para el caso de *P. aeruginosa*, este tipo de motilidad es de las más reportadas y relacionadas con la comunicación intercelular. Este ensayo se realizó partiendo de cultivos de *P. aeruginosa* (1×10^6 UFC/mL) en 6 mL de caldo Luria-Bertani expuestos a carvacrol (0-7.9 mM), posteriormente fueron inoculados en placas de agar Luria-Bertani semisólido (0.5% agar) incubadas a 37 °C por 24 h. Finalmente se midió el área de propagación del crecimiento de las bacterias con un vernier, expresando los resultados en mm, este ensayo se realizó por triplicado.

5.6 Efecto del Carvacrol Sobre la Producción de Moléculas Autoinducidas Acil-homoserina Lactonas de *Pseudomonas aeruginosa*

Para evaluar el efecto del carvacrol sobre la comunicación intercelular de *P. aeruginosa* se analizó la producción de acil-homoserina lactonas por cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (UPLC-PDA) (Li et al. 2007). Para la obtención de muestras de moléculas autoinducidas se utilizaron cultivos de *P.*

aeruginosa (1×10^6 UFC/mL) expuestos a carvacrol (0-7.9 mM) por 48 h a 37 °C. Posteriormente fueron centrifugados ($15,800 \times g/10$ min) para obtener sobrenadantes libres de células. Previo a su análisis por cromatografía, los sobrenadantes pasaron por cartuchos de separación en fase sólida (SPE) con acetonitrilo (25%) e isopropanol-hexano 85/15 (v/v). Finalmente fueron secadas con nitrógeno por 30 min y eluidas en acetonitrilo (30%) para su análisis.

El análisis de acil-homoserina lactonas fue realizado en un cromatógrafo Waters UPLC (Mildred, MA, USA) equipado con un detector de arreglo de diodos DAD 2996. Se utilizó el software Empower (Waters) para la obtención y análisis de resultados. Las corridas experimentales fueron a 60 °C con una columna (BEH C18, 1.7 μ m, 3 x 100mm; Waters). El volumen de muestra fue de 5 μ L a un flujo de 0.8 mL/min, la fase móvil utilizada fue acetonitrilo-agua 20% incrementando a 100% en 5 min con una longitud de onda de detección de 197-400 nm. La identificación se realizó por la comparación de espectros UV, utilizando una base de datos previamente realizada con estándares de referencia de butiril-homoserina lactona, hexanoil-homoserina lactona, octanoil-homoserina lactona, decanoil-homoserina lactona y oxo-dodecanoil-homoserina lactona (Sigma Aldrich, Toluca, México). La cuantificación se realizó utilizando curvas estándar de 10 puntos de las moléculas correspondientes y los resultados se reportaron como μ M de acil-homoserina lactonas. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.7 Efecto del Carvacrol sobre la Expresión Relativa de los Genes *lasI/lasR* de *Pseudomonas aeruginosa*

La obtención del material genético para validar los iniciadores de los genes *lasR* y *lasI* fue a partir de cultivos de *P. aeruginosa* (1×10^6 UFC/mL) crecidos en caldo LB a 37 °C por 24 h. La extracción del RNA se realizó con un kit comercial (Invitrogen, USA) y se purificó utilizando DNaseI (Ambion, California, USA). Posteriormente se cuantificó su concentración utilizando un espectrofotómetro Nano-Drop 2000 (Thermo-Scientific, Massachusetts, USA) a longitudes de onda de 260-280 nm para descartar contaminación

por proteínas. Por otra parte, se realizó una electroforesis de agarosa (0.1%) para comprobar la integridad del RNA. Finalmente se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), con el propósito de obtener el cDNA libre de intrones para evaluar la expresión de los genes *lasR* y *lasI*. Para este ensayo se utilizó un kit con la enzima Superscript III (ThermoFisher, Massachusetts, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor conservando las muestras a -80 °C.

Para evaluar la especificidad de los iniciadores de *P. aeruginosa*, se utilizaron las siguientes secuencias reportadas en bibliografía (Cotar et al. 2010) para evaluar los genes *lasR* (LasR-F 5'-TGCCGATTTTCTGGGAACC-3', LasR-R 5'-CCGCCGAATATTTCCCATATG-3'), *lasI* (LasI-F 5'-TCGACGAGATGGAAATCGATG-3', LasI-R 5'-GCTCGATGCCGATCTTCAG-3'), y como gen constitutivo se utilizaron iniciadores del gen 16S rRNA (16S-F 5'-CAAACACTACTGAGCTAGAGTACG-3', 16S-R 5'-TAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT-3'). Se realizaron las curvas de rangos dinámicos de cDNA (0.16-250 ng). Estos ensayos fueron realizados por triplicado y teniendo un control de reacción por cada gen analizado.

Se analizó el efecto del carvacrol (<CMIB) sobre la expresión relativa de los genes *lasR* y *lasI* de *P. aeruginosa* durante la formación de biopelículas. Se extrajo RNA y se obtuvo cDNA de los tratamientos siguiendo los protocolos mencionados anteriormente, para llevar a cabo la cuantificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). El análisis cuantitativo se llevó a cabo utilizando SYBR® Green Supermix (Biorad, California, EUA), todas las muestras fueron analizadas por triplicado, cada reacción incluyó 50 ng de cDNA como templado, 10 µL de SYBR Green qRT-PCR Master Mix, 1 µL de iniciador *lasR*-F o *lasI*-F, 1 µL de iniciador *lasR*-R o *lasI*-R y 3 µL de agua para un volumen total de 20 µL por reacción.

Los productos de PCR se amplificaron en un sistema de PCR en tiempo real Step-One™ (Applied Biosystems, California, EUA). Las condiciones de amplificación fueron de 40 ciclos que incluyeron secuencialmente 95 °C durante 5 min, 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 5 min. La especificidad de productos de PCR fue confirmada mediante la construcción de una curva de fusión después de la amplificación

de la temperatura de elevación desde 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 minuto y 95 °C durante 15 s. Se incluyeron controles sin templado durante cada amplificación génica. El método $2^{-\Delta\Delta CT}$ fue utilizado para evaluar los cambios en el cantidad relativa de RNAm de los genes *lasR* y *lasI* (Livak y Schmittgen 2001). Los datos fueron analizados en función del ciclo umbral (CT) de cada muestra durante la amplificación por PCR, donde: $\Delta\Delta CT = - ((CT (LasR/LasI) - CT (16S)) - (CT_{Avg}(lasR/lasI) - CT_{Avg}16S))$, y Avg correspondió a los CT promediados de las amplificaciones de los genes. Los resultados se expresaron como niveles relativos de expresión del RNAm de los genes diana *lasR* y *lasI* y normalizados a niveles de expresión del gen constitutivo *16S*. Este experimento se realizó por triplicado.

5.8 Perfil de Proteínas de *Pseudomonas aeruginosa* Expuestas a Carvacrol

En este estudio se evaluaron los cambios en el perfil de proteínas de *P. aeruginosa* expuestas a carvacrol siguiendo el protocolo de Nazzaro et al. (2009). Este análisis se realizó con el propósito de relacionar los cambios en la expresión de genes con el contenido de proteínas involucradas en la comunicación intercelular de *P. aeruginosa*. Inicialmente, partiendo de cultivos de *P. aeruginosa* (10^6 UFC/mL) previamente expuestos a carvacrol (0-3.9 mM) por 48 h, se tomaron 6 mL y se centrifugaron durante 10 minutos (11,600 g a 4 °C; Heraeus, Cavenago Brianza, Italia) y se lavaron con 1 mL de Tris-HCl 0.05 mM. El pellet obtenido se resuspendió en 300 μ L de Tris-HCl (0.05 mM) con SDS (2%). Posteriormente, las muestras se fueron colocadas en un baño de sonicación durante 3 min y se mezclaron por 5 min con perlas de vidrio (Sigma Aldrich, Toluca, México) con 0.15-0.2 mm de diámetro a 100 °C. Las perlas de vidrio se eliminaron por centrifugación (11,600 g a 4 °C) durante 15 min, las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Los perfiles de proteínas se analizaron usando una electroforesis Lab-on-a-chip (Experion Pro260 Kit, Biorad, California, EUA.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Finalmente, el contenido de proteínas se

midió con un analizador Experion™ usando un láser semiconductor de 10 mW a 630 nm. Todos estos experimentos se realizaron por triplicado.

5.9 Anclaje Molecular in silico (Docking) de Proteínas LasI y LasR de *Pseudomonas aeruginosa* con Carvacrol

En este estudio se realizó un anclaje molecular (docking) para analizar los posibles sitios de interacción del carvacrol con las proteínas LasI y LasR de *P. aeruginosa*. Como modelo se utilizaron las estructuras cristalográficas de las proteínas LasI (PDB 1RO5) y LasR (PDB 2UV0) (Bottomley et al. 2007; Gould et al. 2004) y como ligando se utilizó carvacrol (PubChem 10364). El proceso de docking se llevó a cabo utilizando la aplicación AutoDocvina en el software UCSF Chimera versión 11.2 (Pettersen et al. 2004). Se obtuvieron 6 poses de las posibles interacciones a un nivel de exhaustividad de 8 con una diferencia máxima de energía de 3 kcal/mol. Los resultados de la interacción se expresaron como energía de afinidad (kcal/mol).

