



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**NUEVAS ESTRATEGIAS
ANTIMICROBIANAS: ANTAGONISTAS DEL
*QUORUM SENSING***

Autor: Carlos Ribas Villaverde

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: Junio 2017

RESUMEN

Las bacterias han sido consideradas tradicionalmente como pequeños *animálculos*, como los describió Antonie van Leeuwenhoek en 1684, carentes de una dimensión social. Se creía que sus actividades, completamente individuales salvo en raras excepciones, se reducían a captar alimento, crecer, adaptarse a las condiciones del medio y reproducirse. Sin embargo, los últimos descubrimientos han cambiado radicalmente esta visión del mundo microbiano. Sabemos ahora que las bacterias han desarrollado sofisticados sistemas de señales, que les permite comunicarse entre sí.

A este nuevo y fascinante mecanismo de comunicación intercelular se le ha denominado “detección de quórum” (*quorum sensing*). Las bacterias utilizan señales químicas extracelulares para coordinarse en acciones como la producción de antibióticos, la transferencia de plásmidos, la síntesis de polisacáridos y exoenzimas relacionados con la virulencia en patógenos, la formación y maduración de biofilmes o la esporulación.

Debido a la importancia de las señales de quórum en numerosos procesos patógenos, otras bacterias y algunos eucariotas han desarrollado sistemas para inactivar estas señales, en un proceso denominado “interceptación de quórum” (*quorum quenching*), consiguiendo así bloquear al enemigo al evitar que reciba las señales para iniciar el ataque. Esta nueva estrategia de lucha antimicrobiana abre una nueva era en la búsqueda de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

En este Trabajo de Fin de Grado se describen los lenguajes de quórum utilizados por las bacterias, los mecanismos desarrollados para emitir y percibir sus señales y las estrategias que utilizan otros organismos para inactivar estas redes de comunicación.

Palabras clave: *quorum sensing*, *quorum quenching*, antagonistas, antimicrobianos.

1. Introducción y antecedentes. Objetivos

Una gran parte de las enfermedades infecciosas están vinculadas a las comunidades bacterianas que proliferan formando biofilmes ⁽¹⁾.

El descubrimiento de la existencia de mecanismos generalizados de comunicación intercelular, que permiten a las bacterias actuar de forma coordinada, es probablemente el hecho que más ha cambiado nuestro concepto del mundo microbiano desde que Carl Woese, en 1977, estableciese la diferenciación entre el dominio *Archaea* y el dominio *Bacteria*.

El proceso de comunicación intercelular que se produce con elevadas concentraciones celulares con el objetivo de iniciar acciones cooperativas ha sido denominado *quorum sensing* (QS). Ello implica la producción y liberación al medio de pequeñas moléculas señalizadoras, también denominadas autoinductores, por parte de las células bacterianas.

El hecho de que una bacteria tenga la capacidad de comunicarse con bacterias vecinas para coordinar una respuesta uniforme favorable para su supervivencia, asegura su éxito en la colonización de hábitats, ya que para muchas bacterias patógenas el resultado de la interacción entre el hospedador y el organismo patógeno está fuertemente influenciado por el tamaño de la población bacteriana ⁽²⁾.

Los procesos activados por los sistemas de QS son de tres tipos:

- Procesos de acción en masa en los que la acción de una sola bacteria sería inútil, desde la bioluminiscencia hasta la iniciación de procesos de virulencia.
- Preparación para la competición por nutrientes, en los que las bacterias inducirían respuestas características de la fase estacionaria, funciones de diseminación y dispersión o producción de antibióticos.
- Procesos de desarrollo, como la producción de biofilmes.

Este proceso fue observado por primera vez en *Vibrio fischeri*, un bacilo Gram negativo simbiote de algunas especies animales marinas. En este caso el hospedador proporciona los nutrientes a la bacteria y ésta, a su vez, genera luz que sirve al pez para atraer a las presas o alejar a los depredadores ⁽²⁾.

Los principales tipos de señales de quórum en las bacterias son:

- Las bacterias Gram negativas usan moléculas de la familia de las acil-homoserín lactonas (AHLs), que difieren en la cadena lateral.
- Las bacterias Gram positivas utilizan aminoácidos y péptidos cortos, que en algunos casos presentan modificaciones.
- El diésterfuranosil borato o AI-2 es utilizado tanto por Gram positivas como por Gram negativas.

Así, existen tres mecanismos moleculares de QS: el sistema LuxI/LuxR en bacterias Gram negativas, el sistema de péptidos en bacterias Gram positivas y el sistema híbrido ⁽²⁾.

Por otra parte, es importante destacar que el esfuerzo para interrumpir los biofilmes ha permitido identificar las moléculas producidas por procariotas y eucariotas con habilidades para apagar el sistema QS, denominado como *quorum quenching* (QQ). El QQ se puede definir como el conjunto de estrategias de inactivación de la señal de quórum desarrolladas por otras bacterias y algunos eucariotas.

Los inhibidores del *quorum sensing* pueden interferir competitivamente en el sistema de señalización QS, proporcionando una nueva estrategia para desarrollar nuevos fármacos.

Los **objetivos** que se persiguen en este trabajo de Fin de Grado son:

- Analizar el *quorum sensing* (QS) como proceso de comunicación intercelular en bacterias.
- Analizar las estrategias antimicrobianas para inactivación del QS este proceso, concretamente estudiar los distintos antagonistas del *quorum sensing* (QQ). Para ello, este estudio se centra principalmente en dos bacterias:
 - *Pseudomonas aeruginosa*, como ejemplo de bacterias Gram negativas.
 - *Staphylococcus aureus*, como ejemplo de bacterias Gram positivas.

Este estudio integra diversas aproximaciones: bioquímica, fisiológica, biológica, farmacológica y especialmente microbiológica.

2. Metodología

Se trata de una Revisión Bibliográfica. En su desarrollo se ha analizado información de revistas de divulgación científica, artículos científicos, consultados a partir de distintas fuentes.

- PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)
- Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>)
- Web of Science (<https://login.webofknowledge.com>)
- Bucea (<http://biblioteca.ucm.es>)
- Google Scholar (<https://scholar.google.co.in/schhp?hl=en>)
- Elsevier (www.elsevier.com)
- Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>)

("antagonists and inhibitors"[Subheading] OR ("antagonists"[All Fields] AND "inhibitors"[All Fields]) OR "antagonists and inhibitors"[All Fields] OR "antagonists"[All Fields]) AND ("quorum sensing"[MeSH Terms] OR ("quorum"[All Fields] AND "sensing"[All Fields]) OR "quorum sensing"[All Fields])

Además se han consultado libros de texto de Microbiología, así como distintos artículos científicos, los cuales aparecen recogidos en la bibliografía del trabajo.

