

# Propiedades Antibióticas de las poliaminas

\*Ramón Reynoso Orozco, \*Georgina Ivette López Cortez y \*Alfonso Enrique Islas Rodríguez

---

## Antibiotic properties of the polyamines

\* Departamento de Biología Celular y Molecular-CUCBA, Universidad de Guadalajara, Km 15.5 carretera a Nogales, predio Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, México. Tel. 01(33) 37771150.

autor de correspondencia:  
reynoso220863@yahoo.com.mx

### Resumen

La creciente resistencia a los antibióticos implica la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y preventivas de las infecciones. Las Poliaminas; Diaminoheptano (DHA) que es sintética y las Poliaminas Biogénicas (PB): Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm), muestran un efecto antimicrobiano, aunque como hemos publicado recientemente, también son necesarias para el crecimiento celular en todos los sistemas biológicos, desde virus hasta mamíferos (Tabor y Tabor, 1985; Reynoso 2012). Previamente nuestro grupo reportó que las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para *E. coli*, de las tres PB son: Spd 500 µg/mL, Spm 125 µg/mL, y la Pu no mostró efecto antibiótico en *E. coli* a ninguna dosis (Reynoso, 2012). En el presente trabajo se completa la información del reporte referido sobre la actividad antimicrobiana de la Poliamina sintética DHA y las PB; Pu, Spd, y Spm contra *S. aureus* y *E. coli* y se discute el probable estudio de pruebas de sinergismo con diversos extractos naturales que han mostrado efecto antimicrobiano y las PB que podrían incorporarse a partir de fuentes naturales.

**Palabras Clave:** poliaminas, resistencia a antibióticos, Diaminoheptano, sinergismo.

### Abstract

The growing resistance to antibiotics implies the search for new therapeutic and preventive alternatives to infections. The Polyamines; Diaminoheptane (DHA) which is synthetic and the Biogenic Polyamines (PB): Putrescine (Pu), Spermidine (Spd) and Spermine (Spm), show an antimicrobial effect, although as we have recently published, they are also necessary for cell growth in all biological systems, from viruses to mammals (Tabor and Tabor, 1985; Reynoso 2012). Previously our group reported that the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for *E. coli*, of the three PBs are: Spd 500 µg/mL, Spm 125 µg/mL, and Pu did not show antibiotic affection in *E. coli* at any dose (Reynoso, 2012). In the present work the information of the referred report on the antimicrobial activity of the synthetic Polyamine DHA and the PB is completed; Pu, Spd, and Spm against *S. aureus* and *E. coli* and discusses the probable study of synergy tests with different natural extracts that have shown antimicrobial effect and the PB that could be incorporated from natural sources.

**Keywords:** polyamines, resistance to antibiotics, diaminoheptane, synergism.

## Introducción

La creciente resistencia a los antibióticos implica la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y preventivas de las infecciones. Las Poliaminas; Diaminoheptano (DHA) que es sintética y las Poliaminas Biogénicas (PB): Putrescina (Pu), Espermidina (Spd) y Espermina (Spm), muestran un efecto antimicrobiano, aunque como hemos publicado recientemente, también son necesarias para el crecimiento celular en todos los sistemas biológicos, desde virus hasta mamíferos (Tabor y Tabor, 1985; Reynoso 2012). Como se ha mencionado, las PB son policationes que interactúan con los ácidos nucleicos y se encuentran principalmente como complejos interactuando con el RNA dentro de la célula. Así, se presume que su efecto proliferativo es producto de la inducción de cambios en el RNA (Terui, 2010). Sin embargo, se reportan estudios que muestran un efecto antimicrobiano dependiente de la especie del microorganismo, (Kwun, 2007). La Spm a altas concentraciones (>500 µg/mL) es bactericida en *E. coli*. Además, el efecto se incrementa cuando el pH pasa de 7 a 8, y se propone que es debido a que se altera el transporte transmembranal. Por otro lado, el efecto bactericida parece requerir de la síntesis de proteínas, dado que la adición de cloranfenicol que actúa a nivel de la síntesis de proteínas inhibe la toxicidad de la Spm (Mills y Dubin, 1966). Por otro lado, la mezcla de Spd y Spm tiene mayor efecto bactericida sobre *E. coli*. Otra aportación interesante es la sinergia de la Spd y la Spm con antibióticos producidos por bacterias y hongos. Por su parte La Spm exógena incrementa la susceptibilidad de bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa* y *E. coli*, así como de Gram positivas resistentes a metilina de la especie *Staphylococcus aureus* (MRSA) y a β-lactámicos, lo cual puede ser de aplicación terapéutica. Sin embargo, se desconoce el mecanismo preciso implicado (Tabor y Tabor, 1985; Kwon, 2007; Yao, 2012).

