

## Regulación y co-regulación de fenotipos de virulencia por el sistema Quorum Sensing dependiente de diferentes moléculas señal sensadas por varias especies de *Vibrio*

Esmeralda Escobar-Muciño\* 

Laboratorio de Microbiología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación Innovación y Desarrollo, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, México.

\*Email autor corresponsal: [esmeeem2014@gmail.com](mailto:esmeeem2014@gmail.com)

**Recibido:** 23 julio 2021. **Aceptado:** 12 septiembre 2021

### RESUMEN

La especie *Vibrio* puede formar una simbiosis con animales marinos produciendo bioluminiscencia y en otros casos puede causar enfermedad en peces y humanos. La simbiosis y la patogénesis depende de la expresión de factores de virulencia regulados por el Quorum Sensing (QS). El objetivo del presente estudio fue describir los múltiples sistemas QS en *Vibrio*, controlados por moléculas autoinducidas como el autoinductor-1 (acil homoserina lactonas), el (S)-3-hidroxitridecan-4-ona (CAI-1), el autoinductor-2 (furanosil borato di-éster), el autoinductor-3, la noradrenalina y la epinefrina. Además, se describen los principales reguladores transcripcionales de QS como el regulador maestro AphA (a baja densidad celular), los reguladores transcripcionales LuxR, HapR, LitR, LsrR, QseB y KdpE (en alta densidad celular). También, se describen algunas moléculas que regulan el mecanismo de QS como el óxido nítrico (NO), la etanolamina, el 3,5-dimetil-pirazin-2-ol (DPO) y el ciclo-(L-Phe-L-Pro), activando la simbiosis, la patogenia, la defensa y la unión con fagos facilitando la lisogénesis de *Vibrio*. De igual modo se describieron los mecanismos de co-regulación de fenotipos por medio de los reguladores transcripcionales LuxR y AphA. Concluyendo que en la actualidad el sistema QS de *Vibrio* continúa en estudio, se han descubierto nuevas moléculas señal, nuevos mecanismos y proteínas que co-regulan la red de señalización de QS en *Vibrio* y varios fenotipos como la producción de autoinductores, la bioluminiscencia, la movilidad, la biopelícula, la morfología, la producción de polisacáridos, la simbiosis, la utilización de hierro y los sistemas de secreción (1, 3 y 6).

**Palabras clave:** autoinductores (1-3); 3,5-dimetil-pirazin-2-ol (DPO); la ciclo-(L-Phe-L-Pro); etanolamina; factores de virulencia; óxido nítrico; Quorum Sensing.

## ABSTRACT

*Vibrio* species can form a symbiotic relationship with marine animals and produce luminescence, but they can also cause disease in fish and humans. The expression of virulence factors, which is controlled by Quorum Sensing (QS), is required for symbiosis and pathogenesis. This study aimed to describe the multiple QS systems in *Vibrio* that are controlled by autoinducer molecules such as autoinducer-1 (acyl homoserine lactones), (S)-3-hydroxytridecan-4-one (CAI-1), autoinducer-2 (furanosyl borate diester), autoinducer-3, norepinephrine, and epinephrine. Furthermore, the main transcriptional regulators of QS are described as the master regulator AphA (activated to low cell density), the transcriptional regulators LuxR, HapR, LitR, LsrR, QseB, and KdpE (activated to high cell density). Also, are described some molecules that participate in the regulation of the QS mechanism, such as nitric oxide (NO), ethanolamine, 3,5-dimethyl-pyrazin-2-ol and cyclo-(L-Phe-L-Pro), activating the symbiosis, pathogenesis, defense and phage binding to facilitate lysogenesis of *Vibrio*. At the same time, the co-regulation of phenotypes by means of transcriptional regulators LuxR and AphA. Concluding that at present the *Vibrio* QS system continues in study, new signal molecules, mechanisms and proteins have been discovered that co-regulate the QS signaling network in *Vibrio* and various phenotypes such as autoinducer production, bioluminescence, mobility, biofilm, morphology, polysaccharide production, symbiosis, iron utilization and secretion systems (1, 3 and 6).

**Keywords:** autoinducers (1-3); 3,5-dimethyl-pyrazin-2-ol (DPO); cyclo-(L-Phe-L-Pro); ethanolamine; virulence factors; nitric oxide; Quorum Sensing.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias pueden comunicarse entre ellas coordinando su comportamiento en respuesta a la densidad celular. Este fenómeno es conocido como la detección de quórum, el cual se fundamenta en la producción y detección de una o más moléculas señal secretadas al ambiente extracelular por las bacterias [1].

Este mecanismo de comunicación bacteriana nombrado como Quórum Sensing (QS) fue descubierto en microorganismos pertenecientes

al género *Vibrio* en los años 70s, encontrando que la producción de la bioluminiscencia se relacionaba con la alta densidad celular bacteriana producida por *Vibrio harveyi* [2]. Y a su vez, la producción de moléculas autoinductoras producidas en cierto umbral de concentración son sensadas por las bacterias y provocan una respuesta tal es el caso de la activación de genes [1,2].

El descubrimiento del QS fue por medio de un experimento simplista que consistió en exponer

un cultivo de *Vibrio fisheri* a los metabolitos producidos por esta especie, observando que la producción de la bioluminiscencia aumentaba al estar al contacto con los metabolitos. Encontrando que a las 7 horas de crecimiento se expresaba la mayor concentración de bioluminiscencia producida por *V. fisheri* [2].

Posteriormente, en los 80s se abrió un campo de estudio para caracterizar bioquímicamente a la enzima luciferasa, responsable de la producción de la bioluminiscencia en *V. fisheri*. Y a la par, se acuñó el término “autoinductor” a esas pequeñas moléculas que permiten la expresión de algunos procesos bacterianos, mediante la activación de la transcripción de genes al formar un complejo proteína-ligando entre el autoinductor y regulador transcripcional LuxR [2, 3, 4].

Esta respuesta es coordinada y permite a los microorganismos responder a los cambios que ocurren en el ambiente bacteriano adaptándose y promoviendo la supervivencia. Para lo cual, se han descrito varios procesos dependientes de QS como la formación de biopelícula, la auto agregación, la regulación de la expresión del flagelo, el control del proceso de invasión, la producción de fimbrias, la obtención de hierro, la quimiotaxis, la adherencia a las células HeLa, la activación del sistema de secreción tipo 6 y

el control de la inmunidad adaptativa de las bacterias por medio de la regulación del sistema CRISPR-Cas, que está relacionado con ciertos mecanismos de defensa contra algunos bacteriófagos [5-12].

### **Clasificación de los autoinductores producidos por microorganismos**

En la actualidad se reporta un aumento creciente de investigaciones relacionadas con el descubrimiento de nuevas moléculas autoinductoras, nuevos receptores de QS, diferentes formas de interrumpir e inhibir las vías de señalización y el uso de nuevas tecnologías para explicar el proceso de señalización del QS con la finalidad de investigar más a detalle algunos modelos bacterianos difíciles de describir [5, 13, 14].

Existen alrededor de 1382 moléculas autoinductoras reportadas, de las cuales aproximadamente 182 moléculas son únicas y son producidas por 215 microorganismos [14].

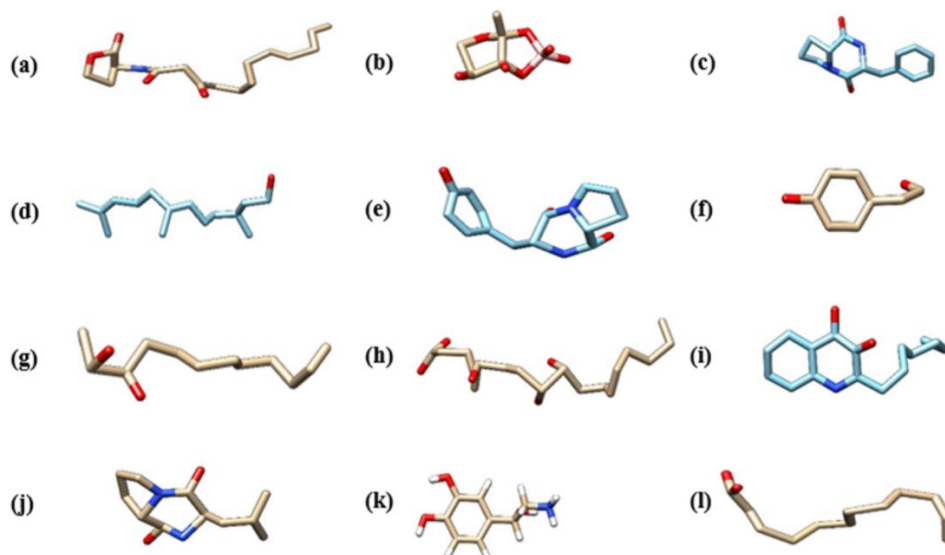
Las moléculas autoinductoras más estudiadas y producidas por los microorganismos se describen en la tabla 1.

En la figura 1 se muestran las estructuras químicas de las moléculas autoinductoras descritas previamente.