3. Resultados y discusión

3.1. Generalidades de los sistemas de *quorum sensing* y *quorum quenching*

El hecho de que una bacteria tenga la capacidad de comunicarse con sus bacterias vecinas para coordinar una respuesta uniforme favorable para su supervivencia, asegura su éxito en la colonización de hábitats, ya que para muchas bacterias patógenas el resultado de la interacción entre el hospedador y el patógeno depende de la dosis infectiva y de la multiplicación bacteriana. A este fenómeno de comunicación se le denomina *quorum sensing* (QS) o “**percepción de quórum**”; y las moléculas que intervienen se denominan autoinductores. A su vez, los mecanismos de interferencia o inhibición del QS se conocen como *quorum quenching* (QQ). Los antagonistas del QS pueden ser de origen natural o sintético.

3.1.1. *Quorum sensing*: autoinductores, funciones y clasificación

Desde el año 1994 hasta la actualidad, se han descrito gran cantidad de procesos bacterianos regulados por *quorum sensing* ⁽³⁾, tales como:

- Bioluminiscencia.
- Movilidad.
- Maduración de biofilmes.
- Inducción del proceso de esporulación.
- Producción de pigmentos.
- Producción de algunos metabolitos secundarios.
- Producción de exopolisacáridos.
- Producción de factores de patogenicidad o virulencia.
- Transferencia de plásmidos conjugativos.
- Inducción de competencia en bacterias.

En la actualidad se puede establecer una clasificación de los distintos sistemas bacterianos controlados por *quorum sensing*. Esta clasificación tiene en cuenta la composición química, el número de moléculas que intervienen y las interacciones entre los distintos autoinductores ⁽⁴⁾.

Así pues, esta clasificación permite diferenciar entre **sistemas sencillos**, regulados por una única molécula autoinductora y **sistemas complejos** en los que participan más de un

autoinductor, con composición química heterogénea. De la misma forma, los autoinductores de los sistemas complejos pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos en la ruta que regulan ⁽⁴⁾ (figura 1).

- Sistemas de *quorum sensing* con un autoinductor:
 - Bacterias Gram positivas. Ejemplo: *Staphylococcus aureus*.
 - Bacterias Gram negativas. Ejemplo: *Vibrio fischeri*.
- Sistemas de *quorum sensing* con dos o más autoinductores:
 - Sistemas cooperativos:
 - ✓ Circuitos en paralelo: sistema de QS de *Vibrio harveyi*.
 - ✓ Circuitos en serie: sistema de QS de *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Sistemas competitivos:
 - ✓ Sistema de QS en *Bacillus subtilis*.