Previamente nuestro grupo reportó que las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) para *E. coli*, de las tres PB son: Spd 500 µg/mL, Spm 125 µg/mL, y la Pu no mostró efecto antibiótico en *E. coli* a ninguna dosis (Reynoso, 2012).

En el presente trabajo se completa la información del reportero referido sobre la actividad antimicrobiana de la Poliamina sintética DHA y las PB; Pu, Spd, y Spm contra *S. aureus* y *E. coli* y se discute el probable estudio de pruebas de sinergismo con diversos extractos naturales que han mostrado efecto antimicrobiano y las PB que podrían incorporarse a partir de fuentes naturales.

## Materiales y Métodos

Las PAs utilizadas se adquirieron (Sigma) en polvo y fueron preparadas a concentración de 1 mg/mL con Solución Salina de Fosfatos (PBS) pH 7.2 estéril. Posteriormente se procedió a la realización del bioensayo microbiológico contra cada bacteria: *S. aureus* y *E. coli*. Primeramente se inoculó la bacteria en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo de soya (CST) (BDBioxon) y se incubó a 37° C por 18 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se homogenizó el tubo de ensayo con el fin de suspender todo el crecimiento bacteriano. Enseguida se calcularon las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) contenidas en la muestra en base al crecimiento bacteriano y las Unidades de Densidad Óptica (UDOs) absorbidas a 620 nm. Una vez estimadas las UFCs, se realizaron las diluciones que manejan 50 colonias.

Por otra parte se diluyó en serie (en múltiplos de dos) la PA a probar hasta la dilución 1:128 utilizando PBS pH 7.2. Posteriormente las bacterias fueron añadidas a cada dilución

de la PA correspondiente. De igual forma fue preparado un control positivo donde únicamente había PBS pH 7.2 y bacterias. Durante las siguientes dos horas se incubó a 37°C.

Tras la incubación se procedió al plating de cada dilución de PA en cajas de Petri con agar Muller Hinton (BDBioxon) y fue incubada nuevamente a 37° C para observar el efecto de la PA sobre la bacteria en cuestión.

## Resultados

Los resultados del triplicado de cada una de las cuatro poliaminas probadas con cada cepa

fueron promediados para ser analizados.

Al probar la poliamina sintética DHA con *S. aureus*, se observó un efecto dosis respuesta en las primeras tres concentraciones (1.00, 0.50, 0.25 mg/mL). Con *E. coli* la Poliamina sintética DHA inhibió completamente hasta la cuarta dilución donde comenzó a notarse un efecto dosis respuesta, aunque nunca se acercó al número de UFC presentes en el control. (Fig. 1)

Cuando se colocó Pu con *S. aureus*, se observó un efecto dosis respuesta en las dos primeras diluciones (1.00, 0.50, mg/mL)