**Tabla 1.** Los diferentes autoinductores producidos por microorganismos.

Autoinductor	Comunicación	Microorganismos que lo producen
Las N-acil-homoserina lactonas (AHLs) conocidas como el autoinductor-1 (AI-1)	Intraespecie e interespecie	Gram-negativas
El furanosil borato di-éster o autoinductor-2,	Intraespecie e interespecie	Gram-negativas y Gram-positivas
Los autoinductores peptídicos (AIPs),	Intraespecie e interespecie	Gram-positivas
El autoinductor-3 (AI-3), cuya estructura química es parecida a la epinefrina/norepinefrina	comunicación entre reinos (mamíferos y bacterias)	Gram-negativas
Los factores difusibles de señalización (DSF),	Intraespecie e interespecie	Gram-negativas
Las quinonas	Intraespecie e interespecie	Género <i>Pseudomonas</i>
Las dicetopiperazinas (DKPs)	Intraespecie e interespecie	Gram-negativas
La p-coumaroil-AHL, el isovaleril-AHL y la cinnamoil-AHL	Intraespecie e interespecie	Bacterias fotosintéticas: <i>Rhodospseudomonas palustris</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , y <i>Bradyrhizobium ORS278</i>
El 3 ácido-metil-éster-hidroxi palmítico (3-OH PAME) y el (R)-metil-3-hidroxi miristato ((R)-3-OH MAME)	Intraespecie e interespecie	El género <i>Ralstonia</i>
El tirosol y las oxilipinas	Intraespecie e interespecie	Hongos

Esta tabla fue elaborada con la información presentada por los autores [15-21].



**Figura 1.** Estructura química de las principales familias de autoinductores en microorganismos. a) la dodecanoil-homoserina-lactona (C<sub>12</sub>-AHL), b) el furanosil borato di-éster (AI-2), c) el ciclo-L-Phe-L-Pro (dicetopiperazina), d) el farnesol, e) el ciclo tyr-pro (dicetopiperazina), f) el tirosol, g) el (S)-3-hidroxitridecan-4-ona (CAI-1), h) la oxilipina, i) la 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (PQS), j) el ciclo-leu-pro (dicetopiperazina), k) el autoinductor-3 (AI-3) y l) el factor difusible de señalización (DSF) [15-21].

El conocimiento de las estructuras químicas de cada uno de los autoinductores ha sido de interés desde el primer descubrimiento del autoinductor-1, ya que estas moléculas regulan muchos procesos bacterianos. Lo anterior es de interés ya que es posible controlar la producción de bio-productos regulados por QS como es el caso de moléculas de interés como ejemplo la producción de vainillina por medio de la expresión del gen LuxS, produciendo compuestos aromáticos por medio de la síntesis *de novo* controlando la ruta de biosíntesis del ciclo del metilo y al adicionar autoinductores es posible aumentar el rendimiento [22]. Otro ejemplo es la violaceína, un pigmento producido por *C. violaceum* regulado por el sensado de las acil homoserina-lactona [23]. En otros casos el hecho de conocer cómo es que se regulan los factores de virulencia en bacterias y así proponer una estrategia para inhibir algunos factores de virulencia como el uso de inhibidores de QS. Esta última estrategia en especial ha sido de interés ya que desde los 90's se ha estudiado como ejemplo a la furanona la cual es un inhibidor que compite con el sitio de unión al autoinductor-1 en algunas especies de bacterias Gram-negativas [24, 25]. Por ello el interés de los investigadores de conocer la estructura química de un autoinductor ya que se pueden sintetizar moléculas autoinductoras similares a los autoinductores que puedan

bloquear el sitio de unión al autoinductor [26].

### **Papel biológico de LuxN, LuxQ y LuxO en el QS de *Vibrio***

Se tiene bastante descrito que algunas especies de *Vibrio* controlan la producción de bioluminiscencia por medio del operón luciferasa (*luxCDABEGH*) mediante un elaborado circuito de detección de quórum [27]. El mecanismo de QS se basa en la acción catalítica de la enzima LuxM o AinS, que sintetiza a la molécula autoinductora conocida como beta-hidroxibutiril homoserina lactona. Posteriormente el autoinductor sale al espacio extra-citoplasmático con la finalidad de sensar las condiciones ambientales y posteriormente el autoinductor se une a la proteína transmembranal LuxN provocando una respuesta al sensar el autoinductor [28].

En esta etapa la proteína LuxN tiene 2 comportamientos; a baja densidad celular presenta actividad cinasa y se autofosforila en el residuo aminoacídico His-471. Después, el grupo fosforilo se transfiere al aminoácido Asp-771 del dominio regulador respuesta de LuxN, transfiriendo el grupo fosforilo a las proteínas LuxU y LuxO, que se encuentran en el interior de la célula bacteriana. Por el contrario, en alta densidad celular, en presencia del AI-1, la actividad cinasa de LuxN se inactiva y el regulador respuesta tiene un dominio cuya actividad es fosfatasa [29].

Otra proteína importante en el mecanismo de respuesta al autoinductor es LuxU, cuya estructura cristalina fue resuelta por Ulrich y cols., 2005 [29]. La función de esta proteína es establecer un equilibrio entre los grupos aspartil fosfato de LuxN y la aspartil fosfato de LuxO. Por consiguiente, la proteína LuxU transfiere el grupo fosfato de LuxO a LuxN como se mencionó [28, 29]. Lo anterior, se dilucidó mediante experimentos de delección y mutación puntual, revelando que la actividad de la cinasa LuxN está regulada por la presencia del AI-1, mientras que la actividad de la fosfatasa LuxN es constitutiva. Demostrando que el AI-1 y la proteína LuxN tienen un efecto mucho mayor en la fosforilación de LuxO y, por lo tanto, en la expresión del operón *lux* [30]. A su vez, la proteína LuxP de *V. harveyi* se asocia con la proteína LuxQ tanto en presencia como en ausencia del AI-2. Asegurando que existen cambios conformacionales de LuxQ con dos actividades enzimáticas opuestas, con la finalidad de transmitir información al citoplasma sobre la densidad celular del entorno circundante [31]. En las especies de *Vibrio* marinos, se ha encontrado que la unión de AI-2 al receptor periplásmico LuxP modula la actividad de la cinasa sensor LuxQ, ubicada en la membrana interna, transduciendo la información sensada a la región citoplasmática activando genes en respuesta al autoinductor

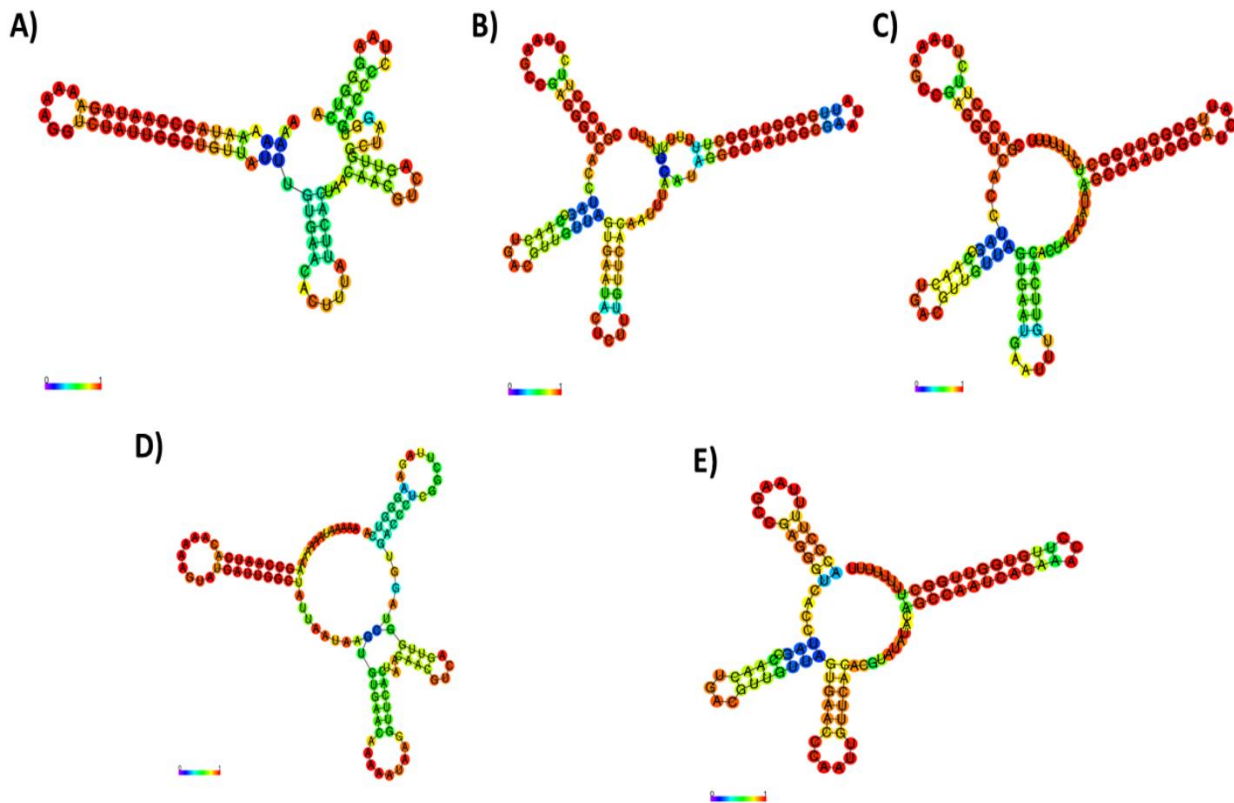
[31]. A medida que se multiplican los microorganismos, se ha observado que las moléculas autoinductoras se acumulan y activan el sistema de detección de quórum que inactiva a LuxO [1]. El papel biológico de esta proteína es regular negativamente la expresión de la bioluminiscencia en *Vibrio*. Observando que, a baja densidad celular, la proteína LuxO se fosforila y, junto con el factor  $\sigma^{54}$  provoca la represión del operón *luxCDABEGH*. Esta represión es indirecta, ya que la proteína LuxO podría activar un regulador negativo de la producción de la bioluminiscencia. Mientras que, en alta densidad celular, LuxO está desfosforilado, por ende, el operón *luxCDABEGH* no se reprime y *V. harveyi* emite luz. Como dato interesante, se ha encontrado que LuxO y el factor  $\sigma^{54}$  pueden activar la producción de sideróforos y la regulación del fenotipo relacionado con el cambio de morfología a colonias rugosas [28, 32]. Finalmente, se ha encontrado que a baja densidad celular LuxO reprime al regulador HapR, como consecuencia se activan los genes de virulencia de *V. cholerae* permitiendo así la colonización del intestino y la producción de la toxina del cólera [1].