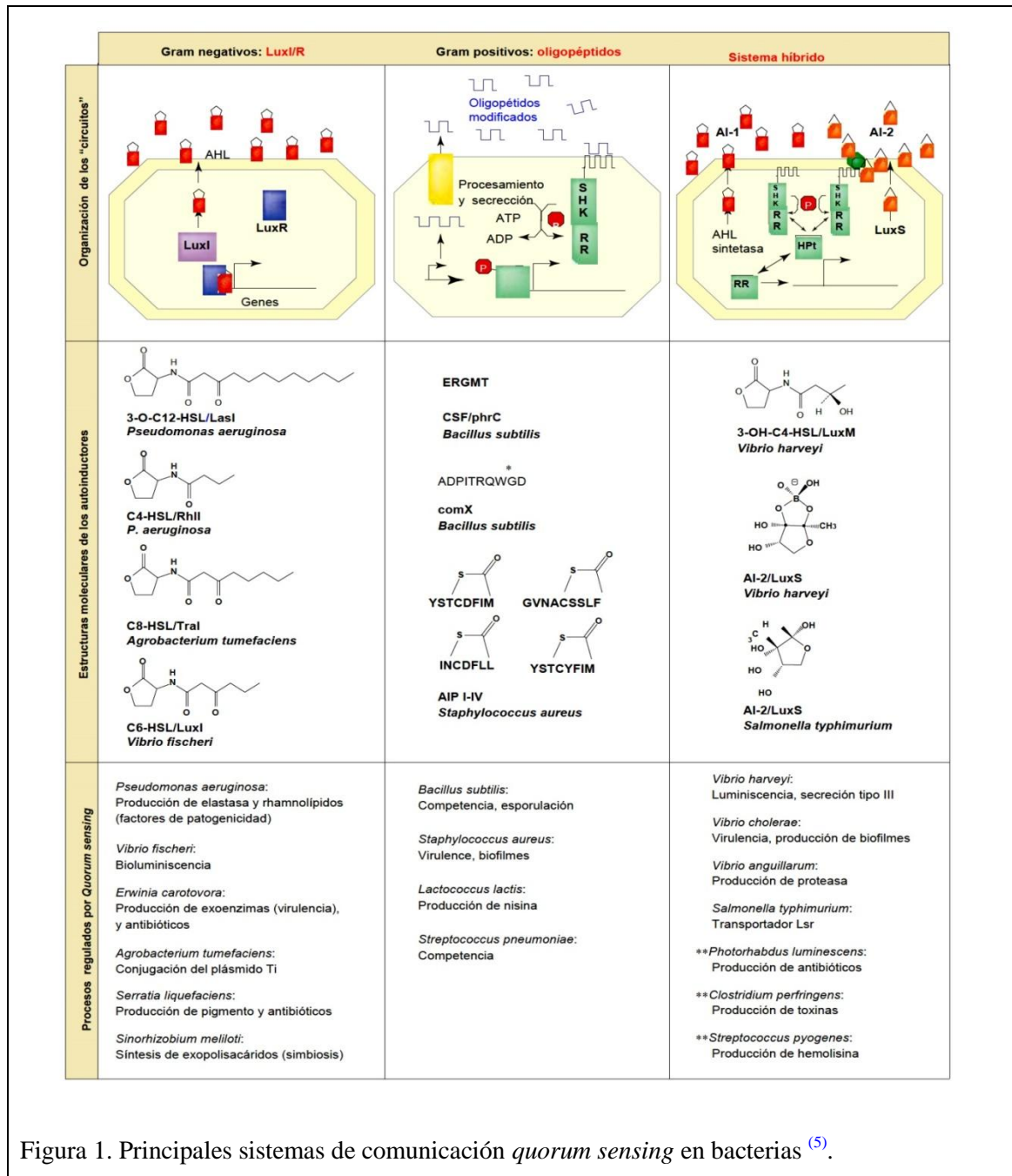


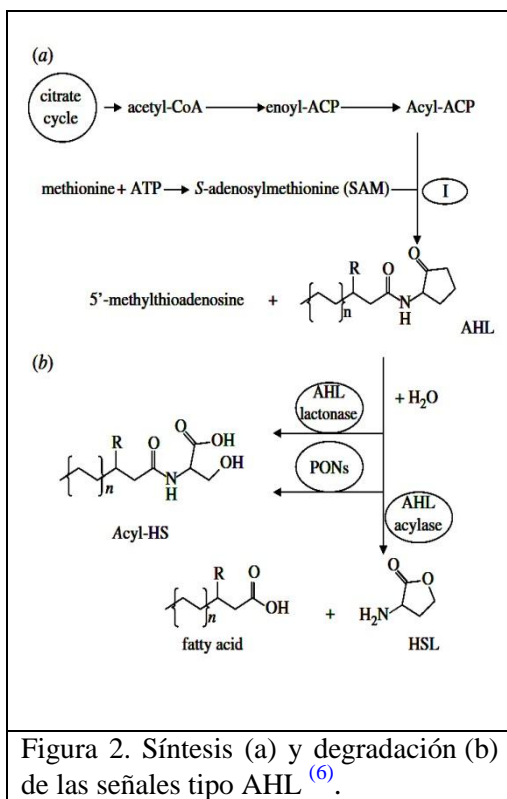
Figura 1. Principales sistemas de comunicación *quorum sensing* en bacterias ⁽⁵⁾.

3.1.2. Quorum quenching: inhibidores, mecanismos y funciones

Los sistemas de inhibición del *quorum sensing* o inhibidores *quorum quenching* (QQ) bloquean el QS en distintas etapas: síntesis del autoinductor, su acumulación y la percepción de la señal (figura 2). Estos inhibidores QQ pueden ser activos en infecciones microbianas (figura 3).

- *Inhibidores no enzimáticos o furanonas*: son compuestos químicos que mimetizan las señales de QS. Se trata de análogos estructurales de las acil-homoserín lactonas, de tal manera que van a impedir la unión de la molécula señal al receptor.

- **Inhibidores enzimáticos:** son pequeñas moléculas que van a actuar como inhibidores enzimáticos. El triclosán inhibe la enoil-ACPO reductasa, cuyo producto es fundamental en la biosíntesis de las acil-homoserín lactonas.
- **Mecanismos basados en paraoxonasas:** las enzimas PON1, PON2 y PON3 con actividad lactonasa/esterasa, catalizan la hidrólisis del anillo de homoserín lactona.
- **Mecanismos basados en acilhomoserín lactonasas:** las metalohidrolasas van a hidrolizar el anillo lactona de las acil-homoserín lactonas. Sólo interfiere en los sistemas de QS de Gram negativas.
- **Mecanismos basados en acilhomoserín lactona-acilasas:** enzimas que rompen el enlace amida de las acil-homoserín lactonas.



quorum-quenching molecules	host	effect		
AHL-lactonase	<i>aiiA</i>	<i>Erwinia carotovora</i>	decreases extracellular pectolytic enzyme activities, and attenuates soft rot symptom on the plants inoculated	
		tobacco, potato	transgenic plants are resistant to <i>E. carotovora</i> infection	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	decreases production of elastase, rhamnolipids, hydrogen cyanide and pyocyanin, and inhibits bacterial swarming	
		<i>Escherichia coli</i>	attenuates the pathogenicity of <i>E. carotovora</i> when co-inoculated	
		<i>Bacillus thuringiensis</i>	the efficiency of biocontrol against <i>E. carotovora</i> infection is dependent on AHL-lactonase	
		<i>Burkholderia thailandensis</i>	reduces the bacterial swarming and twitching motility, prevents the β -haemolysis of sheep erythrocytes	
		<i>Erwinia amylovora</i>	impairs extracellular polysaccharide production and tolerance to hydrogen peroxide, and reduces the fire blight symptom on apple leaves	
		<i>atiM, aiiB</i>	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>Atroseptica</i>	decreases maceration in potato tubers
paraoxonase	<i>PON1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	the serum containing PON1 prevents bacterial biofilm formation <i>in vitro</i>	
AHL-acylase	<i>aiiD</i>	<i>P. aeruginosa</i>	decreases swarming ability, elastase and pyocyanin production, and attenuates nematode paralytation	
synthetic AIP-II		mouse	treated mice show resistance to <i>S. aureus</i> infection	
3-oxo-C12-(2-aminocyclohexanone) furanone		<i>P. aeruginosa</i>	reduces the production of virulence factors and biofilm formation	
		mouse	attenuates the virulence of <i>P. aeruginosa</i> in mouse models	
DSF		<i>Candida albicans</i>	inhibits the fungal dimorphic transition that is associated with virulence	

Figura 3. Ejemplos de inhibidores *quorum quenching* activos en infecciones microbianas ⁽⁶⁾.

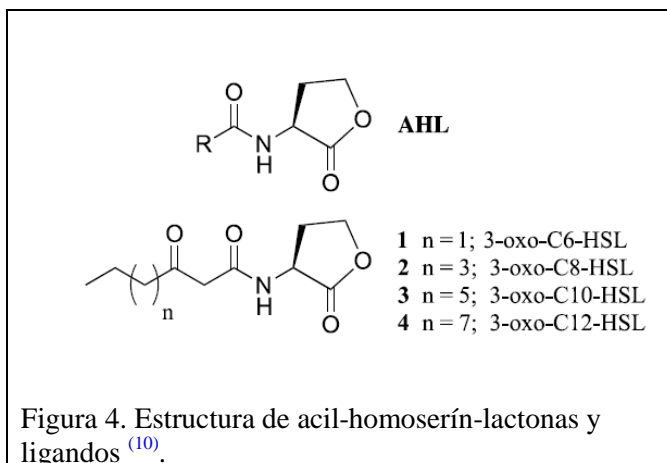
3.2. Detección de quórum en bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*

Las bacterias Gram-negativas, como ya se ha dicho, utilizan un tipo de señales características para la detección del *quorum sensing*. Un ejemplo claro de este tipo de bacterias y que adquiere gran importancia por las infecciones produce, es *Pseudomonas aeruginosa*, uno de los patógenos oportunistas más importantes desde el punto de vista clínico y uno de los organismos en los que el fenómeno del *quorum sensing* más se ha estudiado.

En diversos modelos de infección, se ha demostrado en el laboratorio que la interrupción del QS reduce la patogenicidad de *P. aeruginosa* ⁽⁷⁾.

Los sistemas QS de *P. aeruginosa* son complejos e incluyen dos circuitos completos dependientes de AHL (acil-homoserín-lactona), circuitos RhlI/RhlR y Las I/R ⁽⁸⁾. AHL (figura 4) es fundamental en el control de la expresión de muchos factores de patogenicidad por los que constituye una de las dianas de investigación más importantes en el desarrollo de inhibidores específicos y nuevas terapias para el control de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* ⁽⁹⁾.