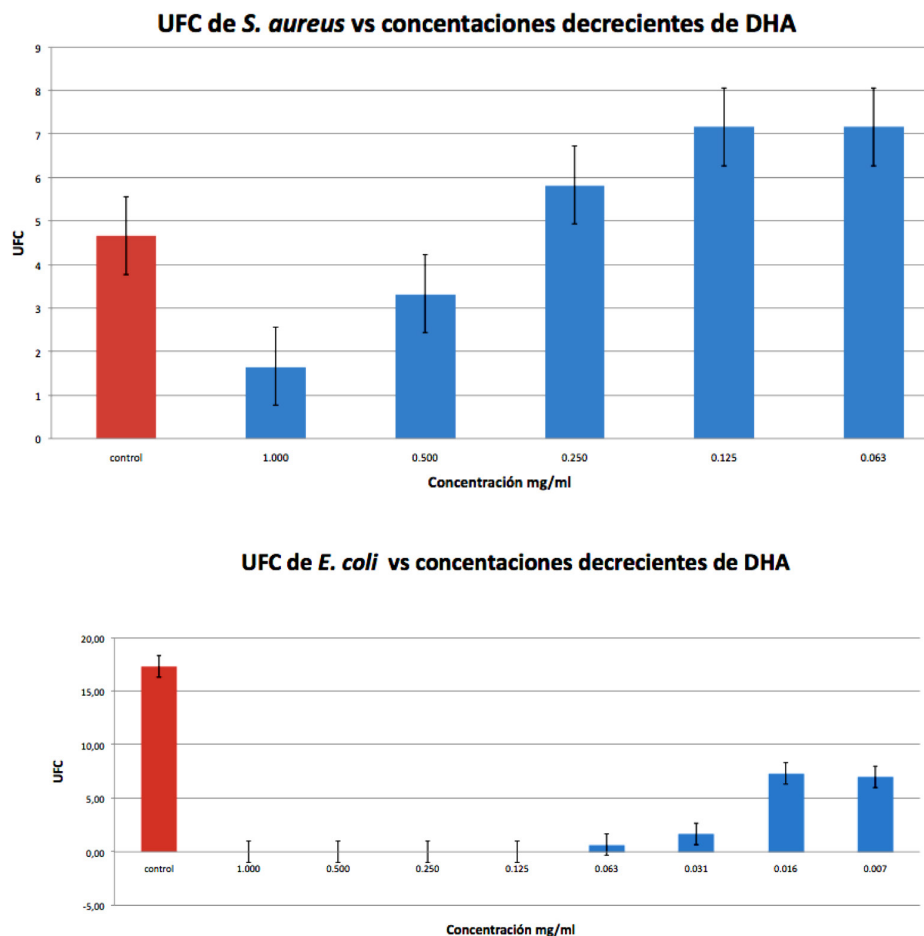


Figura 1.- En la gráfica se puede observar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* (arriba) y de *E. coli*, (abajo)  $\pm$  la desviación estándar, en presencia de concentraciones decrecientes de la poliamina sintética DHA, en ambos casos se puede observar un efecto antimicrobiano dosis respuesta, más evidente en el caso de *E. coli*, en donde la dosis mínima inhibitoria (DMI) fue de 0.125 mg/mL

posteriormente la cantidad de colonias osciló, sin llegar al número del control. De forma similar el comportamiento de la Pu con *E. coli*, presentó un efecto dosis respuesta (Fig. 2).

La siguiente poliamina analizada fue Spd con *S. aureus*, su efecto inhibitorio únicamente se observó en las dos primeras diluciones (1.00, 0.50 mg/mL). En la prueba con la bacteria *E. coli* se apreció un efecto dosis respuesta.

La Spm tuvo una mayor acción inhibitoria a una concentración de 0.5 mg/mL contra *S. aureus*, aunque nunca fue total. A 0.031 mg/mL fue la concentración donde se dejó de

apreciar inhibición. En cuanto a la prueba con *E. coli*, se observó que existió inhibición hasta la quinta dilución (0.063 mg/mL) posteriormente se perdió completamente.

### Discusión

Las PB, Pu, Spd y Spm son moléculas ubicuas, por lo tanto, evolutivamente muy adecuadas para las funciones que realizan en los diversos sistemas biológicos. Aun cuando podría ser que no se conocen cabalmente todas las funciones en que participan en la fisiología celular, aunque