### **El papel biológico de los sARN en el QS de *Vibrio***

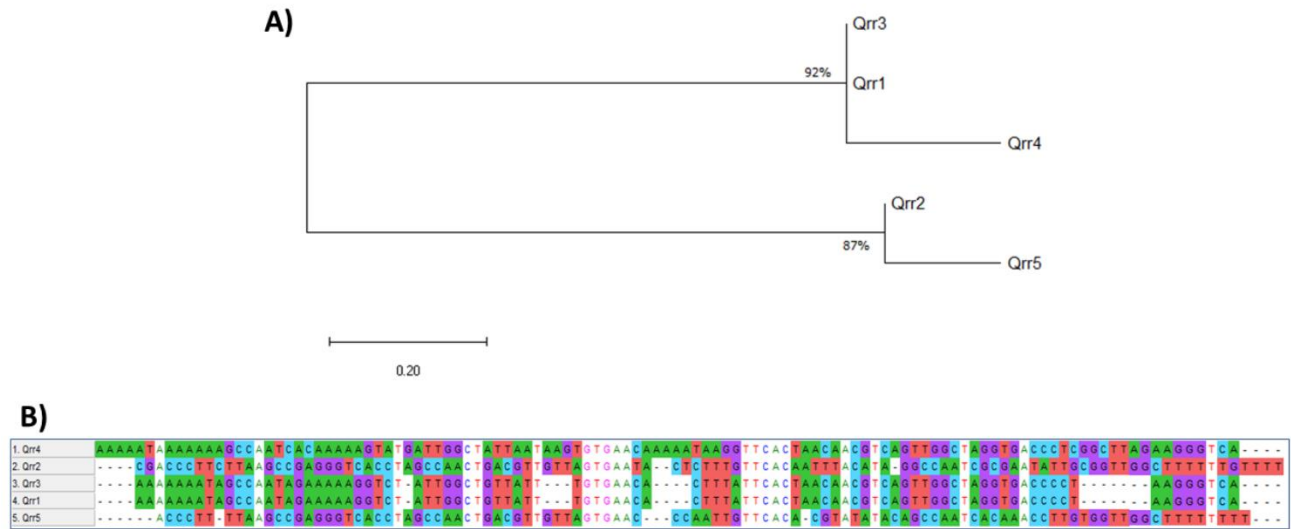
Los Qrrs son ARN no codificante que participa en la regulación de la detección de quórum en

*Vibrio*. Se cree que los ARN de este tipo son guiados por una proteína conocida como Hfq, cuyo papel biológico es regular la desestabilización de los ARNm que activan a los reguladores maestros de detección de quórum (LuxR, HapR y VanT) [28]. Existen 5 diferentes Qrrs (Qrr1-Qrr5), cuya estructura secundaria es parecida y se muestra en la figura 2A-E. Donde se ven las predicciones de las estructuras secundarias de menor energía para los pequeños ARN reguladores no codificantes (ARNs) de Qrr1-5 identificados en *V. harveyi* y *V. anguillarum* [33].

A su vez, se muestra el porcentaje de homología de las secuencias de los Qrr1-Qrr5 como se observa en la figura 3A. Demostrando con este estudio que existe un porcentaje de homología del 87-92% de las secuencias Qrr1-Qrr5 (Figura 3B), que fueron obtenidas de los 2 cromosomas de *V. anguillarum* cepa NB10 (números de acceso LK021130.1, LK021129.1, respectivamente) del banco de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) [34, 35, 37].



**Figura 2.** Estructura secundaria de los ARNs reguladores de QS en *Vibrio*: (A) Qrr1, (B) Qrr2, (C) Qrr3, (D) Qrr4 y (E) Qrr5. Las predicciones de cada estructura fueron diseñadas en el programa centroidfold [34-36].



**Figura 3.** (A) Representación del porcentaje de homología de las secuencias de Qrr1-Qrr5). (B) Los nucleótidos conservados. Imágenes elaboradas en Mega X a partir de las secuencias reportadas en la base de datos de NCBI [33, 35, 38].

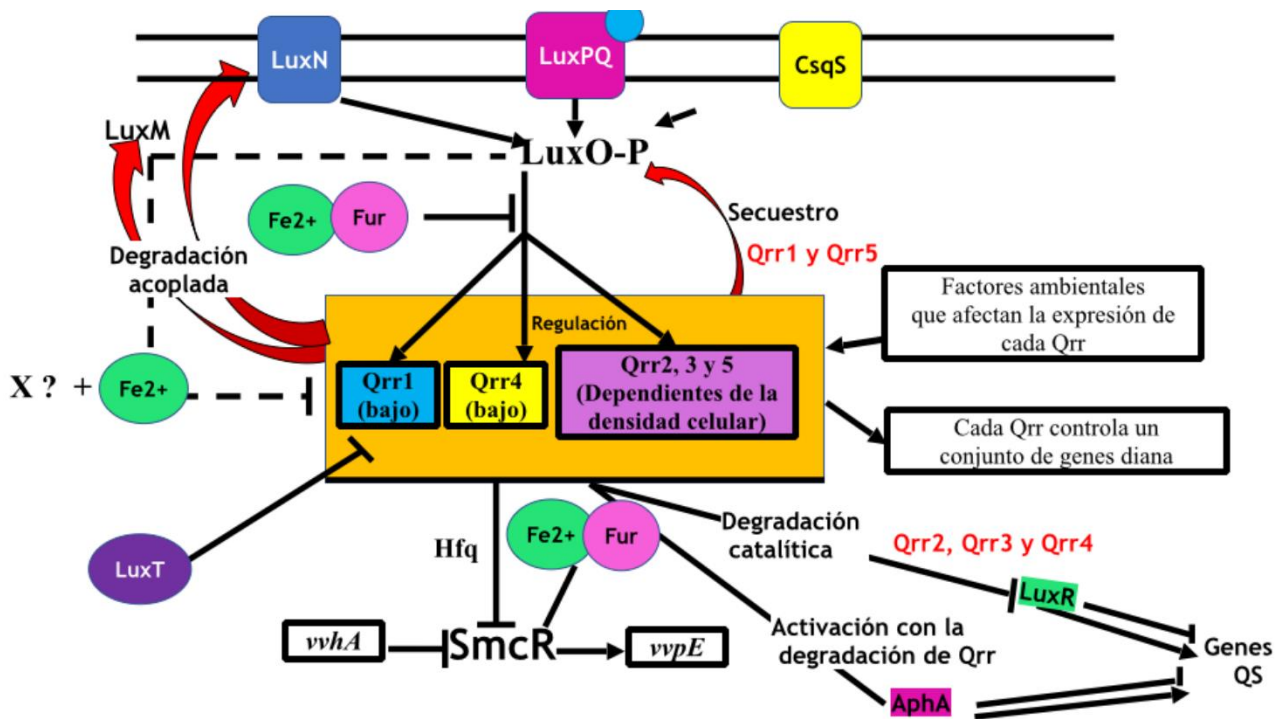
Así mismo, se sabe que el Qrr opera como un regulador negativo que actúa al sentir un cambio de la densidad celular de algunas bacterias. En *V. harveyi*, se ha encontrado que la proteína Qrr se une y reprime la expresión de la transcripción del ARNm, que activa la transcripción del gen *luxR* que a su vez codifica para la proteína LuxR. Esta proteína es conocida como el regulador maestro de genes dependientes del sentido de las AHLs. También, a densidades celulares altas hay un aumento del umbral de concentración de las AHLs, por esa razón, el regulador transcripcional de LuxR deja de ser reprimido. Adicionalmente en *V. harveyi* se ha encontrado que existen diferentes genes de *qrr* (Qrr1-5) [28]. Otro ejemplo es *V. vulnificus* cuyo