Entre las numerosas patologías que produce, cabe destacar que este microorganismo constituye la principal causa de queratitis microbiana y de infecciones en pacientes con fibrosis quística. Se ha demostrado que la señalización célula a célula dependiente de AHL es importante en el desarrollo de



ambos tipos de patologías ⁽⁹⁾. La queratitis es una infección aguda, mientras que la infección en los pacientes con fibrosis quística se convierte en una enfermedad crónica. Ambos casos son complejos y aún no se ha esclarecido cómo AHL regula la patogenicidad en ambas infecciones ⁽⁹⁾.

3.2.1. Mecanismos moleculares de *quorum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*

El sistema de QS de *P. aeruginosa* se ha convertido en uno de los mejor estudiados debido a su complejidad y a la multiplicidad de procesos controlados por este sistema. Este patógeno utiliza, al menos, dos pares de complejos homólogos de LuxI/LuxR, denominados LasI/LasR y RhlI/RhlR que funcionan en tándem controlando numerosos genes ⁽¹¹⁾.

La señalización QS requiere dos proteínas: una N-acil-homoserinalactona (acil-HSL) sintasa (proteína I) y un factor de transcripción con actividad dependiente de acil-HSL denominada proteína R. El complejo proteína R-acil-HSL activa la transcripción de los genes que codifican las proteínas R e I, creando un mecanismo regulador de realimentación positiva. Así, el compuesto acil-HSL es un autoinductor (AI). En bacterias QS patógenas como *P. aeruginosa*, las proteínas R activadas también inducen la transcripción de genes que codifican factores de patogenicidad ⁽⁷⁾.

P. aeruginosa es uno de los pocos organismos que poseen dos conjuntos de proteínas QS, y por lo tanto dos autoinductores: N-(3-oxo-dodecanoil)-HSL (3-oxo-C₁₂-HSL) y N-butanoil-HSL (C₄-HSL) ⁽⁷⁾.

La proteína Las-I cataliza la producción de 3-oxo-C₁₂-HSL (AI1). AI1 se acopla al regulador de la transcripción LasR, lo que hace que LasR se una a los promotores de los genes reguladores de QS que controlan la expresión de los genes de patogenicidad, tales como LasB (elastasa), LasA (estafilolisina), AprA (alcalina proteasa), ToxA (exotoxina A), HcnABC (cianuro de hidrógeno sintasa) y LasI. El **sistema LasI/LasR** induce una retroalimentación positiva para producir más AHL, además de inducir un circuito QS secundario: el llamado sistema Rhl ⁽⁹⁾.

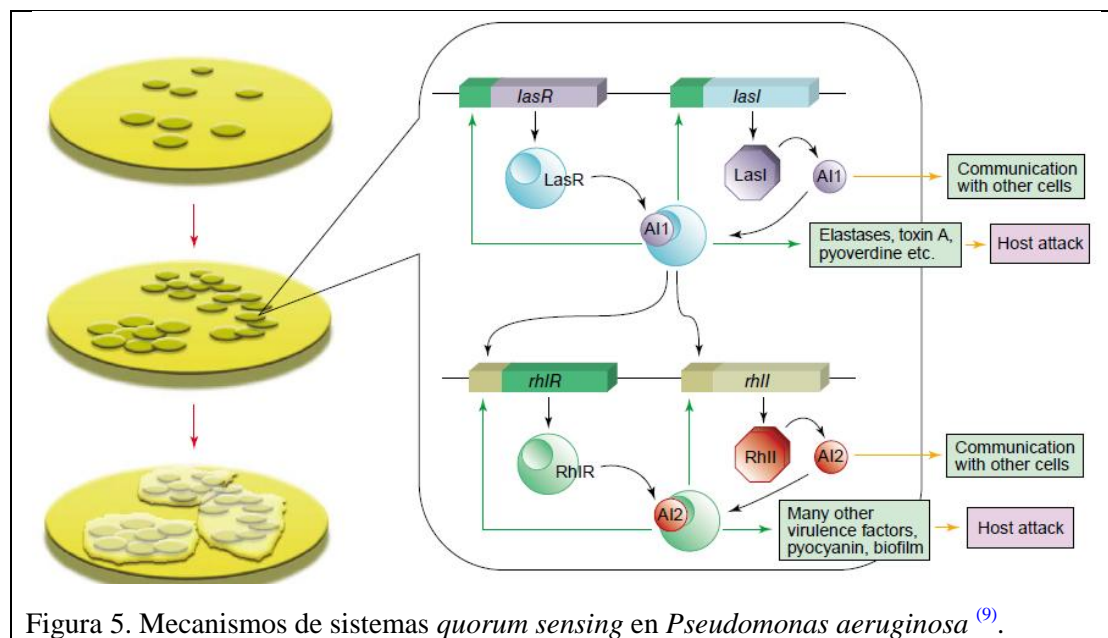


Figura 5. Mecanismos de sistemas *quorum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁹⁾.

El **sistema Rhl** consiste en RhlI, que sintetiza C₄-HSL (AI2) y el receptor, RhIR. Como con el sistema Las, AI2 se acumula hasta una concentración suficiente y se une a RhIR. El sistema Rhl induce la expresión de rhlAB (genes de síntesis de rhamnolípidos), rhlI, lasB, rpoS (el factor de sigma de fase estacionaria), lecA (lectina de tipo I), lecB (Lectina de tipo II), hcnABC y genes implicados en la producción de pirocianina ⁽⁹⁾.

Se ha descrito un **tercer sistema** en el que no media una HSL, sino una quinolona, denominada **PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona)**. La síntesis de PQS se produce durante la fase exponencial y es dependiente de LasR. La adición externa de PQS induce la expresión de lasB, el gen que codifica la elastasa, controlado por LasR, y de rhlI, por lo que PQS actúa como señal intermedia entre el sistema Las y Rhl ⁽¹¹⁾.