5.10 Diseños Experimentales y Análisis de Datos

Se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado a todos los ensayos del presente estudio. Para evaluar el efecto de carvacrol en la formación de biopelículas, de *P. aeruginosa*, los factores experimentales fueron dosis de carvacrol (0-7.9 mM) y tiempo de muestreo (6, 12, 24 y 48 h), las variables de respuesta fueron las células adheridas (Log UFC/cm²) y área cubierta (%). Para los efectos de carvacrol contra la producción de AHL de *P. aeruginosa* (μM), motilidad (mm) y expresión relativa de los genes *lasR/lasI*, el factor experimental fueron los tratamientos con carvacrol (0-7.9 mM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias estadísticas, y se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey Kramer. Además, se realizó una correlación de Pearson entre el contenido de AHL con los factores de virulencia. El nivel de significancia se estableció en $P \leq 0.05$, utilizando el software NCSS versión 2007 para el análisis de resultados (Hintze 2009).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 6 se muestra la actividad antibacteriana del carvacrol contra *P. aeruginosa* en estado planctónico y sésil. Las dosis requeridas para inhibir el crecimiento en estado planctónico (CMI) fue de 3.9 mM, comparado con 7.9 mM que fue lo necesario para inhibir la adhesión (CMIB) de *P. aeruginosa* en superficies de acero. Adicionalmente, se obtuvieron concentraciones de 8.6 y 10 mM para erradicar la viabilidad de células libres (CMB) y embebidas dentro de las biopelículas (CMEB). Se observó que es necesaria una mayor concentración del terpeno para inhibir la formación de las biopelículas comparado con la dosis necesaria para inhibir el desarrollo del inoculo bacteriano. Además, se evidencia la interferencia que causan las sustancias poliméricas extracelulares de la biopelícula sobre la efectividad antibacteriana del carvacrol, necesitándose mayor concentración de carvacrol para erradicar las células embebidas en comparación con las planctónicas. La capacidad antibacteriana del carvacrol sobre células de *P. aeruginosa* se puede atribuir a sus características hidrofóbicas, ya que este compuesto posee un coeficiente de partición (log P) de 3.52, que refleja su afinidad por membranas citoplasmáticas. De hecho, los compuestos lipofílicos que poseen una alta afinidad por membranas celulares pueden alterar la estabilidad de la bicapa bacteriana, lo que da como resultado un aumento de flujo de protones a través de ésta, causando un efecto dañino para las bacterias (Ben Arfa et al. 2006). Por otra parte, el potencial antibacteriano del carvacrol logra ser más efectivo que otros terpenos como el eugenol que presenta un log P de 2.7 y requiere una dosis más elevada (10 mM) para inhibir el crecimiento de bacterias como *Bacillus subtilis* y *S. aureus*, en comparación del carvacrol que requiere una dosis menor (0.79 mM) (Ultee et al. 2002). Además, este efecto también puede ser atribuido al grupo hidroxilo (OH) en la estructura del carvacrol, ya que se hipotetiza que este grupo funcional le permite interactuar con proteínas mediante puentes de hidrógeno, afectando su funcionalidad.

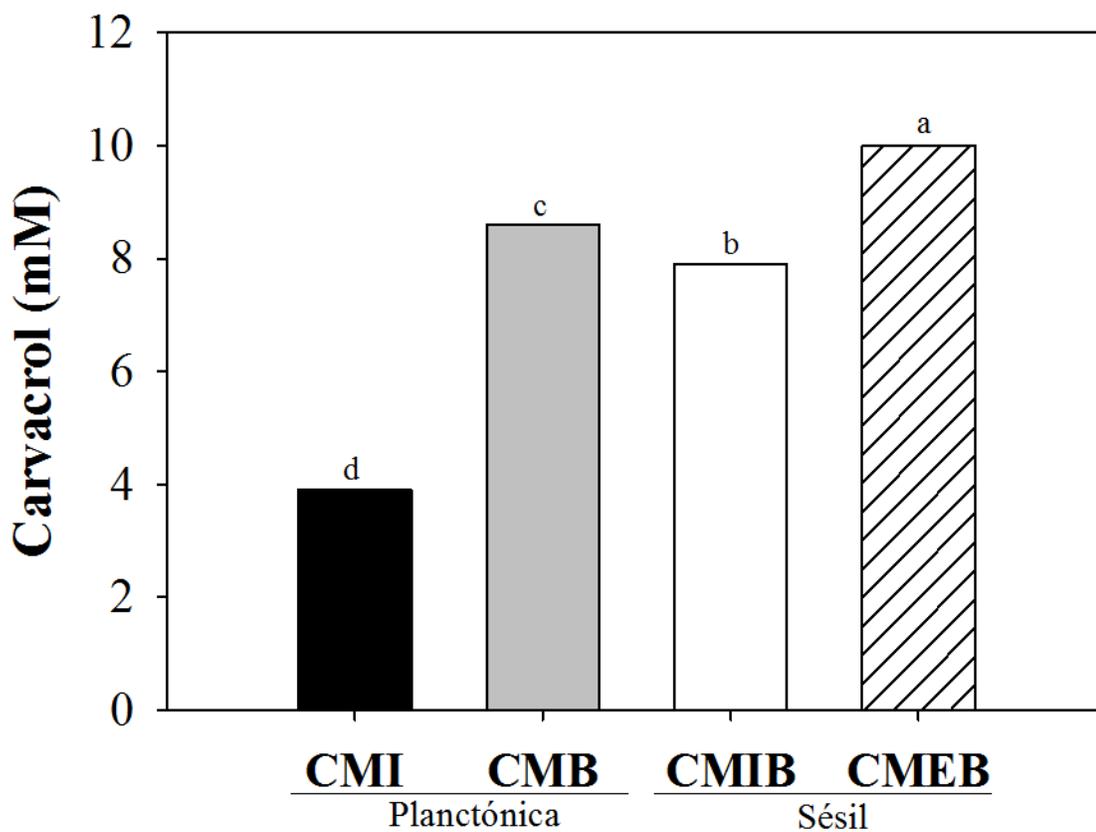


Figura 6.- Dosis efectivas de carvacrol para inhibir y erradicar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil. CMI = Concentración mínima inhibitoria, CMB = Concentración mínima bactericida, CMIB = Concentración mínima inhibitoria de biopelícula, CMEB = Concentración mínima de erradicación de biopelícula. Literales diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de carvacrol ($P \leq 0.05$).

Cuando las bacterias realizan su conversión de modo planctónico al agregado en biopelículas estas inician la síntesis de distintos componentes exopolisacáridos que le brindan mayor resistencia a las células embebidas contra el ataque de antibióticos (Flemming y Wingender 2010). Esta matriz favorece la sobrevivencia bacteriana y obstaculiza la erradicación de las células durante los tratamientos de desinfección, pudiendo prevalecer en la mayoría de las superficies donde se forme (Phillips 2016). En el caso de *P. aeruginosa* su resistencia es debida a la producción de sustancias poliméricas, las cuales interfieren el paso de antimicrobianos y se relacionan con la adhesión irreversible durante la formación de biopelículas (Strateva y Yordanov 2009). De manera similar a lo observado en nuestro estudio Uchida et al. (2014), demostraron que es necesaria una dosis mayor de carvacrol para afectar la viabilidad de células de *Salmonella* Saintpaul embebidas en biopelículas (0.77 mM) en acero inoxidable, en comparación con la dosis necesaria para inhibir la adhesión (0.25 mM). Los resultados anteriores demuestran el potencial antibacteriano del carvacrol contra células planctónicas y embebidas en biopelículas de *P. aeruginosa* lo cual resalta la importancia de elucidar los posibles mecanismos de acción de este terpeno sobre la adhesión y virulencia de *P. aeruginosa*.

La Figura 7 muestra el efecto del aumento de la dosis del carvacrol sobre la adhesión de células de *P. aeruginosa* en superficies de acero inoxidable, además de la viabilidad de las bacterias en suspensión. Las dosis empleadas fueron menores que la CMIB (5.9 mM), donde no se observaron células adheridas y ocurrió una disminución en la densidad celular. Estos resultados muestran un efecto significativo ($P \leq 0.05$) en todas las concentraciones probadas de carvacrol sobre las células adheridas reportando reducciones entre 1.5-3 Log UFC/cm², sin afectar la viabilidad de las células planctónicas en suspensión. Estos resultados mostraron que el carvacrol presenta un modo de acción específico sobre la formación de biopelículas, más allá de afectar la viabilidad celular en *P. aeruginosa*.