fenotipo es principalmente regulado por QS y los *qrr*, como es el caso del gen *vvpE* que codifica el factor de virulencia elastasa y muestra una expresión en alta densidad celular. Además, la transcripción del gen *vvpE* del mismo modo puede ser activada en sinergia por medio de dos señales ambientales biológicamente importantes como el hierro y la detección de quórum. Ambas señales convergen dirigiendo la expresión del gen *smcR*, que codifica para un regulador transcripcional del tipo LuxR, y a su vez coordina la expresión de ciertos factores de virulencia [33, 39, 40]. Este mecanismo de regulación se encuentra descrito en *V. vulnificus*. Confirmando que el complejo Fur-Fe<sup>2+</sup> y la detección de quórum regulan



coordinadamente la producción de sideróforos para lograr niveles intracelulares apropiados de hierro. Lo cual es de importancia para ciertas vías metabólicas relacionadas con el transporte de oxígeno, la fotosíntesis, el ciclo del ácido tricloroacético y la respiración [39]. Encontrando que este sistema no se expresa a baja densidad celular, pero se expresa en alta densidad celular y depende del regulador SmcR. Por otro lado, en condiciones ricas de hierro, la expresión de *vvsAB* se reprime independientemente de la densidad celular [39].

Actualmente, se ha investigado sobre el papel biológico de LuxT, descubriendo que esta proteína controla ciertos fenotipos regulados por detección de quórum en *Vibrionaceae* spp. por medio de la represión del *qrr1* [41]. En la figura 4 se muestra el mecanismo de regulación del QS de *V. vulnificus*, así como las múltiples funciones de los Qrr1-5 resumidas en la degradación catalítica (*luxR* y *aphA*), degradación acoplada (*luxN* y *luxM*) y el secuestro de los genes diana (*luxO*) [33, 39-41].



**Figura 4.** El sistema QS regulado por las 3 funciones de Qrr1-5, su participación con los reguladores maestros y la activación de fenotipos en *V. vulnificus*. Imagen adaptada de los datos reportados de varios investigadores [33, 39, 40].

### **El papel biológico de la proteína Hfq en QS de *Vibrio***

Hfq es utilizada por las bacterias como una respuesta a las señales ambientales, debido a que las células bacterianas necesitan coordinar su expresión genética de manera rápida y precisa. Ahora se sabe que los ARN desempeñan un papel esencial en la regulación postranscripcional de la expresión de genes en especial de virulencia. Los ARNs bacterianos pueden regular los ARNm diana, ya sea positiva o negativamente, a nivel de traducción o afectando la estabilidad del ARNm. Muchos ARNs ejercen sus funciones por apareamiento incompleto de bases con ARNm diana. Estas interacciones a menudo requieren la ayuda de la chaperona Hfq de unión al ARN [42]. Además, actúa como un regulador post transcripcional global en la mayoría de las bacterias [43]. Su mecanismo se basa en unirse a los pequeños ARN reguladores (ARNs) para facilitar la regulación de la traducción del ARNm en respuesta al estrés ambiental y los cambios de concentración de algunos metabolitos. También se une con alta especificidad a los ARNs, que son esenciales para la virulencia de *V. cholerae* [28]. Algunos fenotipos estudiados en *Vibrio* y que son regulados por Hfq son la morfología de las colonias, la utilización de nutrientes, la resistencia a los antibióticos, la respuesta al estrés oxidativo, la obtención de fuentes de carbono, el transporte, el metabolismo de

aminoácidos, la movilidad y la quimiotaxis [43].

### **El papel biológico del regulador transcripcional AphA a baja densidad celular bacteriana**

En general, el regulador AphA es considerado un regulador maestro del QS y de la virulencia de *Vibrio*. Este regulador es dependiente del regulador transcripcional LuxR, el cual se activa en alta densidad celular. Desde otra perspectiva AphA es un antagonista de la activación transcripcional de la proteína receptora de AMPc, que a su vez participa en el QS [44].

Se sabe que AphA regula 167 genes y co-regula 77 genes con el regulador maestro LuxR por medio de Qrr2, Qrr3 y Qrr4 [45]. Mientras que, los reguladores AphA y LuxR reprimen los genes del sistema de secreción de tipo 3, pero en diferentes momentos y en diferentes grados. La consecuencia de esta regulación es que el sistema de secreción del tipo 3 se restringe a un pico en la densidad celular media. De modo que, existe una producción asimétrica de las proteínas AphA y LuxR con un patrón temporal preciso de expresión génica [45].

Por otro lado, los estudios de expresión han demostrado que AphA co-regula la expresión de los genes de respuesta al estrés, del metabolismo, de algunas oxidoreductasas, las

proteasas y los genes relacionados con el transporte de membrana [45]. De igual manera se ha descrito el comportamiento en baja densidad celular, las cinasas sensoras (CqsS y LuxQ), inician una cascada de fosforilación, que da como resultado la activación del regulador de respuesta LuxO. Además, RpoN ( $\sigma$ -54) actúa junto con la proteína LuxO activando la expresión de cuatro ARN pequeños (*qrr1-qrr4*), que impiden la expresión del regulador HapR desestabilizando la expresión génica del ARNm. Esto permite que las proteínas reguladoras AphA y AphB activen la expresión de los genes *tcpPH* (que codifican para las proteínas P y H de la biosíntesis de pili). Tanto TcpP y TcpH cooperan con las proteínas ToxR y ToxS, activando la expresión del gen *toxT*. Y la proteína ToxT a su vez activa los genes *tcp* y *ctx* (que codifican para enterotoxinas). Concluyendo que estos reguladores son de importancia para la expresión de la virulencia en *Vibrio* [46, 47]

Mientras que, a una alta densidad celular las proteínas CqsS y LuxQ funcionan como fosfatasa manteniendo a la proteína LuxO inactiva de manera que no se inhibe la expresión del gen regulador *hapR* y se transcribe. Posteriormente, la proteína HapR reprime la expresión del promotor *aphA*, evitando la expresión de los genes *tcpPH* y el

resto de la cascada de virulencia de *Vibrio* [46]

### **Co-regulación del sistema de secreción tipo 6 (SST6) por QS (AphA y HapR), RpoN, el diguanilato cíclico (di-GMPc) y TfoY**

El sistema de secreción de tipo 6 (SST6), es un sistema de secreción que fue descubierto en bacterias Gram-negativas. Es un inyectosoma contráctil, que inyecta proteínas efectoras (toxinas) en las células hospederas, provocando la muerte en organismos procariontes y eucariotes. El SST6 juega un papel importante en la virulencia bacteriana y la competencia por la supervivencia en el ambiente. Lo cual ha sido observado entre bacterias que pertenecen al mismo hospedero y los microorganismos que sintetizan el SST6 producen una serie de regulaciones complejas que pueden ocurrir a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post traduccional [48].

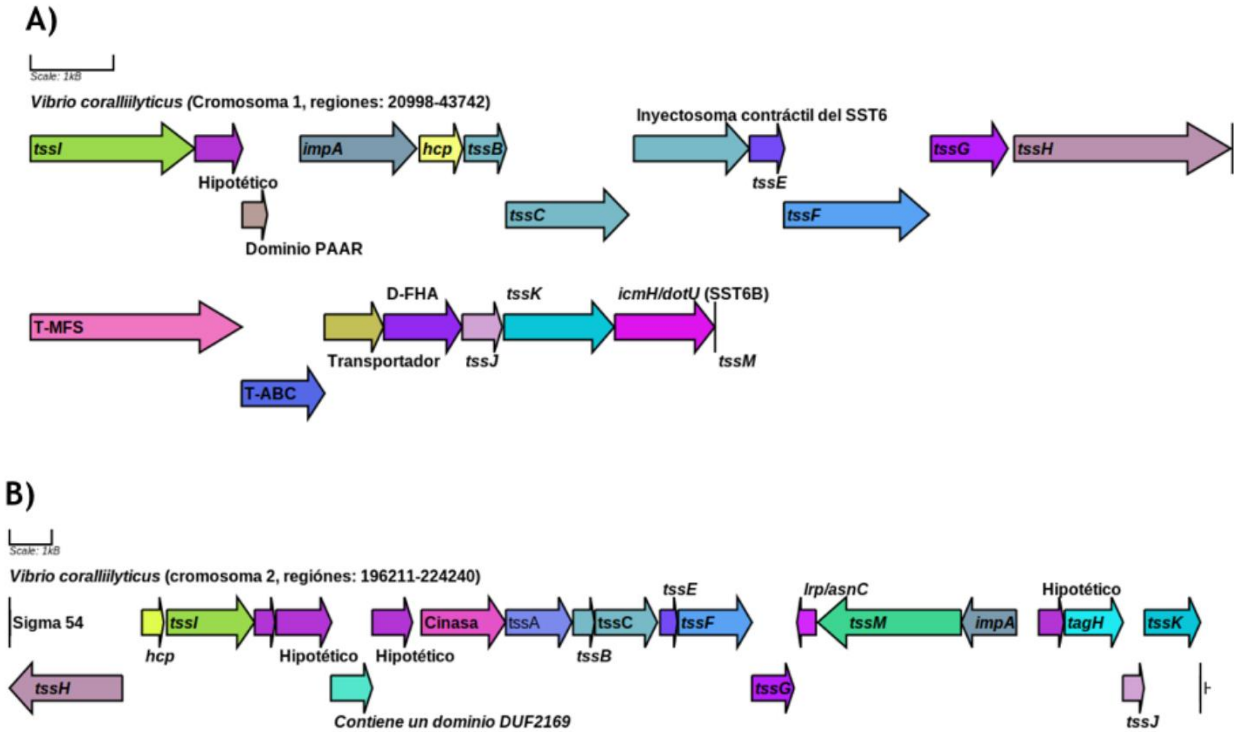
Ahora se sabe que el SST6 se controla mediante la detección de quórum, la represión de catabolitos y las vías de eliminación de nucleósidos. Asimismo, estas cascadas de señalización se integran al mecanismo de competencia inducida por la quitina producida por plantas, que coordina la co-expresión del SST6, los genes de competencia, de algunas señales ambientales y del huésped (la temperatura, la osmolaridad, el segundo mensajero di-GMPc, la mucina y la bilis).