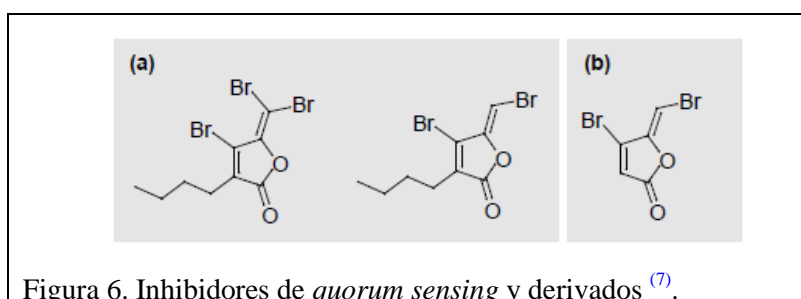
3.2.2. Otros genes que influyen en la respuesta QS

- El regulador QS (QscR) fue descubierto como un represor de los factores de virulencia regulados por 3-oxo-C₁₂-HSL. Esto asegura que la cascada QS no se activa prematuramente dentro del huésped, o en entornos donde no es necesario. Este efecto inhibitorio está controlado por la proteína activadora global GacA ⁽⁹⁾.
- RsaL, el producto de un gen encontrado entre LasI y LasR en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, es un regulador negativo del circuito QS. El producto del gen *vrf* es un receptor de AMPc homólogo requerido para la transcripción de LasR ⁽⁹⁾.
- RsmA regula varios fenotipos dependientes de QS en *P. aeruginosa*, como la producción de proteasas, elastasas, lectinasas citotóxicas, cianuro de hidrógeno y piocianina. La sobreexpresión de RsmA reduce la expresión de la AHL sintetasa, LasI y Rhl. Además, se ha demostrado que RpoN controla la expresión de rhlI ⁽⁹⁾.

3.2.3. Antagonistas del quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

El descubrimiento de los inhibidores del QS en *P. aeruginosa* supuso un gran avance en la búsqueda de nuevos compuestos activos frente a este patógeno. Existen una serie de mecanismos de control del QS, tales como la inhibición o degradación de la señal AHL, inhibiendo la AHL sintasa, o bloqueando la interacción receptor-ligando ⁽⁹⁾.

Unos de los más potentes antagonistas obtenidos mediante la modificación de antagonistas de autoinductores naturales, son las **furanonas halogenadas** (figura 6a), producidas por algas marinas para evitar la colonización por bacterias. Estos productos naturales interrumpen la interacción SwR-C₄-HSL de *Serratia liquefaciens* e inhiben las interacciones LuxR-3-oxo-C₆-HSL y CarR-3-oxo-C₆-HSL, pero tienen poca actividad contra el LasR-3-oxo-C₁₂-HSL ⁽⁷⁾.



Hentzer *et al.* ⁽¹²⁾ sintetizaron un análogo que carece de la cadena lateral alquílica de las furanonas naturales y encontró que este compuesto tenía una actividad inhibidora considerable contra el sistema QS de *P. aeruginosa* (figura 6b). Mostraron que la molécula inhibe los genes en un modelo de estudio *in vitro* pero no en *P. aeruginosa* de tipo salvaje con niveles naturales de AI. Este compuesto no inhibió la formación de biofilme, pero afectó la arquitectura del biofilme y mejoró el proceso de desprendimiento bacteriano, lo que constituyó un resultado muy prometedor ⁽⁷⁾.

Cuando se compara las estructuras químicas de estos compuestos, cabe destacar que tres antagonistas, los **2**, **3** y 3-oxo-C₁₂-D10, están estructuralmente relacionados con el agonista sintético **4** (figura 7). Pequeños cambios estructurales del grupo 2-aminociclohexanol (D12) (es decir, OH al grupo ceto **3**, anillo de 6 a 5 miembros (**2**) o ciclohexanol a fenol (3-oxo-C₁₂-D10)), altera dramáticamente

la actividad de agonista a antagonista. A la vista de la fuerte actividad agonista de **4**, estos antagonistas probablemente mantienen la unión a Las R pero fallan en activarla, y por lo tanto actúan como potentes inhibidores. Entre estos compuestos, **3** y 3-oxo-C₁₂-D10 inhiben la expresión del factor de patogenicidad. Además, el

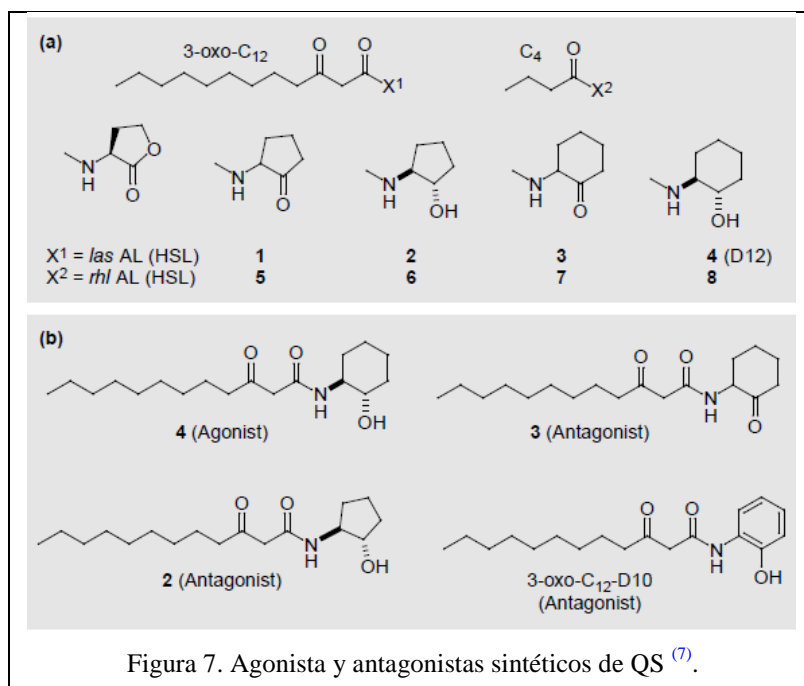


Figura 7. Agonista y antagonistas sintéticos de QS ⁽⁷⁾.

compuesto anterior inhibe la formación de biofilmes tanto en el mutante QS (en presencia de AI exógenas) como en el *P. aeruginosa* de tipo salvaje. Este último compuesto no inhibe la formación de biofilmes sino que altera significativamente la arquitectura del biofilme. Estos antagonistas podrían permitir la obtención de compuestos más potentes ⁽⁷⁾.

Así pues, en términos del mecanismo molecular por el que estos antagonistas inhiben los sistemas QS, aún quedan numerosas preguntas por resolver. ¿Cómo inhiben los antagonistas a Las-R? ¿Por qué los pequeños cambios estructurales en D12 produjeron antagonistas? Se ha demostrado que TraR y muy probablemente LasR se dimerizan en la unión con AI, formando complejos necesarios para la activación transcripcional. Por lo tanto,

se puede especular que estos antagonistas previenen la dimerización de LasR. La comprensión del mecanismo inhibitorio de estos antagonistas ayudará a desarrollar inhibidores QS más potentes ⁽⁷⁾.

En conclusión, aunque se ha logrado un éxito limitado, la atenuación observada de la virulencia de *P. aeruginosa* por los antagonistas de AI sintéticos es alentadora para la búsqueda continua de compuestos inhibidores de QS, como posibles antibacterianos ⁽⁷⁾.