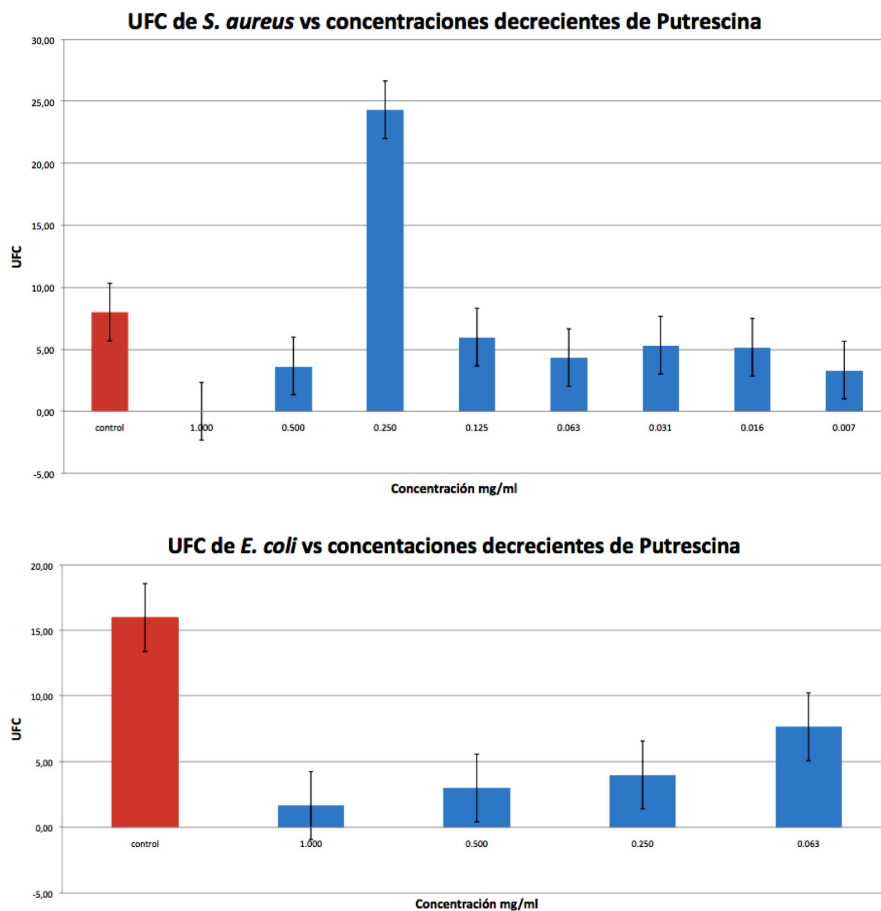


Figura 2.- En la gráfica se puede observar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* (arriba) y de *E. coli*, (abajo) +- la desviación estándar, en presencia de concentraciones decrecientes de la Pu, en el caso de *S. aureus* se puede observar en principio, una inhibición dosis respuesta, más evidente en el caso de *E. coli*.