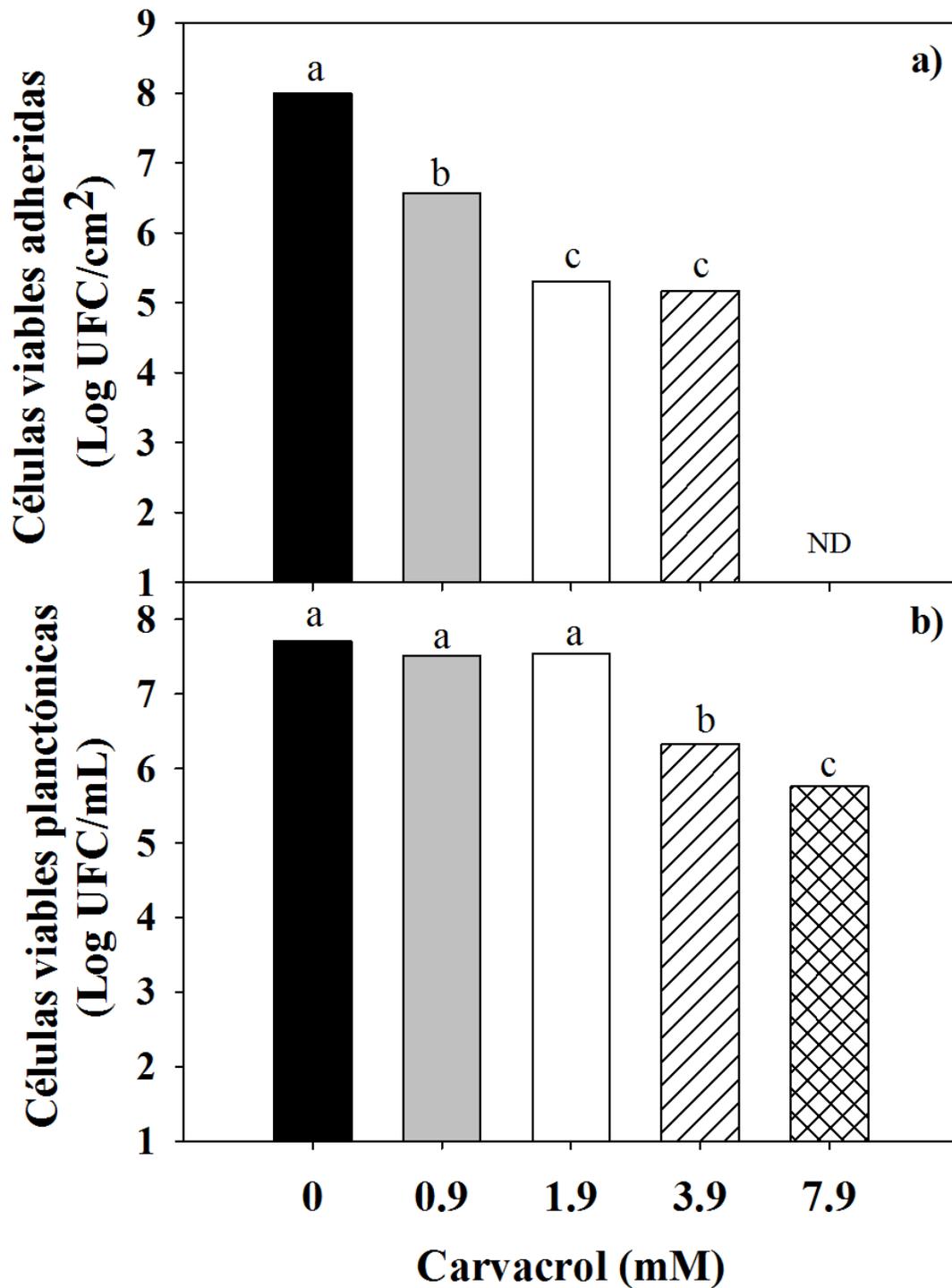


Figura 7.- Efecto del aumento de la dosis de carvacrol sobre la viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* adheridas a superficies de acero inoxidable (a) y en estado planctónico (b). ND = no detectado. Literales diferentes indican diferencias significativas entre las concentraciones de carvacrol ($P \leq 0.05$).

Con base a los resultados obtenidos anteriormente se seleccionó la concentración de 1.9 mM de carvacrol para evaluar el modo de acción de este terpeno sobre la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. El carvacrol a 1.9 mM redujo hasta 20% del área cubierta de biopelículas de *P. aeruginosa* en superficies de vidrio (Figura 8Ba); Mientras tanto, las células adheridas durante la formación de biopelícula a 48 h de *P. aeruginosa* en acero inoxidable se redujeron hasta 1.5 Log UFC/cm² comparadas con las que fueron expuestas a carvacrol (Figura 8Bb). De manera adicional, mediante microscopias de epifluorescencia se demostró que el carvacrol disminuyó el área cubierta de biopelículas de *P. aeruginosa* en cubreobjetos de vidrio (Figura 8C), observando microcolonias más pequeñas y dispersas con una menor saturación de redes de células adheridas causando un impacto negativo en la formación del biopelículas. Además, los niveles de producción de la molécula autoinductora que regula la formación de biopelículas C12-AHL (Figura 8A) fueron diferentes entre el control y las bacterias tratadas con carvacrol ($P \leq 0.05$), mostrando una reducción significativa de hasta 60% usando 3.9 mM de carvacrol, sin afectar la viabilidad celular. El área cubierta y la densidad celular en las biopelículas de *P. aeruginosa* demostró una correlación altamente significativa ($r = 0.985$; $p = 0.0149$) con las reducciones de contenido de C12-AHL. Lo anterior nos indica que al afectar la producción de esta molécula autoinductora se afecta este factor de virulencia. Adicionalmente, un menor contenido de C12-AHL refleja la inhibición de la actividad de LasI, que sintetiza a la autoinductora iniciando el proceso de comunicación intercelular y consecuentemente otras respuestas dependientes de esta vía de señalización.

Las dosis utilizadas de carvacrol (0.9-1.9 mM) no tuvieron un efecto significativo ($P \geq 0.05$) sobre los niveles de expresión relativa del gen *lasI* (figura 9a), mientras que el gen *lasR* se vio afectado (Figura 9b). Recordando que el gen *lasI* se encarga de codificar para la sintasa LasI y el gen *lasR* para la proteína receptora LasR, encargadas de la síntesis y detección de AHL, respectivamente en *P. aeruginosa*. La concentración más alta de carvacrol (1.9 mM) utilizada en este ensayo, presentó una expresión relativa muy baja del gen *lasR* de 0.0044, mientras que el gen *lasI* mantuvo su expresión relativa a valores de 1 en ambos tratamientos. Niveles de expresión relativa ≤ 1 están asociados a una disminución en la transcripción del gen *lasR*. Estos resultados mostraron una

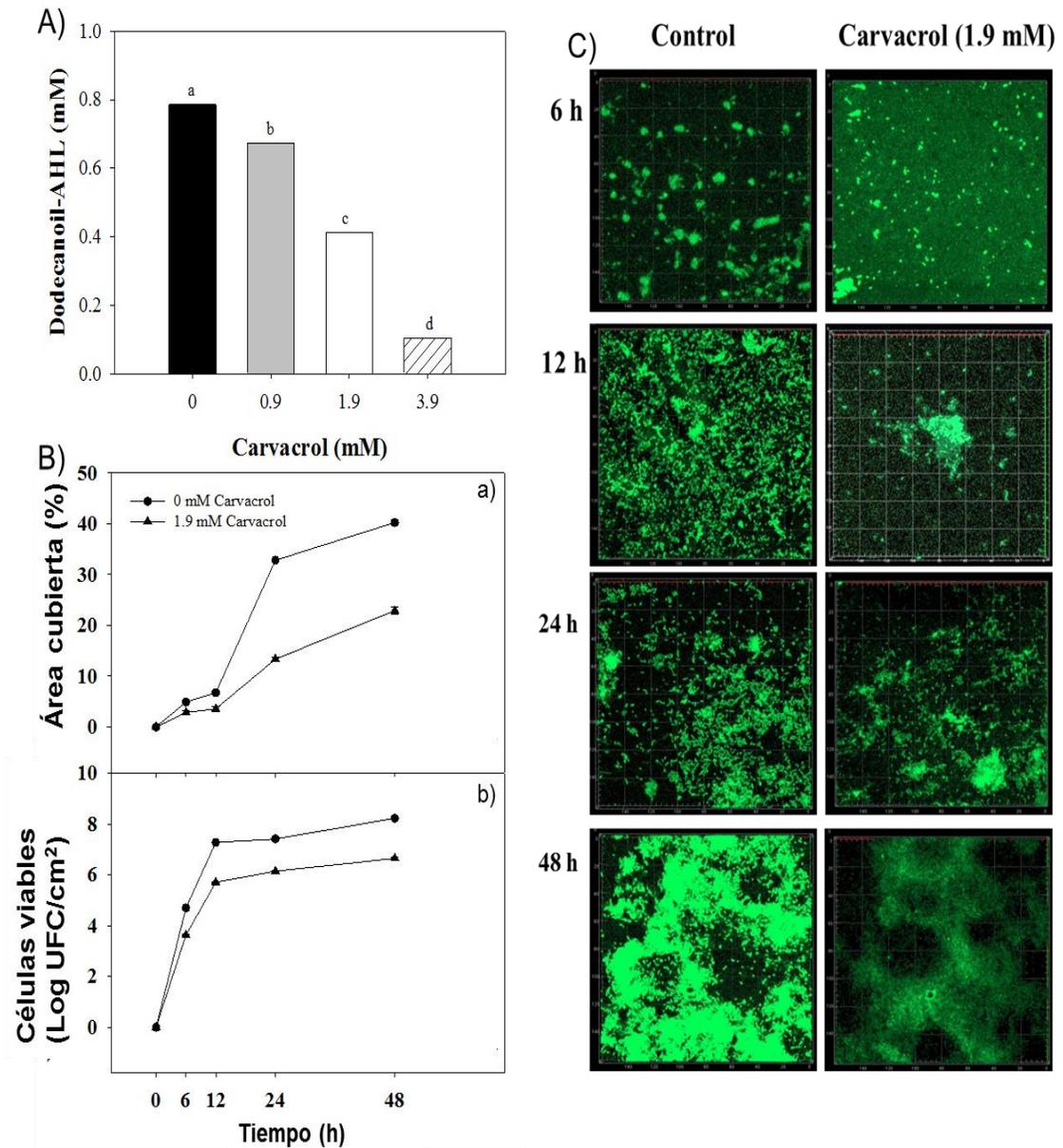


Figura 8. (A) Producción de dodecanoil-homoserina lactonas (C12-AHL) de *P. aeruginosa* expuestas a diferentes concentraciones de carvacrol (0-3.9 mM). Diferentes literales indican diferencias estadísticas con el control ($P \leq 0.05$). (B) Área cubierta durante el desarrollo de biopelícula de *P. aeruginosa* en ausencia y presencia de carvacrol (a); células viables durante la formación de biopelícula de *P. aeruginosa* en acero inoxidable a 37 ° C en presencia de carvacrol (b). * valores medios de tres repeticiones. (C) Microscopías de epifluorescencia (40X) de biopelículas de *P. aeruginosa* en cubreobjetos incubadas a 37 ° C durante 6, 12, 24 y 48 h en caldo LB en ausencia y presencia de carvacrol a 1.9 mM.

inhibición de la actividad de LasI por parte del carvacrol, reflejándose en una menor producción de C12-AHL que concomitantemente afectó la expresión relativa del gen *lasR*.