3.3. Detección de quórum en bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*

En bacterias Gram-positivas, las moléculas autoinducidas son oligopéptidos modificados. Por su parte, los oligopéptidos no difunden a través de la membrana plasmática y necesitan un transportador específico, que generalmente modifica la estructura del autoinductor. También necesita dos receptores: una histidín-quinasa de membrana y una proteína que interaccionen con el DNA y active la transcripción. La señal producida se transmite por una cascada de fosforilación/desfosforilación. Por tanto, este mecanismo es mucho más complejo que el de bacterias Gram negativas ⁽⁴⁾.

El ejemplo más sencillo de estos sistemas es el caso de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* comprende una serie de patógenos capaces de causar múltiples infecciones agudas y crónicas, tales como neumonías, endocarditis, shock tóxico y osteomielitis, entre otras ^(13, 14, 15, 16). Esta patogénesis está mediada por factores de virulencia como exotoxinas, proteínas de unión a la pared celular, proteasas, lipasas y superantígenos ⁽¹⁴⁾. Estos factores permiten a la bacteria eludir las defensas del hospedador, adherirse a las células y a la matriz del tejido, propagarse dentro del hospedador y degradar los tejidos. Por tanto, la supresión de la patogenicidad y los factores de adhesión celular constituyen un nuevo enfoque para intentar disminuir las infecciones ⁽¹⁷⁾.

3.3.1. El sistema *quorum sensing* en *Staphylococcus aureus*: sistema *agr*

Actualmente, el componente del sistema de traducción de señales mejor caracterizado en *S. aureus* es el sistema QS conocido como regulador génico accesorio (*agr*). La activación de este sistema regula todas las toxinas y exoenzimas de *S. aureus* (figura 8). Aunque el *locus agr* se ha estudiado principalmente en *S. aureus*, parece conservarse a través de los firmicutes ⁽¹⁸⁾ y se sabe que contiene dos transcripciones divergentes denominadas RNAII y RNAIII que son controladas por los promotores P2 y P3, respectivamente (figura 8) ^(14, 18, 19, 20).

El transcriptor P3, el nucleótido 517 denominado RNAIII, es el efector de la respuesta *agr*. El transcriptor de RNAII cubre un operón de cuatro genes que contiene *agrBDCA*, que

codifica para los componentes transmembrana, citosólicos y extracelulares del sistema de traducción de señales.

En *Staphylococcus*, los péptidos autoinductores (AIP) son tiolactonas macrocíclicas que consisten en 7-12 aminoácidos en los que un residuo central de Cys o Ser está unido covalentemente al α -carboxilato C-terminal para formar un macrociclo que comprende 5residuos de aminoácidos (15, 18, 20, 21, 22).

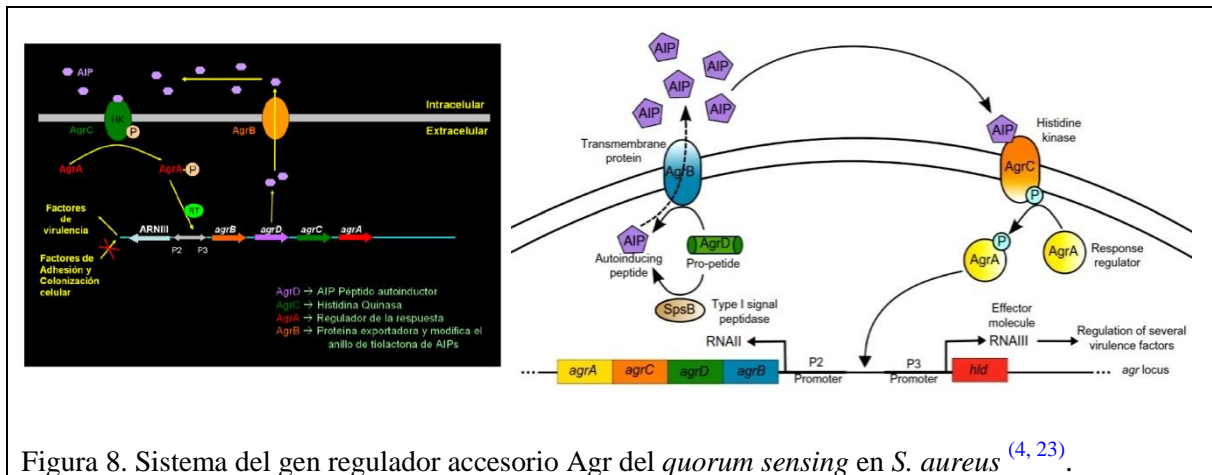
La secuencia de los AIPs es altamente variable. *S. aureus* puede subdividirse en cuatro grupos *agr* diferentes (18) mientras que *S. epidermidis* se subdivide en tres grupos. El **sistema *agr*** de *S. aureus* está constituido por cuatro genes que codifican la expresión de cuatro proteínas (4):

- **AgrD**: sintetiza el autoinductor peptídico (AIP).
- **AgrC**: sintetiza la histidín-quinasa encargada de transmitir la señal desde la membrana plasmática hasta la molécula reguladora de la respuesta transcripcional.
- **AgrA**: sintetiza la molécula reguladora de la respuesta transcripcional.
- **AgrB**: proteína exportadora (excretora) que modifica el anillo de tiolactona del autoinductor peptídico.

Cuando la concentración de *S. aureus* es muy baja, el sistema *agr* está funcionando de forma constitutiva, produciéndose niveles basales del autoinductor proteico, de su proteína transportadora, de la histidín-quinasa y del regulador de la respuesta transcripcional. De esta forma, el autoinductor sale al medio extracelular y se producen los factores de adhesión y colonización a superficies (4).

Cuando los niveles de *S. aureus* aumentan, el péptido autoinductor (AIP) se une a la histidín-quinasa de membrana y produce su fosforilación. Esta produce a su vez la fosforilación del regulador transcripcional (AgrA) que se une al DNA con dos efectos (4):

- Induce la transcripción del ARN III que permite la expresión de los factores de virulencia y reprime la expresión de los factores de colonización y adhesión a superficies.
- Induce la expresión del operón *agr* (D, C, A, B) con lo que se produce la reactivación del sistema.