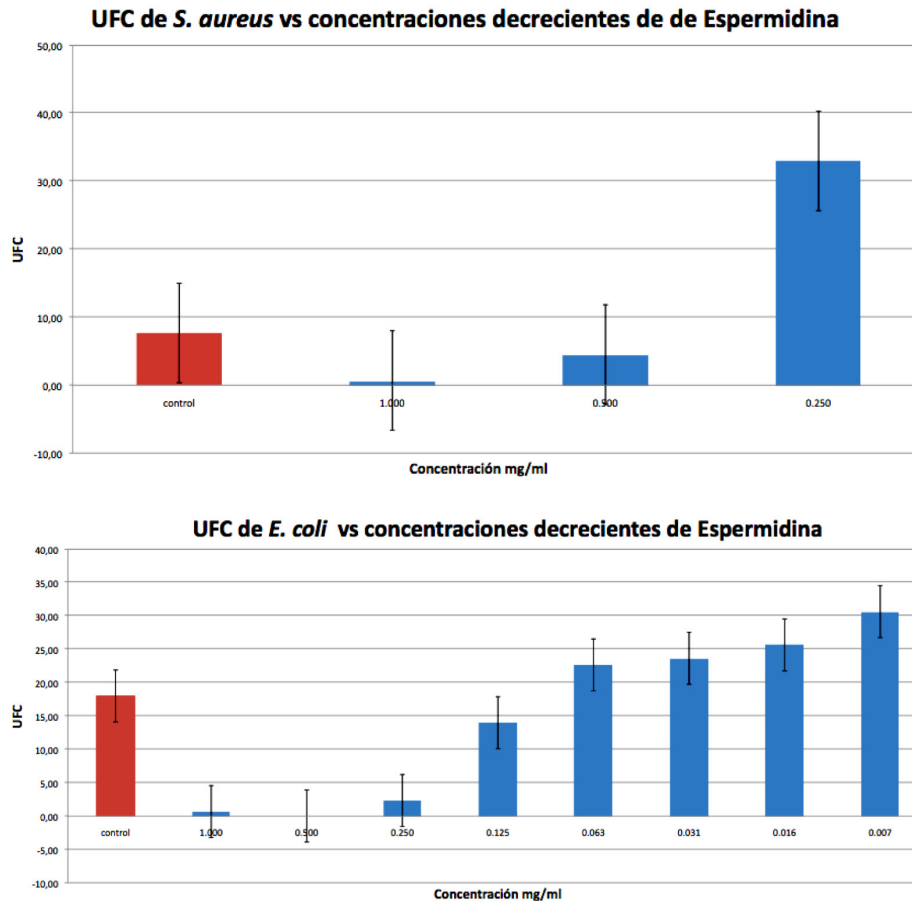


Figura 3.- En la gráfica se puede observar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* (arriba) y de *E. coli*, (abajo) +- la desviación estándar, en presencia de concentraciones decrecientes de la poliamina Spd, en ambos casos se puede observar un efecto antimicrobiano dosis respuesta, más evidente en el caso de *E. coli*.

son bastantes las funciones atribuidas a las PB (Michael, 2016). En bacterias, por ejemplo, no se sabe si funcionan como reguladores específicos que controlan la traducción de un grupo definido de proteínas, además de la velocidad y fidelidad de su síntesis (Yoshida, 2004). De tal manera que se propone la existencia de un “Modulón de PAs” (Igarashi, 2010).

La poliamina sintética DHA es un potente antimicrobiano debido a que inhibió de una manera dosis-respuesta a ambas cepas bacterianas, aunque mayor inhibición en el caso de *E. coli*, ya que la inhibición persistió hasta la cuarta dilución de 0.125 mg/mL (Fig. 1). Es

importante mencionar que no existen trabajos que relacionen función alguna de dicha molécula con su efecto antimicrobiano. Sin embargo, En eucariontes se utiliza como inhibidor del Factor de Iniciación de la Traducción Eucarionte 5A (eIF5A), en arqueas tiene su homólogo en el Factor de Iniciación de síntesis proteica Arqueal o aIF5A y en bacterias el Factor de Elongación P (EF-P) (Cano, 2008), pero no se ha estudiado su probable efecto sobre el homólogo bacteriano. Es importante tomar en cuenta que la Hipusina es el único aminoácido que se encuentra sólo en eIF5A y que además se sintetiza a partir de Spd y Pu (Michael, 2016). Otra posible explicación,