La Figura 10a muestra un efecto inhibitorio sobre la producción de C4-AHL ($P \leq 0.05$), la molécula autoinductora responsable de la síntesis de piocianina. Por otra parte, la Figura 10b muestra inhibiciones significativas ($P \leq 0.05$) sobre la síntesis de piocianina, un factor de virulencia relacionado con la patogenicidad de *P. aeruginosa*. El carvacrol presentó un efecto dosis dependiente, es decir, a mayor concentración de carvacrol se obtiene una mayor inhibición de pigmento hasta inhibirla por completo a 7.9 mM. Sin embargo, a la concentración de 1.9 mM podemos observar una reducción de 35 % de esta toxina en comparación con el control. Es importante mencionar que esta dosis ha sido efectiva para reducir tanto la formación de biopelículas como la expresión relativa de *lasR* de *P. aeruginosa*, sin afectar la viabilidad celular, lo que nos indica que el carvacrol está afectando la comunicación intercelular de esta bacteria. Se observó una correlación positiva significativa ($r = 0.92$, $P = 0.0226$), entre la reducción de C4-AHL con la inhibición de piocianina.

Este efecto puede asociarse a la interrupción de la actividad de LasI con la concomitante disminución de los niveles de C12-AHL y la menor expresión del gen *lasR*. Adicionalmente, una menor expresión del gen *lasR* desencadena una menor cantidad de la proteína sensora de AHL LasR y una menor actividad del sistema RhII encargadas de la síntesis de C4-AHL. Esta autoinductora forma el complejo RhIR-C4-AHL para regular la síntesis de piocianina. Estos resultados permiten visualizar la relación de ambas variables experimentales y como el carvacrol muestra un efecto modulador sobre la virulencia y comunicación intercelular tanto a nivel genotípico como fenotípico.

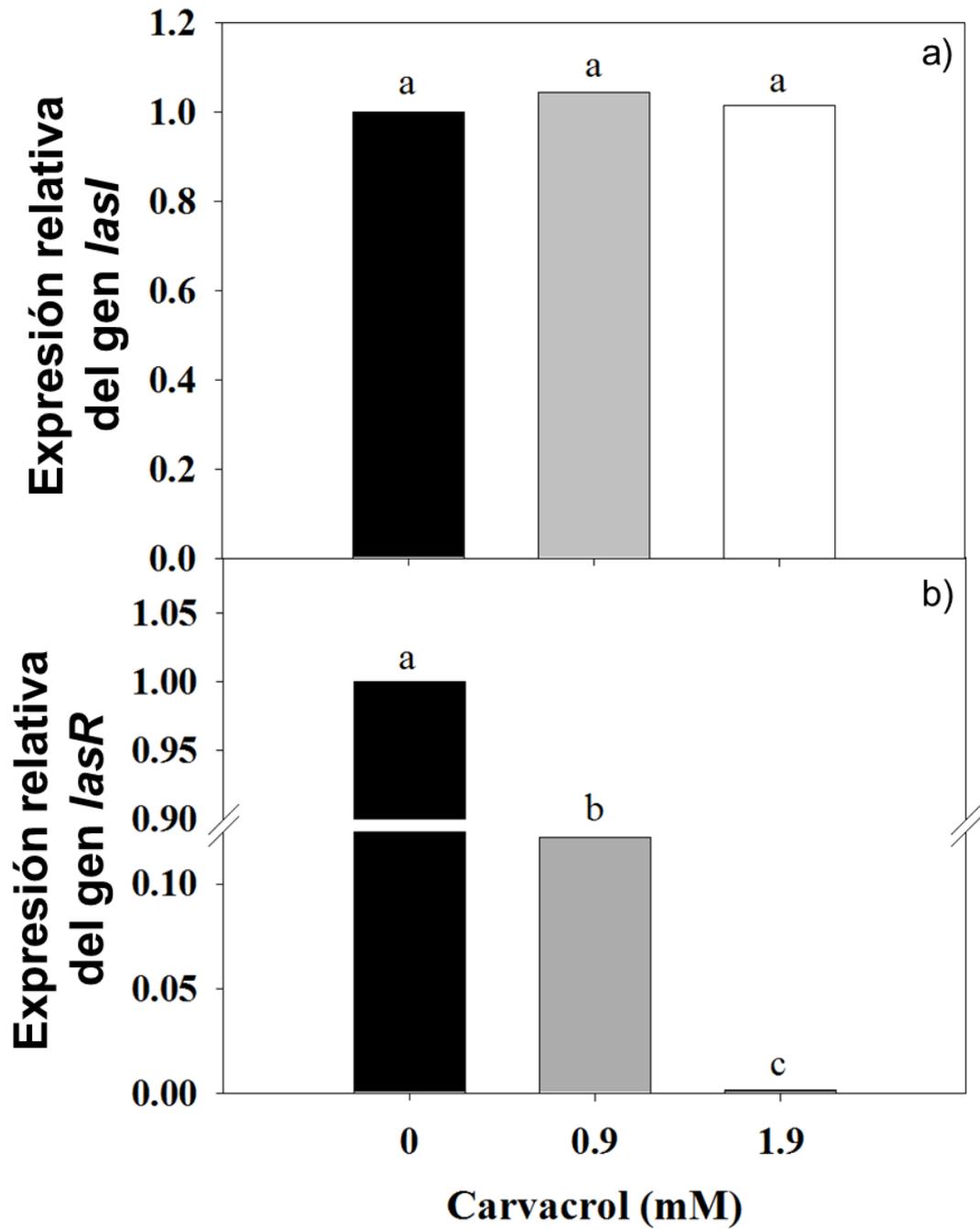


Figura 9. Expresión relativa del gen *lasI* (a) y *lasR* (b) en *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol (0.9 y 1.9 mM). *Significativamente diferente en comparación con el control ($P \leq 0.05$).