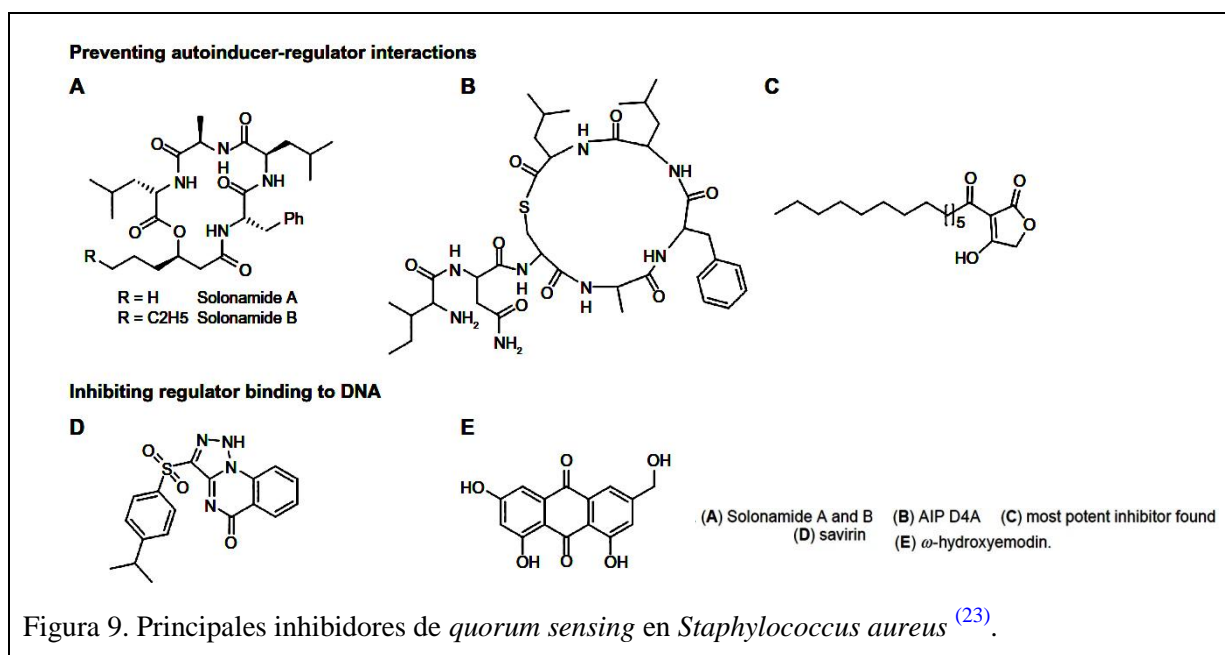


3.3.2. Inhibición del sistema *quorum sensing* en *Staphylococcus aureus*

Aunque la importancia evolutiva y fisiológica precisa de la inhibición del QS en *S. aureus* está aún por dilucidar, esta estrategia tiene un potencial terapéutico significativo. Se han descrito varios inhibidores QQ, con actividad frente a *S. aureus* (figura 9). Se ha demostrado que la inhibición del *agr* por los AIPs no conocidos suprime la producción de la enterotoxina C3, la lipasa y la toxina-1 del síndrome de shock tóxico. Además, la interferencia de la señalización del péptido autoinductor (AIP) mediante AIPs competidores o anticuerpos AIP-secuestradores, reduce la formación de abscesos en *S. aureus* e infecciones de tejidos blandos (24, 25 26). Estos hallazgos indican que las terapias dirigidas al *agr*, como la inhibición competitiva de AIP, constituyen un enfoque terapéutico único basado en la atenuación de la virulencia bacteriana (27).

Además, es importante destacar que el macrociclo es crítico para la función del péptido autoinductor AIP, ya que los péptidos lineales no activan *agr*, y la hidrólisis adicional de los bloques de tioéster funciona. Sin embargo, en relación con la inhibición potente del *agr*, el compuesto más significativo emergió de la mutagénesis dirigida al sitio con escaneo de alanina en *S. aureus* AIP-I que proporciona la variante D5A, potente inhibidor de AgrC-I y que se demostró posteriormente también como inhibidor universal a través de las especies de *S. aureus* (16, 21).

Recientemente se ha visto que en *S. aureus*, la mutación del ácido aspártico a la alanina en la posición 4 dentro del macrocíclico AIP-III, también proporciona un potente grupo inhibidor (22). Investigaciones posteriores se han centrado en análogos truncados (tr) que comprenden solamente la porción macrocíclica de la estructura. Estas investigaciones han llevado al desarrollo de tr-(Ala⁵)-AIP-I N-acetilado con valores de IC₅₀ de aproximadamente 0,1-5 nM, activos en los cuatro sistemas *agr* en *S. aureus* (21).



3.4. Límites actuales en la identificación de inhibidores de *quorum sensing*

Como ya se ha visto, la interrupción de los sistemas de comunicación *quorum sensing* en bacterias, mediante antagonistas de autoinductores, constituye una alternativa a los antibióticos y una estrategia prometedora en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana. Actualmente se están desarrollando inhibidores de QS –IQQ- (inhibidores *quorum quenching* –QQ-) tanto naturales como sintéticos. La mayoría de las investigaciones *in vitro* se basan en experimentos con “cepas marcadoras” (*reporter*) o “detectoras” de moléculas señaladoras de QS. No obstante, este tipo de ensayos están sujetos a desviaciones experimentales, ya que los compuestos ensayados como IQQ, pueden tener otros efectos adversos o tóxicos sobre dichas cepas dando lugar a falsos positivos, lo que supone una importante limitación en estas investigaciones.

Por tanto, es necesario intensificar el desarrollo cepas de laboratorio *biosensoras* con genes marcadores, detectores o señaladores, que posean un fenotipo específico en respuesta a los autoinductores de QS. Como se ha señalado, el uso de estas cepas biosensoras tiene una importante restricción, ya que los fenotipos regulados por QS a menudo son co-dependientes de otros factores o dependen de diversas actividades metabólicas de la célula. Las condiciones del ensayo, los medios de cultivo empleados y los protocolos experimentales pueden modificar las respuestas bacterianas a los compuestos candidatos a IQQ.

En condiciones ideales, una cepa biosensora de control debería pertenecer a la misma especie que la cepa “informadora” (emisora de QS) a fin de evitar diferencias en sensibilidad entre especies y la construcción del promotor-gen marcador (*reporter gene*) debería tener el mismo número de copias que en la cepa QS emisora de la molécula señal ⁽²⁸⁾.

Hasta el momento varios grupos de investigación han utilizado estos tipos de ensayos ^(29, 30, 32, 33). Sin embargo, uno de los sistemas experimentales más prometedores es el denominado Sistema Selector de Inhibidores de *Quorum Sensing* (QSI), puesto a punto por los grupos de Defoirt y Rasmussen ^(28, 34). Es necesario seguir investigando, y poner a punto y validar métodos suficientemente sensibles y específicos que permitan valorar la actividad inhibidora de los sistemas QS, y así evitar atribuir a los nuevos compuestos en ensayo una actividad QQ; siendo en realidad falsos positivos que afectan al crecimiento de las cepas biosensoras mediante mecanismos diferentes a los regulados por QS.