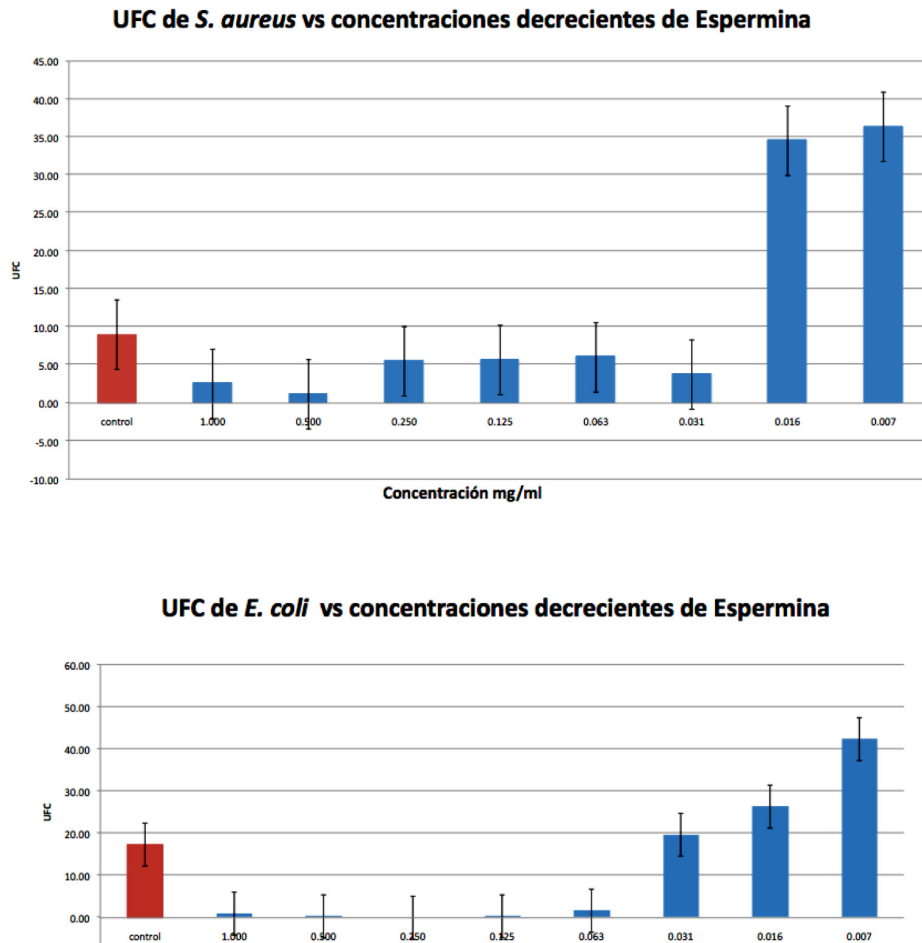


Figura 4.- En la gráfica se puede observar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus* (arriba) y de *E. coli*, (abajo)  $\pm$  la desviación estándar, en presencia de concentraciones decrecientes de la poliamina Spm, en ambos casos se puede observar un efecto antimicrobiano dosis respuesta, más evidente en el caso de *E. coli*.

de su efecto antibacterial, puede ser dada por su carácter corrosivo que menciona su ficha técnica.

La PB PU cuando fue probada con *S. aureus*, el comportamiento observado muestra dependencia de la inhibición por la concentración. A partir de 0.125 mg/mL se mantiene por debajo de las colonias presentes en el control, indicando que en todas las concentraciones de PU inhibe en diferente medida, y aún más se encontró que presenta dos puntos de inhibición. Ésta bi-modalidad puede indicar que existe impedimento estérico que a concentraciones más bajas la PU puede

tener efecto antimicrobiano sobre esta bacteria Gram positiva. Se requiere de más estudios que permitan interpretar cualquier resultado que trate de un efecto antimicrobiano por parte de PU en bacterias, dado que se consideran moléculas que los procariontes sintetizan como mecanismo de defensa y/o de adaptación al medio en que se les encuentre (Ozogul, 2015) En la prueba con *E. coli*, también hubo un comportamiento dosis respuesta, dado que no existen trabajos que analicen el efecto antibacterial *per se* de moléculas que normalmente se encuentran bajo control intracelular, tanto en su biosíntesis como en sus mecanismos de transporte, incluso

determinando su virulencia (Durand, 2003).

La aplicación de Spd y Spm como antibióticos parece estar basada en la inhibición del crecimiento de *S. aureus* por muestras de semen (Gurevitch, 1951). Posteriormente se demostró actividad antimicrobiana pH-dependiente con Spm, contra la misma especie bacteriana. El valor de pH alcalino fortalece el efecto cuando se mide la CIM y los investigadores adjudican los efectos adversos a su propiedad nucleofílica más que a su carga positiva (Yao, 2012). Por otro lado, recuperar la susceptibilidad de las bacterias Gram positiva y Gram negativa al efecto de los antibióticos, mismos que ya habían mostrado desarrollar resistencia, para ser una aplicación prometedora en el uso de la PB, en el tema aquí tratado. Los trabajos realizados por el grupo de Kwon (2006 y 2007), así lo muestran. El estudio profundo sobre el mecanismo de acción, mediante mutantes que permiten estudiar bombas de expulsión a nivel membranal, hace pensar que el mecanismo de acción de Spm no es afectando dicho mecanismo de transporte (Kwon, 2007). Los autores proponen la realización de más estudios que puedan dilucidar la participación de las PB exógenas en la recuperación de la susceptibilidad a antibióticos, por parte de los patógenos. Tal parece que no será fácil, pues Spm forma parte de las estructuras que permiten el andamiaje de moléculas de glicanos, así como de péptidos en la formación de la pared celular (Yao, 2011). Además, parece que Spd tiene una participación importante en la elaboración de la biopelícula o "biofilm" en especies con etapas planctónicas como *Bacillus subtilis*, complicando más su precisa participación, dado que existe una síntesis diferencial con otra molécula relacionada llamada nor-espermidina, misma que previene la formación de dicha biopelícula para que los individuos se desprendan de la colonia que formó dicha estructura (Kolodkin-Gal, 2012). Finalmente,