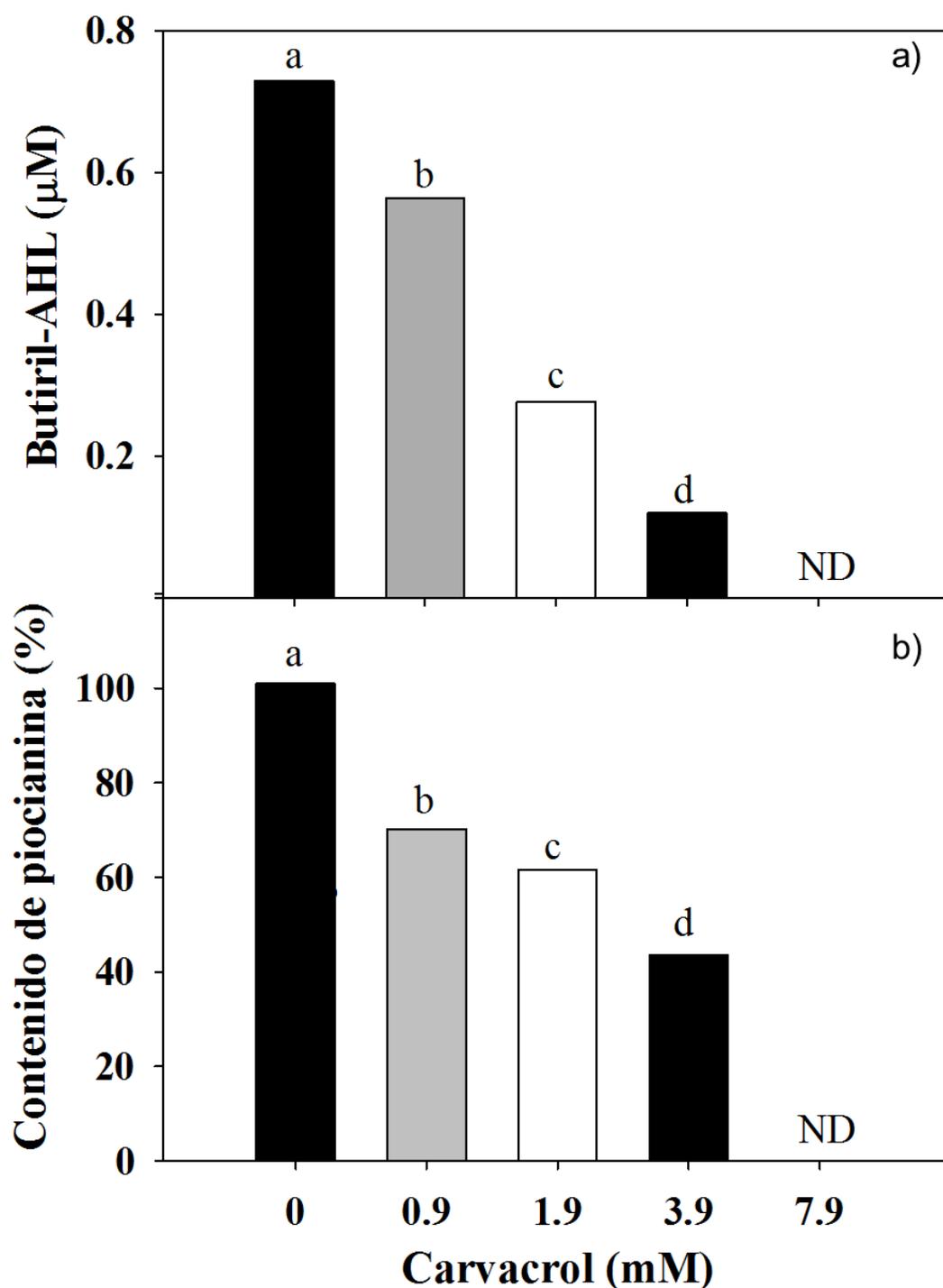


Figura 10. (a) Producción de butiril-homoserina lactonas (C4-AHL) de *P. aeruginosa* expuestas a diferentes concentraciones de carvacrol (0-7.9 mM). (b) Cambios en la síntesis de piocianina de *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol (0-7.9 mM). Diferentes literales indican diferencias estadísticas con el control ($P \leq 0.05$).

En la Figura 11a se puede observar una disminución significativa de C6-AHL, la molécula autoinductora que está implicada con la regulación de la motilidad. Adicionalmente, la figura 11b muestra un efecto dosis dependiente del carvacrol sobre la inhibición de la motilidad en *P. aeruginosa*. Este terpeno redujo significativamente la motilidad de *P. aeruginosa* ($P \leq 0.05$), siendo las dosis de 1.9 y 3.9 mM las que redujeron mayormente este factor de virulencia, sin comprometer la viabilidad celular. Además se encontró una alta correlación positiva y significativa ($r = 0.9$, $P = 0.011$) entre la disminución de ambas variables. Por otra parte, inhibir la motilidad puede ser un factor importante ya que al inicio de la formación de biopelículas las bacterias inician con la adhesión reversible que se da por medio del movimiento flagelar regulado por QS en *P. aeruginosa*. Específicamente se ha relacionado la producción de C6-AHL con la expresión del gen *flgA*, regulado mediante el complejo RhlR-C6-AHL que modula el contenido de flagelina, responsable de la formación de apéndices que otorgan la motilidad celular (Myszka et al. 2016). Por lo tanto, la aplicación de terpenos como el carvacrol puede ser una herramienta para disminuir la motilidad y la consecuente adhesión celular que da pie a la formación de biopelículas.

Por otra parte, los perfiles proteicos de las bacterias tratadas con carvacrol, mostraron que la mayoría de las proteínas con un rango de 25-50 kDa se atenuaron (Figura 12) en comparación con las células no tratadas. Estos resultados podrían estar relacionados con una disminución en el contenido proteico de esas biomoléculas relacionadas con la virulencia de *P. aeruginosa*. Tales cambios podrían deberse a una disminución de los los receptores LasR/RhlR, que tienen rangos de peso molecular entre 23-26 kDa, proteasa (LasA), elastasa (LasB) y flagelina en 45-50 kDa, que son importantes factores de virulencia en *P. aeruginosa*. Sin embargo, es importante realizar estudios específicos para comprobar tal efecto, que podría involucrar análisis de cambios genéticos y actividad de las proteínas antes mencionadas.

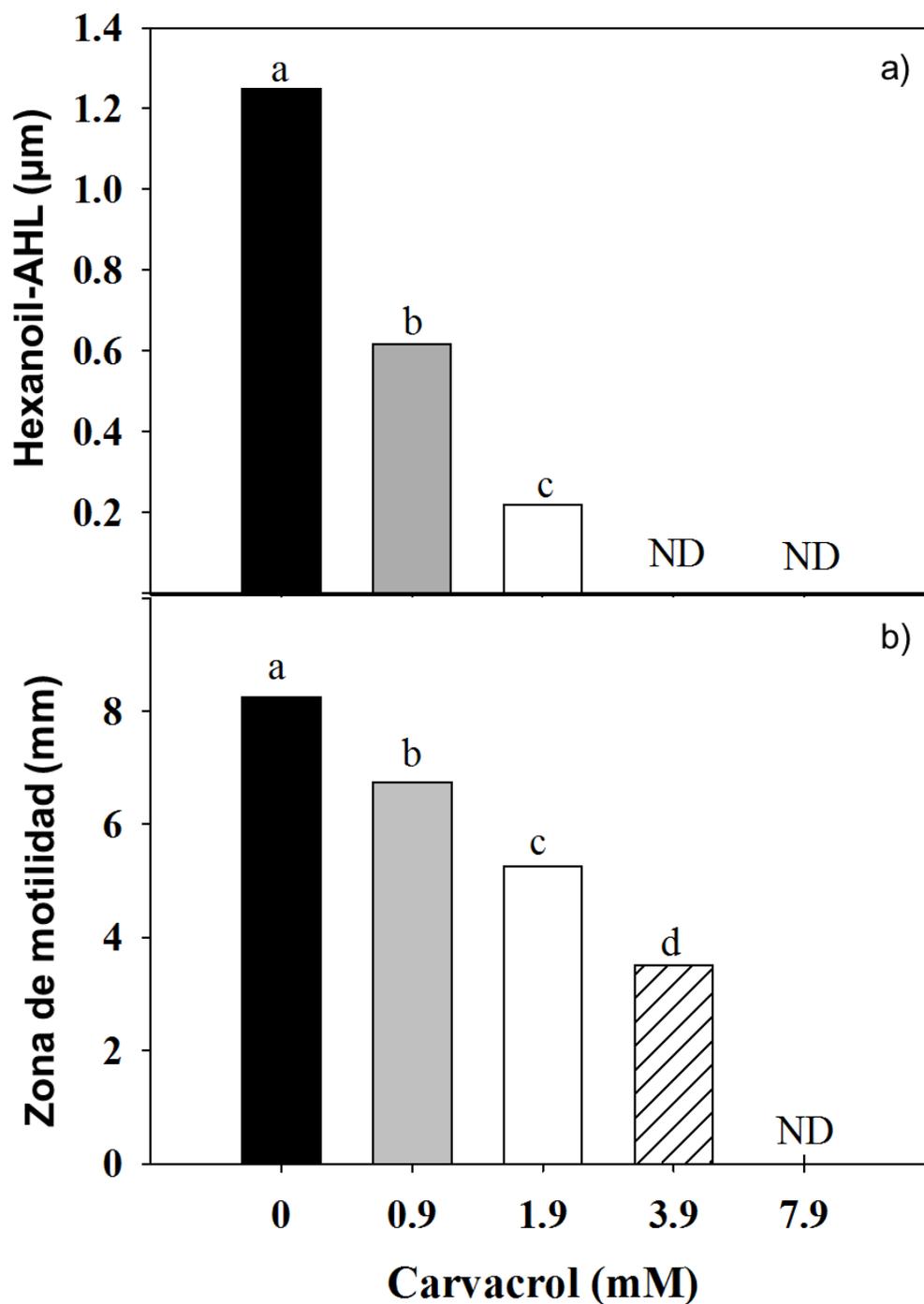


Figura 11. (a) Producción de hexanoil-homoserina lactonas (C6-AHL) de *P. aeruginosa* expuestas a diferentes concentraciones de carvacrol (0-7.9 mM). (b) Motilidad de *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol e incubada a 37 ° C. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar (SD) de tres muestras. Diferentes literales indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).