Juntos, estos mecanismos reguladores proporcionan información de cómo *V. cholerae* coordina su actividad acoplada a la función del SST6 tanto en el medio acuático como en el hospedero [49].

Por otro lado, el SST6 está regulado positivamente por la molécula adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la proteína homodimérica CRP receptora de AMPC (cuyo papel biológico es como regulador global). Cuando las fuentes de carbono preferidas por el microorganismo se agotan o no están disponibles, se activa la transcripción del gen de la adenilato ciclasa (*cyaA*), lo que conduce a un aumento de los niveles de AMPC. El cual se une a CRP y el complejo resultante actúa como un regulador transcripcional controlando la activación y la represión de una serie de vías esenciales de *V. cholerae*. Incluida la absorción de carbono, el QS, la asimilación de la quitina, la competencia natural inducida por la quitina y el SST6. Asimismo, la supresión de los genes *cyaA* y *crp* (codifican para una fosfato liasa de ATP y el regulador transcripcional de unión a ADN, respectivamente), previniendo la producción de Hcp (hidroxilamina reductasa) ubicado en el clúster de genes del SST6 tipo 1 (Vf1SST6) y 2 (Vf1SST62) (figura 5A y 5B), indicando que el complejo AMPC-CRP es esencial para la expresión del SST6 [49]. El mecanismo por el que el complejo AMPC-CRP

regula el SST6 no es claro, pero es posible que el AMPC-CRP influya en la producción del SST6 por medio de la regulación del QS y la competencia inducida por la quitina [49]. Para lo cual, se requiere de estudios adicionales para determinar si el complejo AMPC-CRP controla la producción del SST6 por medio de estas vías o mediante mecanismos reguladores alternativos [49].

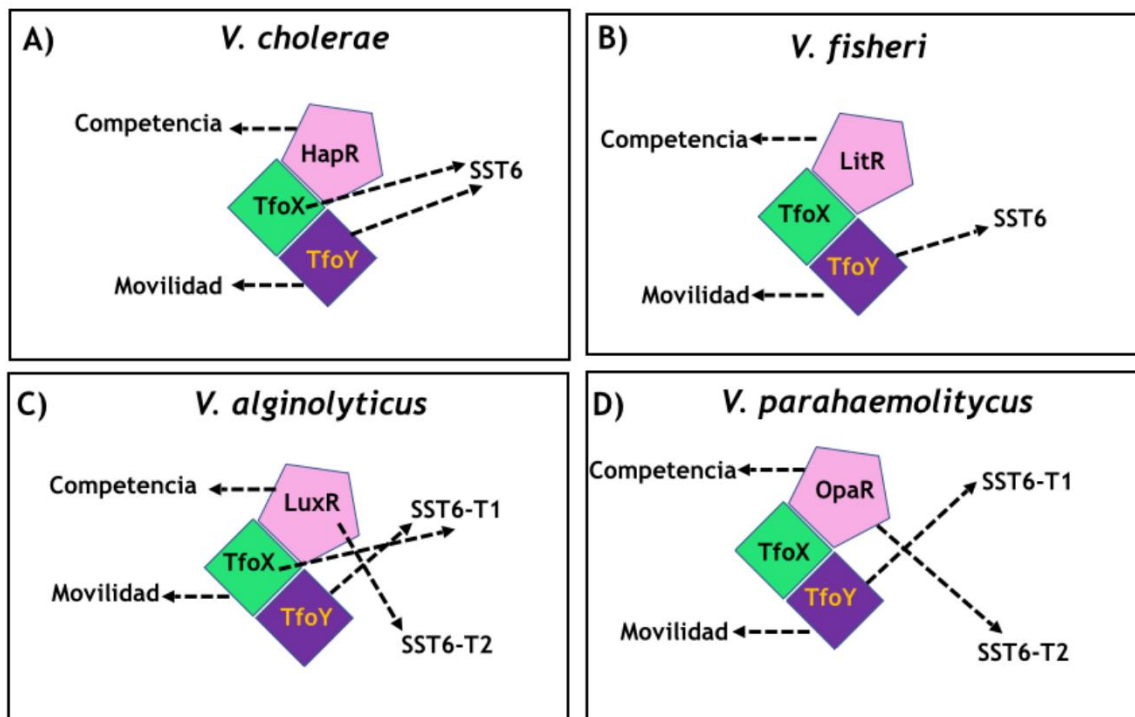
El di-GMPc tiene un papel biológico en las bacterias, ya que puede unirse a una amplia variedad de genes diana e influir en la actividad transcripcional y enzimática. Se ha descubierto que el di-GMPc activa al SST6 en *V. cholerae* por medio de una proteína homóloga a TfoX (que induce la competencia de *Vibrio*) conocida como TfoY (cuya función es contraria a TfoX). El 5'UTR de *tfoY* contiene un riboswitch de unión del di-GMPc que previene la traducción de la proteína TfoY en presencia de altos niveles de di-GMPc. La regulación del SST6 por medio de la proteína TfoY es independiente de la regulación de TfoX. Se sabe que TfoY presenta un mecanismo de detección de peligro y escape defensivo en *Vibrio* [49]. Además, TfoY impulsa la producción de toxinas dependientes e independientes de SST6, junto con un fenotipo de movilidad incrementada y la activación de la hemólisis cuando el di-GMPc disminuye su concentración [51].



**Figura 5A y 5B.** Contexto genómico del sistema de secreción tipo 6 (1 y 2), correspondientes a *Vibrio coralliilyticus* cepa OfT6-21 (cromosoma 1 y 2), elaborado en el presente estudio y cuyos datos fueron obtenidos de NCBI [50]. Abreviaturas: T-ABC (transportador del tipo ABC), T-MFS (transportador MFS), D-FHA (dominio FHA), *tss* (genes que codifican para proteínas que conforman al sistema de secreción tipo 6).

Otra característica descrita en que TfoX y TfoY es que regulan la competencia natural, la movilidad y la secreción de tipo VI. Indicando que la regulación es similar en las especies de *V. cholerae*, *V. fischeri*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Observando una regulación positiva por parte del regulador TfoX o TfoY. Conjuntamente, los reguladores maestros del

QS (HapR, LuxR, OpaR y LitR) co-regulan la competencia, la movilidad y SST6, por medio de TfoX y TfoY. Existe evidencia de las vías de señalización mediadas por TfoX y TfoY, las cuales se muestran en la figura 6A-D describiendo 4 mecanismos de activación los procesos descritos [1].



**Figura 6A-D.** La regulación de la competencia, movilidad y el sistema de secreción tipo 6 de la clase 1 y 2 (SST61 y SST62) por medio de la co-regulación de los reguladores maestros de QS y las proteínas TfoX y TfoY en 4 especies de *Vibrio* [1].

En el caso de *V. fluvialis* las moléculas autoinductoras CAI-1 y AI-2 activan al regulador maestro HapR, por medio de las proteínas LuxU/LuxO. Por consiguiente, el QS juega un papel importante en la patogenia regulando varios factores de virulencia de *V. fluvialis* como el SST6 [48]. Y este hallazgo mejorará la posible diafonía entre el SST6 y el QS en bacterias Gram-negativas [48].