consideramos que falta mucho por investigar y descubrir en los procariontes y su relación con las PB.

La PB Spd es pobre inhibidora de *S. aureus* ya que deja de inhibir desde la tercera dilución (0.25 mg/mL) de hecho, sobrepasa el crecimiento del control. Es posible que a altas concentraciones (1.0 y 0.5 mg/mL) inhiba el crecimiento de bacterias Gram positivas mientras que a menores concentraciones, la bacteria utiliza la Spd para su propio metabolismo; acelerando su tasa de crecimiento. Es importante mencionar que las bacterias en general tienen un repertorio de PB muy variado, para el caso de triaminas Spd es la más abundante entre sus homólogas Homoespermidina y Norespermidina, dependiendo del filum que se hable (Hamana, 1992), Quizás sea ésta la explicación por que no se afecte la fisiología de la bacteria con Spd exógena. Sin embargo, el comportamiento presentado en *E. coli*, es dependiente a la concentración, aunque a dosis relativamente alta para su efecto antibacterial, ya que fue dosis respuesta hasta 0.250 mg/mL.

En cuanto a Spm presentó un comportamiento similar al de la poliamina sintética DHA con *S. aureus*, a pesar de presentar cierto grado de inhibición, no existe un efecto dosis respuesta. Por ello no se puede establecer una completa dependencia de la inhibición a la concentración de la Spm. Debemos mencionar que esta PB no se ha detectado en los dos modelos usados aquí (Pegg y Michael, 2010). En *E. coli*, la inhibición es constante incluso a bajas concentraciones, siendo 0.063 mg/mL la CMI, después se pierde completamente la AAM, lo que lleva a pensar que probablemente el efecto dosis respuesta se puede apreciar en concentraciones intermedias a 0.063 y 0.031 mg/mL. Spm es considerada un agente con potente efecto antibacterial (Yao, 2014), por lo que es interesante realizar estudios

sobre los mecanismos que ataca y discernir los correspondientes para DAH.

Otra área de la terapéutica que requiere mucha atención es aplicar el sinergismo que se logra combinando extractos naturales que han mostrado actividad antimicrobiana, además de PB exógenas. En el caso de los péptidos antimicrobianos se ha teorizado sobre la participación de las PB que sellan los pequeños espacios que dejan estas cadenas cortas de aminoácidos básicos, que se pegan a los poros en las membranas de bacterias, impidiendo el flujo de sustancias importantes para mantener la homeostasis de los microorganismos (buscar referencia). En nuestro grupo estamos probando con el medio donde se cultivan hongos que presentan un excelente efecto antimicrobiano, tanto en cepas multiresistentes a antibióticos,

como a cepas ATCC. Al combinar dichos medios con Spd y Spm se disminuye considerablemente la MIC de dichas sustancias naturales (escrito en elaboración). Sin duda, establecer dietas ricas en PB aplicadas a modelos *in vivo*, en los tratamientos con productos naturales podría mejorar las posibilidades de disminución de resistencia bacteriana y al mismo tiempo fortalecer al sistema inmunológico (Weng, 2010), como lo ha demostrado *Ganoderma lucidum*.

## Conclusiones

Existe un efecto inhibitorio de todas las PB utilizadas en ambas cepas de bacterias. En general, la inhibición sobre *E. coli* es mayor que la que se muestra en *S. aureus*.