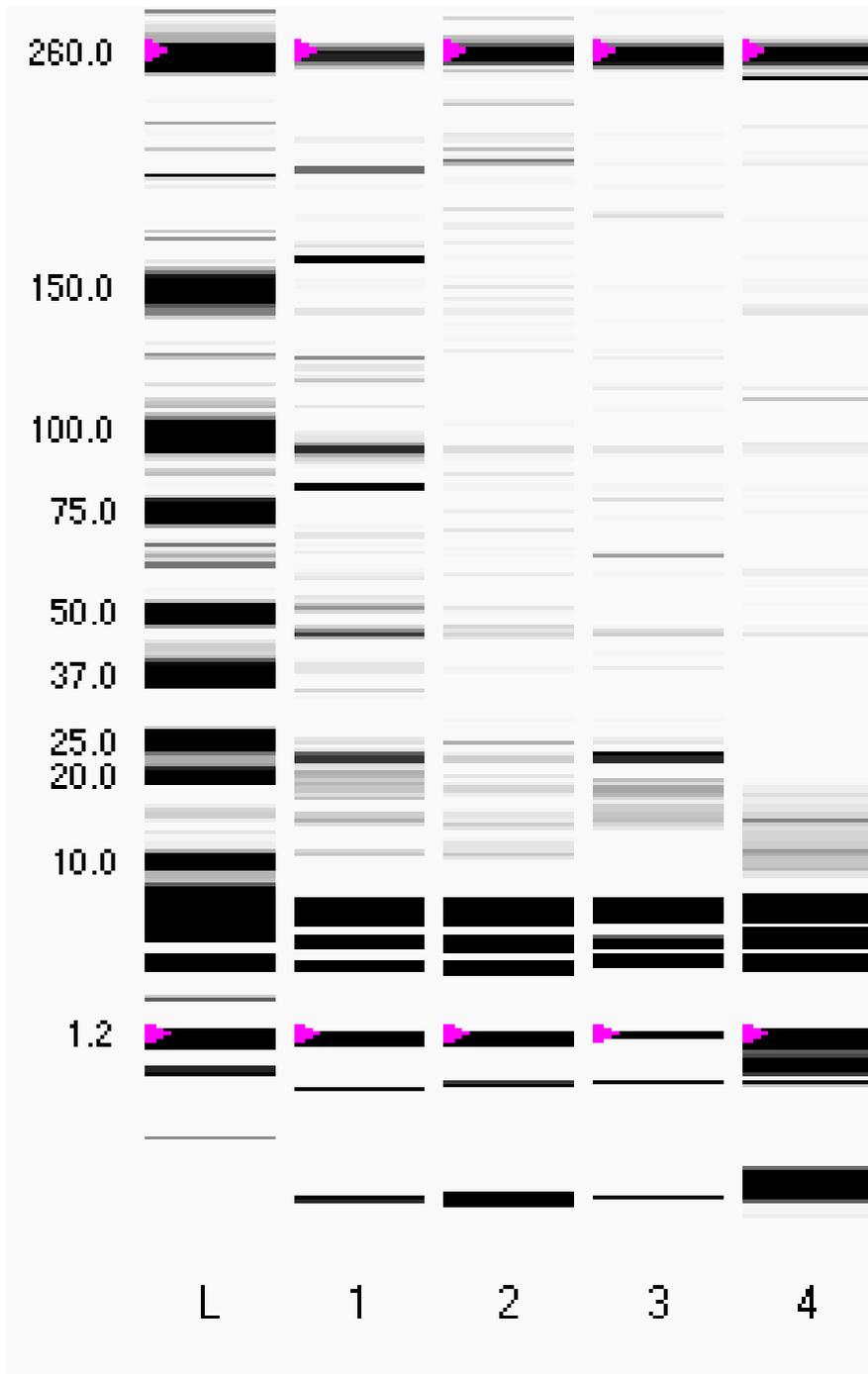


Figura 12. Perfil de proteínas de *P. aeruginosa* expuesta a carvacrol (0-3.9 mM) después de 48 h a 37 °C; banda 1: control, banda 2: 0.9 mM, banda 3: 1.9 mM, banda 4: 3.9 mM de carvacrol, banda L: marcador de peso molecular (kDa).

La contribución del presente estudio al conocimiento preexistente, es el modo de acción del carvacrol como inhibidor del QS y la virulencia de *P. aeruginosa*, evidenciado como una disminución de la actividad de LasI y una disminución consiguiente en la producción de C12-AHL, causa una reducción en la expresión relativa de *lasR*, y una menor síntesis de C6-AHL y C4-AHL. Una menor síntesis de estas autoinductoras causa la disminución de la síntesis de piocianina y motilidad; mientras que la formación de biopelículas está relacionada con la detección de C12-AHL. Por lo tanto, el modo de acción anti-QS de carvacrol en *P. aeruginosa* podría deberse a la interacción directa de carvacrol con LasI sintasa, por lo que es interesante conocer las posibles interacciones que de manera específica pueden darse entre el terpeno y tales proteínas.

En cuanto a los resultados obtenidos con el efecto observado de carvacrol en otras bacterias Gram negativas, se evidenció que este terpeno inhibió la formación de biopelículas y disminuyó la motilidad de *P. carotovorum* y *E. coli* (Gutierrez-Pacheco et al. 2018; Lee et al. 2017). Además, el carvacrol disminuyó la actividad enzimática pectolítica de *Pectobacterium*, este efecto se relacionó con una menor expresión relativa de los genes precursores de estas proteínas; sin embargo, no se puede descartar una inhibición directa del carvacrol en las actividades de las enzimas. Asimismo, el carvacrol mostró eficacia para disminuir la producción de SPE en *P. carotovorum*, sin embargo, esto no se ha determinado para *P. aeruginosa*. Comparando con el efecto observado de carvacrol en QS de otros sistemas bacterianos, se puede observar que muy pocos estudios lo han abordado. Joshi et al. (2016b), informaron una reducción en la expresión relativa de los genes *expI* y *expR*, disminuyendo la virulencia de *P. carotovorum* por exposición a carvacrol. Por otra parte, en estudios recientes con otros compuestos anti-QS, se ha demostrado que *P. aeruginosa* expuesta al mentol y al aceite de clavo inhibe la producción de piocianina y reduce la formación de biopelículas (Husain et al. 2013; Husain et al. 2015). Asimismo, Myszka et al. (2016), reportaron una inhibición del contenido de C6-AHL y C8-AHL en *Pseudomonas fluorescens* expuesta al aceite de tomillo, timol y carvacrol, mostrando una disminución en la motilidad, formación de biopelículas y expresión relativa del gen *flgA*; sin embargo, este trabajo no consideró evaluar un posible mecanismo anti-QS como un objetivo. Además, otra investigación reportó que una reducción de la expresión relativa de los genes *lasI*, *lasB* y

lasR afectó el contenido de ramnolípidos y producción de piocianina en *P. aeruginosa* expuestos a 6-gingerol (Kim et al., 2015). Además, se propuso un modo de acción anti-QS del 6-gingerol interactuando con la proteína receptora LasR causando una disminución en los factores de virulencia analizados. Sin embargo, la piocianina, la motilidad, el contenido de AHL relacionado con la virulencia de *P. aeruginosa* deben evaluarse para aclarar el efecto del 6-gingerol.

Se llevó a cabo un análisis de anclaje molecular *in silico* con el propósito de detectar los posibles sitios de unión de carvacrol con las proteínas LasI/LasR, de acuerdo al mecanismo de inhibición de la comunicación intercelular determinado experimentalmente. El modelo de acoplamiento reflejó que el carvacrol presentó una afinidad similar para interactuar con las proteínas LasI y LasR en comparación con su ligando natural C12-AHL (Cuadro 3). Sin embargo, como se observó anteriormente, solo una disminución en la expresión de *lasR* fue causada por el carvacrol y se detectó un efecto inhibitorio directo sobre la actividad de LasI, ya que se encontró una producción menor de C12-AHL.

Cuadro 3. Afinidad de posibles interacciones del carvacrol con proteínas LasI/LasR.

Ligando	Proteína	Energía de afinidad (kcal/mol)	RDMS ^a
Carvacrol	LasI	-5.6	2.6
Carvacrol	LasR	-6.7	2.5
C12-AHL	LasR	-5.7	2.7

^aRDMS: desviación de la raíz media cuadrada.

La Figura 13 mostró las posibles interacciones entre la sintasa LasI con carvacrol, identificando dos cavidades de unión con dimensiones variables, la primera se relaciona con la entrada de la proteína transportadora de acilo y la segunda con la S-adenosil

metionina y el sitio activo. Este sitio activo es una estructura tridimensional con una hendidura en forma de V de lámina β 4 y lámina β 5, rodeada por Leu102, Val143,

Phe105, Ser103, Arg104, Thr142, Val148, Thr144, Trp33, Phe27, Thr145, Arg30 y Met79. Este modelo predictivo presentó afinidad electrostática (puntuación: -5.6, RDSM: 2.6) entre el grupo hidroxilo (OH⁻) del carvacrol al interactuar a través de las fuerzas de Van der Waals con el grupo amino (NH₃⁺) del residuo de aminoácido Arg104 localizado en el sitio activo de LasI.

Por otro lado, la Figura 14 mostró interacciones predictivas entre carvacrol y el sitio de unión de C12-AHL en la proteína receptora LasR. Este sitio tridimensional consiste en una hoja β3, hélice α3, hélice α4 y hélice α5, rodeada por Thr75, Ala127, Asp73, Trp88, Tyr93, Leu36, Val76, Trp60, Thr115, Leu120, Phe101, Tyr56, Tyr64, Ser129. Este modelo presentó afinidad (puntuación: -6.7, RDMS: 2.5) del grupo hidroxilo (OH⁻) del carvacrol y el grupo amino (NH₃⁺) del aminoácido expuesto Asp73 a través de las interacciones de Van der Waals. Este residuo de aminoácido se localizó en el sitio específico de unión de LasR donde la cadena hidrocarbonada de C12-AHL interactúa (puntuación: -5.7 kcal/mol, RDMS: 2.7), este bloqueo detiene la unión que forma el complejo LasR-C12-AHL, que es responsable de iniciar con la regulación de la expresión de genes relacionados con las vías de señalización por proteínas Las asociadas con la virulencia de *P. aeruginosa*.

Estudios anteriores han demostrado que carvacrol presentó afinidad (-6 kcal/mol) para interactuar a través de enlaces de puentes de hidrógeno con el grupo carbonilo (COO⁻) del residuo del aminoácido Phe101 localizado en el sitio activo de la sintasa ExpI y puede interactuar (-6.7 kcal / mol) a través de fuerzas electrostáticas con Phe102 de sitio de unión de la proteína receptora ExpR de *P. carotovorum* (Joshi et al. 2016b). Además, estos resultados están relacionados con un posible mecanismo para inhibir QS y los factores de virulencia como exoenzimas, motilidad, adherencia y formación de biopelículas. Por otra parte, Kim et al. (2015) demostraron en un modelo *in silico* de anclaje molecular entre el 6-gingerol con la proteína receptora LasR, interacciones del terpeno con Tyr93 del sitio de unión de C12-AHL. Estas interacciones fueron similares con el aminoácido Arg104 en LasI y Asp73 en LasR que participan en nuestros modelos de acoplamiento.