4. Conclusiones

1. Los inhibidores del *quorum sensing* constituyen una nueva estrategia antimicrobiana terapéutica muy eficaz.
2. Las moléculas inhibidoras no inducen resistencias en bacterias.
3. Esta estrategia podría suponer una buena alternativa terapéutica para cepas resistentes a antibióticos.
4. Dada la repercusión clínica y social de las infecciones multirresistentes, es urgente el desarrollo de nuevas estrategias de búsqueda de otros antibióticos, que incrementen el espectro de acción y amplíen el arsenal terapéutico disponible.

5. Bibliografía

1. Kalia VC. *Quorum sensing* inhibitors: an overview. *Biotech. Adv.* 2013; 31, 224-245.
2. Martínez Urda B, Serrano CV. El poder de la comunicación: bacterias aliadas por *quorum sensing*. IV Jornadas Complutenses, III Congreso Nacional de investigación para alumnos de pregrado en ciencias de la salud. 2009.
3. Diggle *et al.* *Quorum sensing*. *Curr. Biol.* 2007; 6, 17 (21).
4. Marquina D, Santos A. Sistemas de *quorum sensing* en bacterias. *Serie Microbiología. Reduca.* 2010; 3 (5), 39-55.
5. Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biol.* 2004; 14 (11), 648-656.

6. Dong YH, Wang LH, Zhang LH. *Quorum-quenching* microbial infections: mechanisms and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2007; 362, 1201–1211.
7. Suga H. and Smith KM. Molecular mechanisms of bacterial *quorum sensing*. *Curr. Opinion in Chem. Biol.* 2003; 7, 586-591.
8. Tang K, Zhang X-H. *Quorum Quenching* Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar. Drugs.* 2014; 12, 3245-3282.
9. Willcox MDP, Zhu H, Conibear TCR, Hume EBH, Givskov M, Kjelleberg S, Rice SA. Role of *quorum sensing* by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial keratitis and cystic fibrosis. *Microbiol.* 2008; 154, 2184-2194.
10. Forschner-Dancause S, Poulin E, Meschwitz S. *Quorum Sensing* Inhibition and Structure-Activity Relationships of β -Keto Esters. *Molecules.* 2016; 21, 971.
11. Otero AMC, Muñoz AC, Bernárdez MIH, Fábregas JC. *Quorum sensing*: el lenguaje de las bacterias. 2005.
12. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Hoiby N *et al.* Inhibition of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol.* 2002; 148:87-102.
13. Somerville GA, Proctor RA. At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009; 73, 233-248.
14. Gordon CP, Williams P, Chan WC. Attenuating *Staphylococcus aureus* virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. *J. Med. Chem.* 2013; 56, 1389-1404.
15. Chan WC, Coyle BJ, Williams P. Virulence Regulation and *Quorum Sensing* in *Staphylococcal* Infections: Competitive AgrC antagonists as *quorum sensing* inhibitors. *J. Med. Chem.* 2004; 47, 4633-4641.
16. McDowell P, Affas Z, Reynolds C, Holden MTG, Wood SJ, Saint S, Cockayne A, Hill PJ, Dodd CER, Bycroft BW, Chan WC, Williams P. Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide *quorum-sensing* system of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 2001; 41, 503-512.
17. Cascioferro S, Cusimano MG, Schillaci D. Antiadhesion agents against Gram-positive pathogens. *Future Microbiol.* 2014; 9, 1209-1220.
18. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR. Peptide signaling in the staphylococci. *Chem. Rev.* 2011; 111, 117-151.
19. Pan J, Ren D. *Quorum sensing* inhibitors: a patent overview. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2009; 19, 1581-1601.
20. Novick RP, Geisinger E. *Quorum sensing* in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 2008; 42, 541-564.
21. Lyon GJ, Wright JS, Muir TW, Novick RP. Key Determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochem.* 2002; 41, 10095-10104.

22. Thoendel M, Horswill AR. Identification of *Staphylococcus aureus* AgrD residues required for autoinducing peptide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 2009; 284, 21828-21838.
23. Reuter K, Steinbach A, Helms V. Interfering with Bacterial *Quorum Sensing*. *Perspect. Medicin. Chem.* 2016; 8, 1-15.
24. Kirchdoerfer RN, Garner AL, Flack CE, Mee JM, Horswill AR, Janda KD, Kaufmann GF, Wilson IA. Structural basis for ligand recognition and discrimination of a *quorum-quenching* antibody. *J. Biol. Chem.* 2011; 286, 17351-17358.
25. Mayville P, Ji G, Beavis R, Yang H, Goger M, Novick RP, Muir TW. Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96, 1218-1223.
26. Park J, Jagasia R, Kaufmann GF, Mathison JC, Ruiz DI, Moss JA, Meijler MM, Ulevitch RJ, Janda, KD. Infection control by antibody disruption of bacterial *quorum sensing* signaling. *Chem. Biol.* 2007; 14, 1119-1127.
27. Gordon CP, Olson SD, Lister JL, Kavanaugh JS, Horswill AR. Truncated autoinducing peptides as antagonists of *Staphylococcus lugdunensis quorum sensing*. *J. Med. Chem.* 2016; 59, 8879-8888.
28. Defoirdt T, Brackman G, Coenye T. *Quorum sensing* inhibitors: how strong is the evidence? *Trends in Microbiol.* 2013; 21(12), 619-624.
29. Defoirdt T. *et al.* A *quorum sensing*-disrupting brominated thiophenone with a promising therapeutic potential to treat luminescent vibriosis. *Plos One* 2012; 7 (7), e41788.
30. Dobretsov S. *et al.* Inhibition of marine biofouling by bacterial *quorum sensing* inhibitors. *Biofouling.* 2011; 27, 893–905.
31. Bulman Z. *et al.* A novel property of propolis (bee glue): anti-pathogenic activity by inhibition of N-acyl-homoserine lactone mediated signaling in bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 138, 788–797.
32. Borlee BR. *et al.* Identification of synthetic inducers and inhibitors of the *quorum-sensing* regulator LasR in *Pseudomonas aeruginosa* by high-throughput screening. *Microbiol.* 2010; 76, 8255–8258.
33. Brackman G. *et al.* Synthesis and evaluation of thiazolidinedione and dioxazaborocane analogues as inhibitors of AI-2 *quorum sensing* in *Vibrio harveyi*. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21, 660–667.
34. Rasmussen, T.B. *et al.* Screening for *quorum-sensing* inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* 2005; 187, 1799–1814.