## Literatura citada

- Cano, V.S.P., G.A. Jeon, H.E. Johansson, C.A. Henderson, J.H. Park, S.R. Valentini, J.W.B. Hershey y M.H. Park. 2007. Mutational Analyses of Human eIF5A-1: Identification of Amino Acid Residues Critical for Hypusine Modification and eIF5A Activity. *FEBS J.* 2008; 275(1): 44–58. doi:10.1111/j.1742-465.
- Durand, J.M. y Bjork, G.R. 2003. Putrescine or a combination of methionine and arginine restores virulence gene expression in a tRNA modification-deficient mutant of *Shigella flexneri*: a possible role in adaptation of virulence. *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 519–527.
- Gurevitch J., Rozansky R., Weber D., Brzezinsky A. y B. Eckerling B. 1951. The Role of Spermine in the Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Human Semen. *J. clin. Path.* 4:360-365. 1951.
- Hamana, K. y Matsuzaki, S. 1992. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 261–283.
- Igarashi K. y Kashiwagi K. 2010. Modulation of cellular function by polyamines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:39–51
- Kolodkin-Gal I., Cao S., Chai L., Böttcher T., Kolter R., Clardy J. y Losick R. 2012. A Self-Produced Trigger for Biofilm Disassembly that Targets Exopolysaccharide. *Cell* 149, 684–692. 2012.
- Kwon D-H. y Lu Ch-D. 2007. Polyamine Effects on Antibiotic Susceptibility in Bacteria. *Antim Agents and Chemoth.* Vol. 51, (6):2070–2077.
- Michael, A.J. 2016. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. *J Biol Chem.* Vol. 291, (29): 14896–14903.
- Mills, J., y Dubin, DT. 1966. Some effects of spermine on *Escherichia coli*. *Mol. Pharmacol.* 2:311-318.
- Ozogul F., Tabanelli G., Toy N. y Gardini F. 2015. Impact of Cell-free Supernatant of Lactic Acid Bacteria on Putrescine and Other Polyamine Formation by Foodborne Pathogens in Ornithine Decarboxylase Broth. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5828–5835.
- Pegg, A.E. y Michael, A.J. 2010. Spermine synthase. *Cell Mol Life Sci.* 67(1): 113. doi:10.1007/s00018-009-0165-5.
- Reynoso-Orozco R., López Cortez GI. e Islas Rodríguez AE. 2012. Propiedades antinómicas de las poliaminas en los dominios Archaea y Eubacteria y su microambiente. *Scientia-CUCBA* 14(1):41—46. 2012.
- Tabor C.W. y Tabor H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 1985, 49(1):81-99.
- Terui Y., Tabei Y., Akiyama M., Higashi K., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Igarashi K. y Kashiwagi K. 2010. Ribosome Modulation



- Factor, an Important Protein for Cell Viability Encoded by the Polyamine Modulon. *J Biol Chem*. Vol. 285, (37): 28698–28707.
- Weng Ch-J. y Yen G-Ch. 2010. The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metástasis. *Clin Exp Metastasis*. 27:361–369. 2010.
- Yao, X. y Lu, CD. Characterization of *Staphylococcus aureus* Responses to Spermine Stress. *Curr Microbiol* (2014) 69: 394. doi:10.1007/s00284-014-0603-y
- Yao X., Li C, Zhang J. y Lua CH-D. 2012.  $\gamma$ -Glutamyl Spermine Synthetase PauA2 as a Potential Target of Antibiotic Development against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012. 56(10): 5309–5314.
- Yao X. y Lu Ch-D. 2012. A PBP 2 Mutant Devoid of the Transpeptidase Domain Abolishes Spermine- $\beta$ -Lactam Synergy in *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimic Agents Chemoth*. 56(1): 83–91. 2012.
- Yoshida M., Kashiwagi K., Shigemasa A., Taniguchi S., Yamamoto K., Makinoshima H., Ishihama A. e Igarashi K. A Unifying Model for the Role of Polyamines in Bacterial Cell Growth, the Polyamine Modulon. *J Biol Chem* Vol. 279, (44): 46008–46013. 2004.