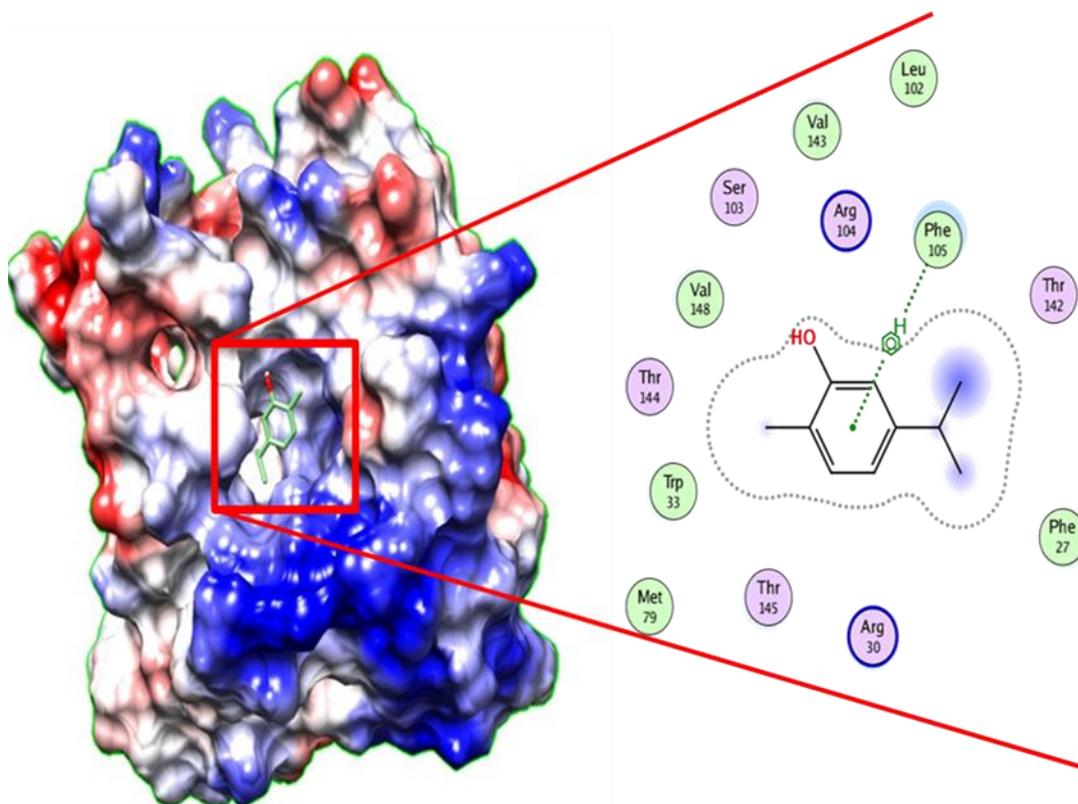


Figura 13. Representación de las interacciones por anclaje molecular *in silico* entre el carvacrol y los residuos de aminoácidos (Arg104, Phe105, Thr142, Phe27, Arg30, Thr145, Met79, Trp33, Thr144, Val148, Ser103, Val143) de la proteína LasI (PDB: 1RO5) de *P. aeruginosa*.

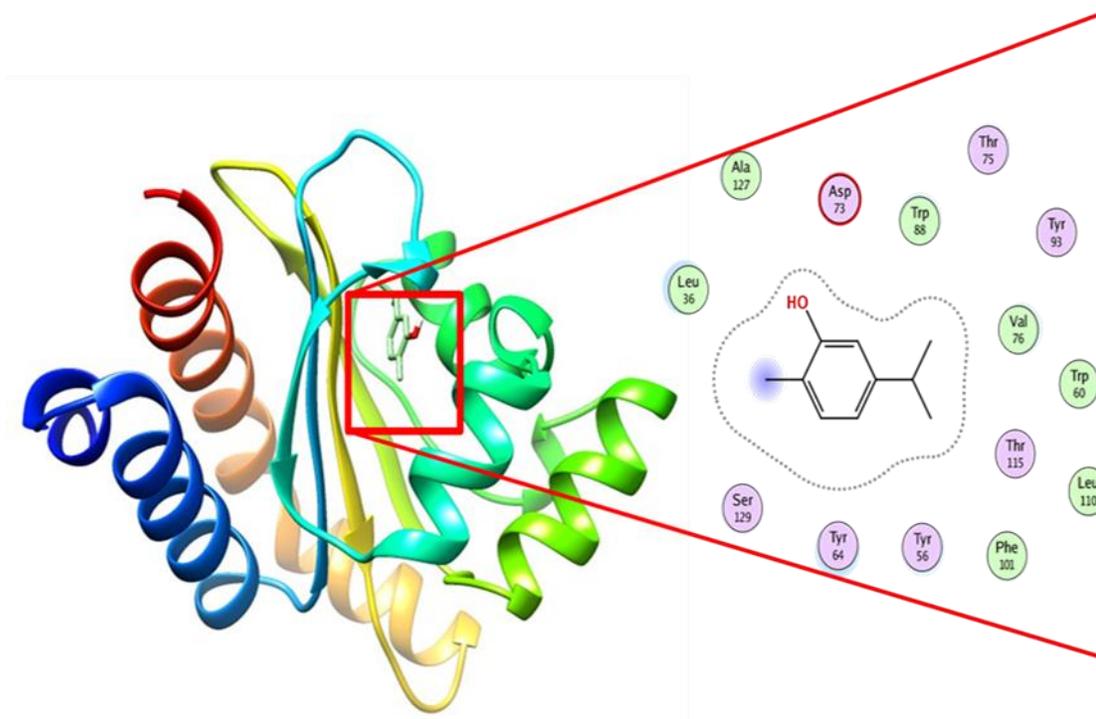


Figura 14. Representación de las interacciones por anclaje molecular *in silico* entre el carvacrol y los residuos de aminoácidos (Asp73, Trp88, Thr75, Tyr93, Val76, Trp60, Thr115, Leu110, Phe101, Tyr56, Tyr64, Ser129, Leu36, Ala127) de la proteína LasR (PDB: 2UV0) de *P. aeruginosa*.

Como se muestra en los estudios anteriores, existe evidencia de que el carvacrol presenta potencial antibacteriano y puede inhibir la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*, sin embargo, no existía evidencia que contemplara el efecto de este terpeno directamente contra el sistema de comunicación intercelular y las moléculas autoinductoras reguladoras de QS. Asimismo, se afectaron los niveles de producción de C12-AHL, reduciendo la expresión relativa del gen *lasR* causando un efecto inhibitorio concomitante sobre C4-AHL y C6-AHL, y los factores de virulencia como producción de piocianina, motilidad y formación de biopelícula regulados por la vía de señalización de las proteínas LasI/LasR y RhII/RhIR.

7. CONCLUSIÓN

El carvacrol es un antibacteriano efectivo contra células de *Pseudomonas aeruginosa* planctónicas y embebidas en biopelículas, además de afectar su adhesión en superficies de acero inoxidable. La capacidad inhibitoria del carvacrol sobre la formación de biopelícula, producción de pirocianina y motilidad se atribuye a la disminución de la actividad de LasI causando una disminución de expresión de *lasR* y contenido de la síntesis de acil-homoserina lactonas del sistema Rhl. Tal conocimiento generado sustenta las bases del modo de acción del carvacrol como agente desinfectante y anti-virulencia de *P. aeruginosa*.

8. RECOMENDACIONES

Para continuar avanzando en el conocimiento de este estado del arte sería interesante evaluar los siguientes parámetros que permitirían ampliar y elucidar los mecanismos anti-QS que ejerce el carvacrol sobre *P. aeruginosa*:

- Profundizar en las interacciones con las proteínas sobre expresadas LasI y LasR mediante ensayos de fluorescencia
- Evaluar cambios sobre otros factores de virulencia como proteasas (LasA) y elastasas (LasB).
- Cambios en la producción de sustancias poliméricas extracelulares durante la formación de biopelículas.