El mecanismo de regulación del SST6 se reprime a baja densidad celular y se activa en alta densidad celular. En *V. cholerae*, la regulación de genes por QS es mediada por una

cascada de fosforilación modulada por cuatro cinasas histidínicas sensoras (CqsS, LuxPQ, CqsR y VpsS). Donde CqsS y LuxPQ detectan al autoinductor 1 (CAI-1) y el autoinductor 2 (AI-2). Mientras que, no se han identificado los ligandos de las proteínas CqsR y VpsS. Por el contrario, en alta densidad celular las cuatro cinasas histidínicas fosforilan a la proteína LuxU, que a su vez fosforila a LuxO por fosfotransferencia. Después, LuxO fosforilada activa la expresión de los cuatro ARN pequeños (Qrr1-4), que se unen y desestabilizan la transcripción del ARNm del SST6 y HapR. En alta densidad celular, LuxO no está fosforilado

y la transcripción de *qrr1-qrr4* está inactiva, lo que permite la traducción del SST6 y el regulador HapR [49].

Un elemento importante de los reguladores maestros AphA y OpaR participan en la regulación del QS a baja densidad celular y alta densidad celular, respectivamente. Como ejemplo la proteína reguladora ToxR, (expresada en baja densidad celular), se coordina con el QS para reprimir la expresión de SST61 cuando la célula fisiológicamente cambia de baja a alta densidad celular. Lo que da como resultado una alta expresión del SST61 en la fase de crecimiento media logarítmica de *Vibrio* [49].

Mientras que el factor sigma  $\sigma 54$  (RpoN) es un importante regulador de la respuesta bacteriana al estrés ambiental [51]. Este regulador activa procesos como formación de biopelículas, producción de proteasas y exopolisacáridos, y virulencia en *V. anguillarum* M3 [51]. Se ha demostrado que la expresión de la proteína Hcp1 requiere del factor sigma alternativo RpoN y la proteína de unión al potenciador VasH, que está codificada en el grupo de genes SST6VA1. Que en conjunto con el regulador maestro LuxR y RpoN regulan positivamente la expresión del SST6. Demostrando que la regulación de la detección de quórum y el factor sigma alternativo influyen en la activación de la transcripción del SST6. Concluyendo que la

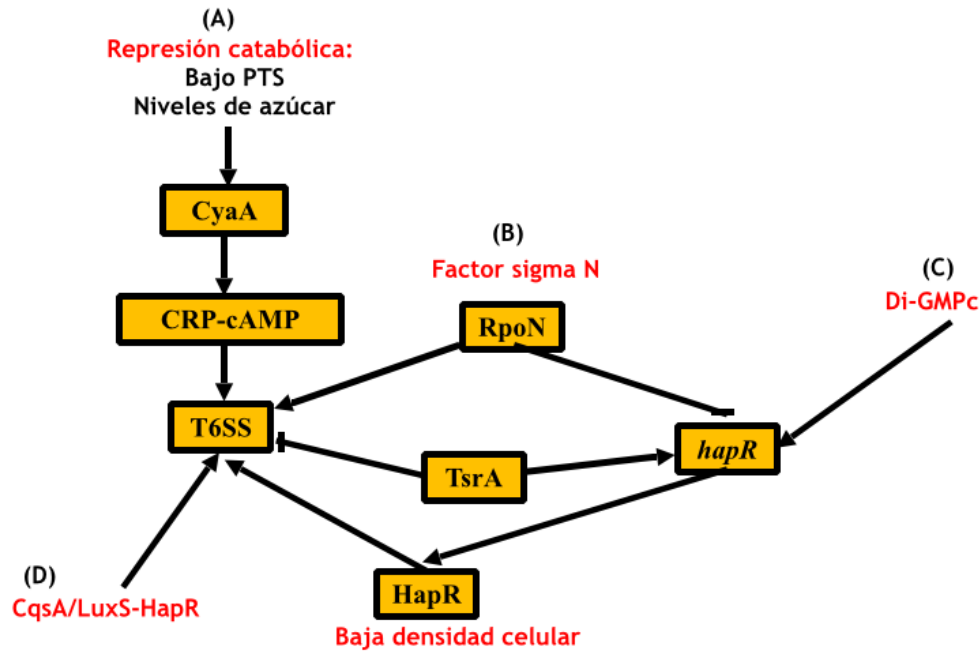
activación del SST6 probablemente involucra al activador transcripcional VasH, que activa la ARN polimerasa unida a los sitios de unión sigma-54 de los promotores de SST6 [52, 53].

En segundo lugar, se ha informado que *vasH* codifica un activador del factor sigma-54 ( $\sigma 54$ ) alternativo que permite que VasH y  $\sigma^{54}$  (codificado por el gen *rpoN*) actúen en conjunto controlando la transcripción del gen SST6 Hcp de *V. cholerae* ya que VasH se une a los promotores que impulsan la expresión del gran grupo SST6 [52, 53].

En la figura 7A-D se muestran los diferentes mecanismos de activación del SST6 ya sea por represión catabólica, el factor sigma RpoN (involucrado en la inactivación de la transcripción del regulador maestro de QS *hapR*), el di-GMPc, del QS (HapR, LitR, LuxR y OpaR) o por las proteínas reguladoras TfoX o TfoY.

### **Co-regulación de la expresión de la toxina del cólera y el pili por el QS (AphA y HapR) y la proteína Fur**

Se ha encontrado que el regulador transcripcional AphA reprime indirectamente la transcripción del gen *toxR* (que codifica para el activador transcripcional de la toxina del cólera en baja densidad celular). Mientras que, la proteína OpaR (un regulador transcripcional homólogo a LuxR), no tiene acciones regula-



**Figura 7.** Factores y moléculas señal que regulan al sistema de secreción tipo 6 como: (A) la represión catabólica, (B) factor sigma N, (C) el di-GMPc y (D) el CAI-1 y AI-2 por medio de la vía CqsA/LuxS-HapR [47-49, 54].

doras sobre la transcripción de *toxR*. A la par, se ha encontrado que la proteína ToxR tampoco muestra acciones regulatorias de AphA y OpaR. Sin embargo, se ha descrito la auto represión de ToxR y que esta proteína regula negativamente la transcripción de los genes del sistema de secreción tipo 3 ubicado en el cromosoma 1 (SST3-1). Pero activa los genes encontrados en la isla de patogenicidad de *Vibrio* como el del sistema de secreción tipo 3 ubicado en el cromosoma 2 (SST3-2) y el gen que codifica para la hemolisina *tdh2*, ambos involucrados en la virulencia de *V. parahaemolyticus* [55]. Finalmente, se ha

dilucidado que la toxina del cólera (CT), el pili y la toxina TCP subunidad principal (TcpA) son los factores de virulencia principales de *V. cholerae*. Estas toxinas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de diarrea grave en humanos, y son co-regulados por la proteína Fur [56].

La importancia de los mecanismos moleculares mencionados en este apartado influye en la expresión de los factores de virulencia de *Vibrio*. Este microorganismo regula sus diversos factores de virulencia para prosperar en el intestino delgado humano y en los reservorios ambientales [57]. Uno de ellos es el

SST6, el cual es utilizado por muchas especies de bacterias Gram-negativas para administrar proteínas efectoras tóxicas a las células de presa de las bacterias cercanas con la finalidad de matar o inhibir su crecimiento [58]. Además de que en el ser humano la microbiota modifica los ácidos biliares para inhibir la muerte de bacterias comensales mediada por el SST6. Como es el caso de *V. cholerae*, demostrando que hay una interacción novedosa entre bacterias comensales, factores del huésped y el SST6 de *V. cholerae* [57]. Motivo por el cual es de interés conocer los mecanismos moleculares por los cuales las proteínas reguladoras de QS actúan en la regulación y co-regulación del SST6 para crear estrategias en contra de las enfermedades y brotes causados por las variantes patogénicas de *Vibrio* reportadas como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* tanto en seres humanos como en animales provenientes de la acuicultura ya que en el caso de animales marinos estos pueden causar enfermedades de transmisión alimentaria en seres humanos [59-61].

### **El papel biológico del regulador transcripcional LitR/HapR en la formación de biopelícula, el cambio de morfología colonial y bioluminiscencia en *Vibrio***

Las biopelículas son comunidades bacterianas asociadas a la superficie que son cruciales en la naturaleza y durante la infección [62]. Muchas

especies bacterianas colonizan superficies y forman biopelículas densas; estructuras tridimensionales, que son altamente tolerantes a los antibióticos y constituyen una de las principales formas de biomasa bacteriana en la tierra. Además, las biopelículas de bacterias patógenas pueden causar infecciones devastadoras. Estas estructuras bacterianas muestran cambios notables durante su desarrollo desde la adhesión inicial hasta la madurez, sin embargo, se desconoce en gran medida la arquitectura celular que da lugar a la morfología colectiva de las biopelículas durante el crecimiento [63].

El sistema de QS de *V. cholera* está conformado por un conjunto de proteínas sensor cinasa y el regulador respuesta LuxO, que a su vez, controla la expresión del regulador maestro HapR. La estructura cristalina del regulador maestro HapR ha sido descrita, es funcional en forma dimérica, su arquitectura es muy similar a la familia de reguladores transcripcionales del tipo TetR, se une al ADN por medio de un motivo de unión al ADN o HTH en el dominio C-terminal, contiene una cavidad anfipática que asegura la unión con algunos ligandos como el autoinductor-1 en el dominio N-terminal [64, 65].

Entre los fenotipos regulados por HapR se encuentran la expresión de los genes asociados a la rugosidad, que a su vez está controlada por

un circuito de reguladores complejos [66].

A la par, la expresión de los reguladores VpsR y VpsT está controlada negativamente por el regulador maestro HapR. Y de manera similar, VpsR y VpsT controlan negativamente los niveles del gen *hapR*, lo que sugiere la presencia de un bucle regulador. A su vez, la expresión de genes *vps* es controlada positivamente por la proteína di-guanilato ciclasa A (CdgA) cuya transcripción está regulada positivamente por las proteínas VpsR y VpsT [66].

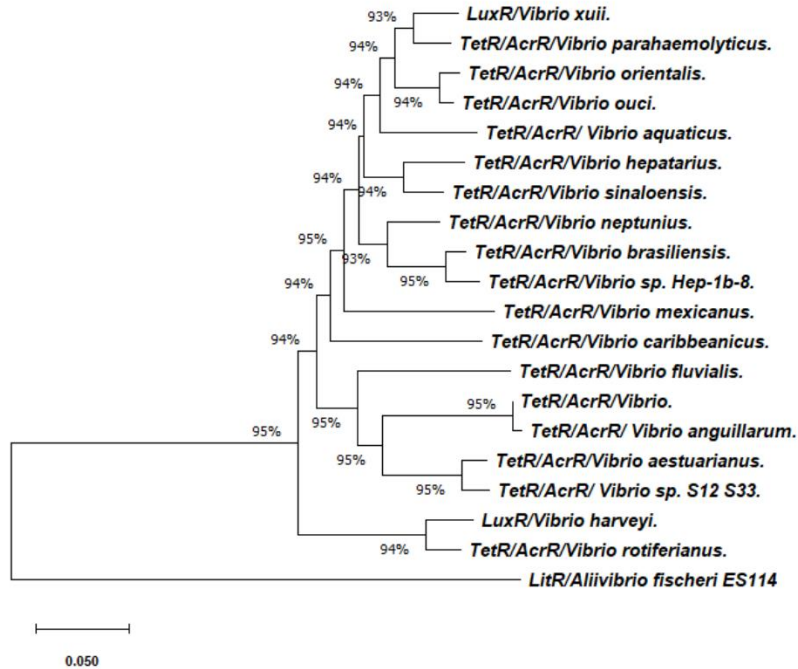
Entre los fenotipos de virulencia regulados por HapR, Fur y HlyU se encuentra la expresión de hemolisina en *V. cholerae* El Tor serogrupo O1 [67]. El mecanismo regulador se basa en que inicialmente las proteínas Fur y HlyU se transcriben en una densidad celular media (DO<sub>600</sub> de 0.6). Corroborando una regulación negativa por el regulador HapR, el cual resulta en la transcripción del gen *hlyA*, lo que lleva a una alta expresión de la proteína HlyA en la fase de crecimiento medio logarítmico. Esta regulación se ha descrito en los modelos bacterianos de *V. vulnificus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* [67].

Por otro lado, el papel de LitR como proteína reguladora del QS es muy complejo y a continuación se describe el mecanismo de regulación en *Vibrio*. Como ejemplo la bacteria *Vibrio fischeri*, este microorganismo infecta

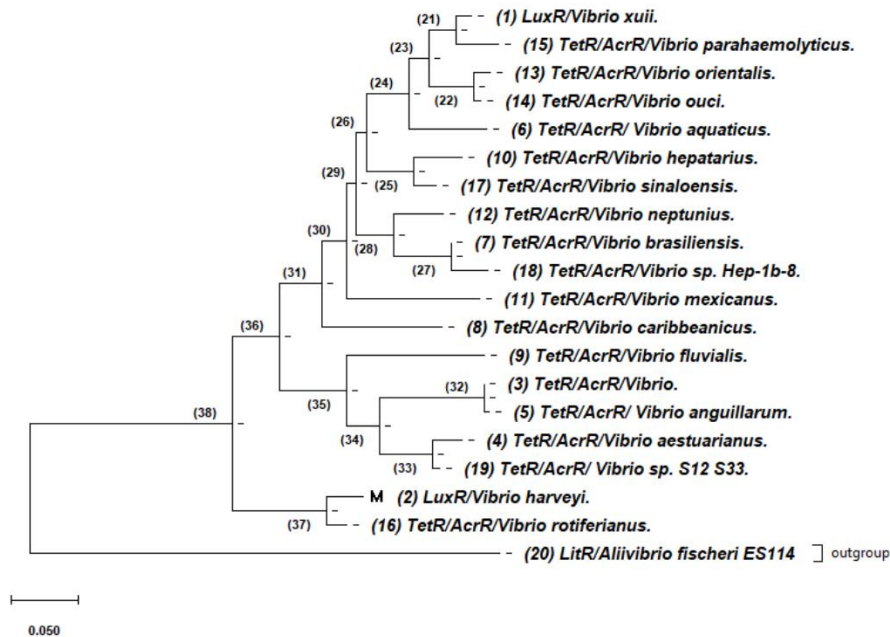
simbióticamente a animales marinos en densidades celulares de rango de densidad celular de aproximadamente  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  células. Por lo anterior, el regulador LitR tiene un papel fundamental regulando la colonización simbiótica de órganos de luz [68].

El gen *litR* codifica para una proteína con una alta identidad de secuencia con el regulador transcripcional de la familia TetR que están en el genoma de muchas especies de *Vibrio* spp. El regulador LitR, no solo tiene características funcionales similares a las de sus homólogos y modula la colonización de *V. fischeri* en calamares [68]. A continuación, se muestra el análisis de ancestro en común en MEGAX a partir del BLASTp de LitR (número de acceso: AF378100), demostrando las relaciones evolutivas de taxones infiriéndola por el método de mínima evolución (ME) [69]. Además, se muestra el mejor árbol filogenético dibujado a escala, las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson (Figura 8) [70] y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio.

Se elaboró un árbol de ME utilizando el algoritmo Close-Neighbor-Interchange (CNI, por sus siglas en inglés) a un nivel de búsqueda de un valor de 1 [72]. El algoritmo de Neighbor-joining se usó para generar el árbol inicial usando 20 secuencias de aminoácidos y se



**Figura 8.** Árbol filogenético del regulador LitR en especies de *Vibrio* elaborado por el método Neighbor-joining usando MEGAX [71].



**Figura 9.** Análisis de la descendencia del regulador LitR mediante análisis de nodos representado por un árbol filogenético obtenido en MEGAX, confirmando que el regulador LitR es descendiente del regulador TetR en *Vibrio*. El árbol fue obtenido basándose en los algoritmos de MEGAX [71, 73, 74].

muestra en la figura 9 [73]. Todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Con un total de 216 posiciones en el conjunto de datos final de la proteína LitR [71]. Demostrando que el nodo parental 20 correspondiente a LitR/*Allivibrio fischeri* ES114 es descendiente del nodo 36 y 37 (TetR/AcrR).

El papel del regulador LitR en la regulación de la bioluminiscencia, movilidad, biopelícula y morfología de *Vibrio* se describe a continuación.

El regulador LitR activa la luminiscencia por medio de la transcripción de *luxR*. A su vez, LuxR induce el operón *lux*, lo que da como resultado la producción de luz. En consecuencia, LitR está controlado por la detección de quórum y se activa en respuesta a los autoinductores [75].

La vía de detección de quórum incluye tres AI sintetasas, dos de las cuales, LuxS y AinS, producen AI que controlan las actividades de las proteínas sensor quinasa/fosfatasa LuxQ (a través de la proteína periplásmica LuxP) y AinR, respectivamente. Cuando los niveles de los AI son bajos, LuxQ y AinR funcionan como quinatasas, lo que da como resultado la fosforilación y activación del regulador de respuesta aguas abajo LuxO. Phospho-LuxO

activa la transcripción del gen del ARN pequeño (ARNm) *Qrr1*, que a su vez inhibe la producción de luz post transcripcionalmente al inhibir la síntesis de LitR. A medida que aumentan las concentraciones de IA, LuxQ y AinR cambian sus actividades a fosfatasas, desactivando LuxO y permitiendo la producción de LitR y, a su vez, aumentando los niveles de LuxR y de luz al tiempo que disminuyen la movilidad. La interrupción de LitR o su regulador positivo *ainS* da como resultado un aumento de la movilidad, mientras que la interrupción de *luxO* da como resultado una disminución de la movilidad [75].

LitR controla la movilidad por medio de las cinasas LuxQ y AinR, dirigiendo el flujo de fosfato a través de LuxU a LuxO, activando al LitR para promover la transcripción de *qrr1*. El pequeño ARN resultante inhibe la producción de LitR. A alta densidad celular, los niveles de los autoinductores AI-2 y C<sub>8</sub>-HSL se acumulan y cambian la actividad de LuxQ y AinR de quinatasas a fosfatasas, invirtiendo el flujo de fosfato y desactivando LuxO, lo que permite la producción de LitR [75].