9. REFERENCIAS

- Adonizio A, Kong K-F, Mathee K (2008) Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 52 (1):198-203
- Alvarez MV, Ortega-Ramirez LA, Gutierrez-Pacheco MM, Bernal-Mercado AT, Rodriguez-Garcia I, Gonzalez-Aguilar GA, Ponce A, Moreira MdR, Roura SI, Ayala-Zavala JF (2014) Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in microbiology* 5
- Arráiz N (2001) "QUORUM SENSING" Y VIRULENCIA EN *Pseudomonas aeruginosa* (Revisión). *Kasmera* 29 (1)
- Asfour HZ (2017) Antiquorum sensing natural compounds. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*
- Barreto AC (2013) Quorum Sensing: Sistemas de comunicación bacteriana. *Ciencia Actual* 2 (1):43-50
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology* 43 (2):149-154
- Bhargava K, Conti DS, da Rocha SR, Zhang Y (2015) Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food microbiology* 47:69-73
- Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen H-P, Rygaard J, Moser C, Eberl L (2005) Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151 (12):3873-3880
- Bottomley MJ, Muraglia E, Bazzo R, Carfi A (2007) Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry* 282 (18):13592-13600
- Burt SA, Ojo-Fakunle VT, Woertman J, Veldhuizen EJ (2014) The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One* 9 (4):e93414
- Burt SA, Vlieland R, Haagsman HP, Veldhuizen EJ (2005) Increase in activity of essential oil components carvacrol and thymol against *Escherichia coli* O157: H7 by addition of food stabilizers. *Journal of food protection* 68 (5):919-926
- Cabeen MT (2014) Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a lasR mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9 (2):e88743
- CDC (2015) "Antibiotic Resistance Threats in the United States". Retrieved 7 de Mayo, 2015
- Cotar AI, Chifiriuc MC, Dinu S, Pelinescu D, Banu O, Lazăr V (2010) Quantitative real-time PCR study of the influence of probiotic culture soluble fraction on the expression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing genes. *Romanian archives of Microbiology and Immunology* 69 (4):213-223

- Cruz-Valenzuela M, Tapia-Rodriguez M, Vazquez-Armenta F, Silva-Espinoza B, Ayala-Zavala J (2016) Lime (*Citrus aurantifolia*) oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier, pp 531-537
- Chamdit S, Siripermpool P (2012) Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 39 (2):28-36
- Cheng F, Ma A, Zhuang X, He X, Zhuang G (2016) N-(3-oxo-hexanoyl)-homoserine lactone has a critical contribution to the quorum-sensing-dependent regulation in phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528. *FEMS microbiology letters* 363 (23)
- Davis RM, Muller RY, Haynes KA (2015) Can the natural diversity of quorum-sensing advance synthetic biology? *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3
- De Kievit T (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology* 11 (2):279-288
- de Sousa JP, de Azerêdo GA, de Araújo Torres R, da Silva Vasconcelos MA, da Conceição ML, de Souza EL (2012) Synergies of carvacrol and 1, 8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *International journal of food microbiology* 154 (3):145-151
- Espina L, Berdejo D, Alfonso P, García-Gonzalo D, Pagán R (2017) Potential use of carvacrol and citral to inactivate biofilm cells and eliminate biofouling. *Food Control* 82:256-265
- FDA (2011) Everything added to food in the United States. . <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm115326.htm>.
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8 (9):623-633
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology* 77 (15):5238-5246
- Gould TA, Schweizer HP, Churchill ME (2004) Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone synthase LasI. *Molecular microbiology* 53 (4):1135-1146
- Grabski H, Hunanyan L, Tiratsuyan S, Vardapetyan H (2017) Interaction Of N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone With LasR Protein Of *Pseudomonas aeruginosa*: Insights From Molecular Docking And Dynamics Simulations. *bioRxiv*:121681
- Guizar Ferrel TE (2014) Productos naturales vegetales como inhibidores de moléculas señal del Quorum Sensing y su efecto sobre factores de virulencia de *Salmonella* spp.
- Gutierrez-Pacheco M, Gonzalez-Aguilar G, Martinez-Tellez M, Lizardi-Mendoza J, Madera-Santana T, Bernal-Mercado A, Vazquez-Armenta F, Ayala-Zavala J (2018) Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Food Control*
- Henke JM, Bassler BL (2004) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology* 186 (20):6902-6914

- Heurlier K, Dénervaud V, Haenni M, Guy L, Krishnapillai V, Haas D (2005) Quorum-sensing-negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *Journal of bacteriology* 187 (14):4875-4883
- Hintze J (2009) NCSS, NCSS, LLC. Kaysville, Utah.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents* 35 (4):322-332
- Hui YW, Dykes GA (2012) Modulation of cell surface hydrophobicity and attachment of bacteria to abiotic surfaces and shrimp by Malaysian herb extracts. *Journal of food protection* 75 (8):1507-1511
- Husain FM, Ahmad I, Asif M, Tahseen Q (2013) Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of biosciences* 38 (5):835-844
- Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Khan MS, Alshabib NA (2015) Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology* 6
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1):46-65
- Jones RN Global epidemiology of antimicrobial resistance among community-acquired and nosocomial pathogens: a five-year summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). In: *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 2003. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4662, pp 121-134
- Joshi JR, Burdman S, Lipsky A, Yariv S, Yedidia I (2016a) Plant phenolic acids affect the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* and *P. carotovorum* ssp. *brasiliense* via quorum sensing regulation. *Molecular plant pathology* 17 (4):487-500
- Joshi JR, Khazanov N, Senderowitz H, Burdman S, Lipsky A, Yedidia I (2016b) Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in *pectobacteria* and reduce their virulence by potential binding to *ExpI* and *ExpR* proteins. *Scientific Reports* 6
- Kerekes E, Deák É, Takó M, Tserennadmid R, Petkovits T, Vágvölgyi C, Krisch J (2013) Antibiofilm forming and antiquorum sensing activity of selected essential oils and their main components on foodrelated microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 115 (4):933-942
- Kerr KG, Snelling AM (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *Journal of Hospital Infection* 73 (4):338-344
- Kim H-S, Lee S-H, Byun Y, Park H-D (2015) 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific reports* 5
- Lee JH, Kim YG, Lee J (2017) Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology* 123 (6):1420-1428
- Li X, Chen G, Fekete J, Yang F, Fekete A, Englmann M, Schmitt-Kopplin P (2007) Optimization of gradient elution in UPLC: a core study on the separation of homoserine lactones produced by *Bukholderia ubonensis* and structure

- confirmation with ultra high resolution mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 30 (17):2515-2531
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods* 25 (4):402-408
- Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews* 36 (4):893-916
- Moore-Neibel K, Gerber C, Patel J, Friedman M, Jaroni D, Ravishankar S (2013) Antimicrobial activity of oregano oil against antibiotic-resistant *Salmonella enterica* on organic leafy greens at varying exposure times and storage temperatures. *Food microbiology* 34 (1):123-129
- Murillo J, Sosa L, López G (2009) Patrón de resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* en el hospital general de Culiacán. *Arch Salud Sin* 3 (2):6-11
- Myszka K, Schmidt MT, Majcher M, Juzwa W, Olkowicz M, Czaczyk K (2016) Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 114:252-259
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R (2013) Quorum sensing and phytochemicals. *International journal of molecular sciences* 14 (6):12607-12619
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P (2009) Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods* 1 (3):319-323
- Newman JW, Floyd RV, Fothergill JL (2017) The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS microbiology letters* 364 (15). doi:10.1093/femsle/fnx124
- Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F, Blanco AR (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of medical microbiology* 56 (4):519-523
- Nostro A, Scaffaro R, D'Arrigo M, Botta L, Filocamo A, Marino A, Bisignano G (2012) Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied microbiology and biotechnology* 96 (4):1029-1038
- O'Brien KT, Noto JG, Nichols-O'Neill L, Perez LJ (2014) Potent irreversible inhibitors of LasR quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS medicinal chemistry letters* 6 (2):162-167
- Ortega-Ramirez LA, Rodriguez-Garcia I, Leyva JM, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, Siddiqui MW, Ayala-Zavala JF (2014) Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *Journal of food science* 79 (2)
- Pei Rs, Zhou F, Ji Bp, Xu J (2009) Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. *Journal of food science* 74 (7)
- Pérez Monrás MF, Batlle Almodóvar MdC, Verdera Hernández J, Llop Hernández A (2006) Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 58 (3):0-0

- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25 (13):1605-1612
- Pezzani R, Vitalini S, Iriti M (2017) Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry Reviews* 16 (6):1253-1268
- Phillips CA (2016) Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science & Technology* 51 (8):1731-1743
- Popat R, Cruz SA, Messina M, Williams P, West SA, Diggle SP Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms. In: *Proc. R. Soc. B*, 2012. The Royal Society, pp 4765-4771
- Rosselló GAM, Bouza JME (2013) Quorum sensing en bacterias y levaduras. *Medicina Clínica* 141 (8):353-357
- Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in microbiology* 10 (6):644-648
- Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC (2004) SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8 (1):25-79
- Schieber A (2017) Side streams of plant food processing as a source of valuable compounds: Selected examples. *Annual review of food science and technology* 8:97-112
- Schillaci D, Napoli EM, Cusimano MG, Vitale M, Ruberto G (2013) *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* essential oil prevented biofilm formation and showed antibacterial activity against planktonic and sessile bacterial cells. *Journal of food protection* 76 (10):1747-1752
- Strateva T, Yordanov D (2009) *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology* 58 (9):1133-1148
- Uchida NS, Grespan R, Piovezan M, Ferreira EC, Júnior MM, Cuman RK, Mikcha JMG (2014) Effect of carvacrol on *Salmonella* Saintpaul biofilms on stainless Steel Surface. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13 (12):2021-2025
- Ultee A, Bennik M, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* 68 (4):1561-1568
- Wagner S, Sommer R, Hinsberger S, Lu C, Hartmann RW, Empting M, Titz A (2016) Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of medicinal chemistry* 59 (13):5929-5969
- Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of bacteriology* 185 (7):2080-2095
- Watson WT, Minogue TD, Val DL, von Bodman SB, Churchill ME (2002) Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Molecular cell* 9 (3):685-694
- Williams P (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153 (12):3923-3938

- Williams P, Winzer K, Chan WC, Camara M (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362 (1483):1119-1134
- Zhang W, Li C (2016) Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications. *Frontiers in microbiology* 6:1535
- Zou Y, Nair SK (2009) Molecular basis for the recognition of structurally distinct autoinducer mimics by the *Pseudomonas aeruginosa* LasR quorum-sensing signaling receptor. *Chemistry & biology* 16 (9):961-970