Por otro lado, se ha confirmado que la inactivación de *litR* en *Vibrio* mejora la adhesión dependiente (del medio y la temperatura), la morfología de colonias rugosas y la formación de biopelículas. Además, LitR regula genes polisacárido de simbiosis (*syp*) de

*Vibrio fischeri*. La regulación del locus *syp* implica una red compleja de proteínas reguladoras, incluida la quinasa sensor híbrida RscS y el regulador de respuesta aguas abajo SypG. Las cepas de *V. fischeri* que sobreexpresan SypG muestran un aumento dramático en la formación de biopelículas y tienen una ventaja en la colonización del huésped, lo cual hace referencia al papel biológico del regulador LitR [76].

### **Producción de luminiscencia regulada por el par de proteínas LuxI/LuxR en *Vibrio***

Entre los mecanismos más estudiados del QS se encuentra el de *V. fischeri*, quien produce bioluminiscencia y vive de manera simbiótica en órganos especializados de peces y calamares [77]. La emisión de luz de este microorganismo está controlada por las proteínas LuxI y LuxR, ambas proteínas son consideradas los principales protagonistas del sistema QS y se pueden encontrar homólogos LuxI/LuxR en una gran variedad de bacterias Gram-negativas [78]. Otro modelo bastante estudiado es *V. harveyi*, un patógeno marino oportunista bioluminiscente encontrado a menudo en aguas tropicales. Este microorganismo produce bioluminiscencia, biopelícula, virulencia y el flagelo por medio del sensado de moléculas autoinductoras. Se sabe que *V. harveyi* produce al menos tres autoinductores diferentes y a su

vez posee tres proteínas sensoras (LuxN, LuxQ y CsqS) que captan a los autoinductores para activar genes como respuesta [79].

En general, el mecanismo del QS de *Vibrio* depende principalmente de la modulación de 4 factores como; a) la síntesis de moléculas señales o autoinductores (por medio de la enzima LuxI y sus homólogos), b) la acumulación de las moléculas señal en el espacio extra-citoplasmático, c) el reconocimiento de la molécula señal por medio del regulador transcripcional LuxR o sus homólogos y d) la activación transcripcional de algunos procesos bacterianos en respuesta a la señal autoinductora [80]. La primera etapa del QS de *Vibrio* como ya se mencionó es dependiente del autoinductor-1 y las proteínas homólogas a LuxI. Cuando la densidad poblacional es baja las células bacterianas producen un nivel basal del autoinductor-1. Se sabe que un determinado número de especies bacterianas produce únicamente un tipo o combinación de AHLs que varía en cuanto al tamaño de la cadena lateral. Encontrando en las especies bacterianas moléculas autoinductoras de 4 hasta 18 carbonos (C<sub>4</sub>-AHL a C<sub>18</sub>-AHL, respectivamente). Y los miembros de la misma especie bacteriana pueden reconocer y responder a un cierto tipo de molécula autoinductora [17]. En la segunda etapa las AHLs se difunden al exterior por transporte

pasivo a través de la membrana bacteriana con la finalidad de sensor las condiciones ambientales. Posteriormente, el autoinductor-1 entra a la célula para unirse a la proteína reguladora LuxR y formar un complejo LuxR-AHL con la finalidad de unirse a la región promotora del gen *LuxR* y finalmente activar la expresión de genes bacterianos que codifican para el operón *luxABCDEG* encargados de activar la producción de la bioluminiscencia y ciertos genes de virulencia [17]. En estudios previos se ha reportado que el par de proteínas LuxI/LuxR se distribuyen en más de 100 especies de bacterias Gram-negativas [80]. Con la finalidad de conocer cuántas especies poseen la capacidad de producir el AI-1 se han realizado búsquedas bioinformáticas utilizando a la proteína LuxI sintasa de *V. fisheri* como modelo [28]. Los datos comparativos obtenidos con respecto a los alineamientos de la proteína LuxI con las secuencias de la base de datos de Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), permitieron encontrar que existen 478 especies de bacterias Gram-negativas que en su genoma presentan a la proteína LuxI sintasa, es decir tienen la capacidad de producir el AI-1. Entre los alineamientos se encontró que la enzima LuxI se encuentra bien distribuida entre las clases *alfa*, *beta*, *gamma* y *delta* proteobacteria [14, 80]. Quedando claro que no todos los modelos bacterianos distribuidos en los

diferentes dominios bacterianos están caracterizados en cuanto a la funcionalidad de las proteínas LuxI/LuxR [14, 28]. Con respecto a LuxR, la secuenciación genómica ha sido de gran ayuda como base a los análisis bioinformáticos y con la ayuda de los algoritmos en los programas computacionales y el análisis del ancestro en común obtenido por medio de los árboles filogenéticos se ha comprendido sobre el análisis evolutivo de las proteínas LuxR en el género *Vibrio*. Encontrado, que el ancestro más común es la cepa de *V. nigripulchritudo*. Con el transcurso del tiempo, el regulador transcripcional LuxR ha evolucionado y se ha demostrado que existen cuatro descendientes directos (*V. metoecus*, *V. albensis*, *V. cholerae* y *V. mimicus*) con un segundo descendiente directo *V. anguillarum*. En otros estudios, se dividió a la proteína LuxR en 3 diferentes clados describiendo alrededor de 22 especies de *Vibrio*. Concluyendo que hay un alto grado de homología, sugiriendo que la proteína LuxR se conserva evolutivamente y posiblemente comparte un mecanismo de detección de quórum similar que está presente en todas las especies analizadas [81].

### **El autoinductor-1 o Acil Homoserina Lactona (AHL)**

Las AHLs provienen de diferentes especies bacterianas, se diferencian por la longitud y la

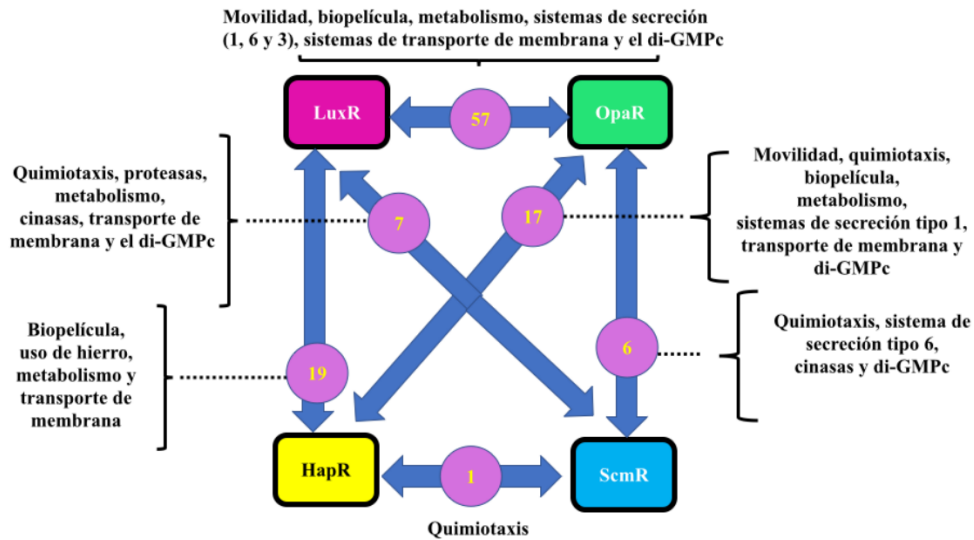
derivación química de sus cadenas laterales lipofílicas [82]. Existen diferentes tipos de AHLs dependiendo de la cadena lateral del grupo acilo de 4 carbonos a 14 carbonos, aunque se han identificado AHLs con 18 carbonos y con sustituyentes en el carbono 3 ya sea un grupo carbonilo o hidroxilo. Asimismo, las AHLs con cadena corta son capaces de difundirse más fácilmente a través de la membrana bacteriana en comparación con las de cadena larga, estas últimas necesitan de sistemas especializados de transporte [83]. Además, las bacterias poseen diferentes formas de detectar una gran variedad de moléculas autoinductoras por medio de diferentes mecanismos de señalización como el sistema de un solo componente, doble componente y los del tipo LuxR-solo o huérfano [82]. Como dato interesante, se ha descubierto que existen acciones sinérgicas, de competencia y de antagonismo bacteriano, cuyo papel biológico es ajustar el estilo de vida de cada microorganismo al responder a las moléculas autoinductoras. En *Vibrio* la enzima LuxI es necesaria para la síntesis de la OHHL (N-(3-

oxohexanoil)-L-homoserina lactona), una molécula autoinductora que se une a LuxR activando la bioluminiscencia en *Vibrio* [28].

El mecanismo de síntesis de las AHLs se basa en que estas moléculas sean sintetizadas por la enzima LuxI, mismas que son codificadas por el gen *luxI* o sus homólogos. Inicialmente, la proteína LuxI cataliza la unión de la molécula S-adenosil metionina (SAM) con la proteína transportadora de acilo (acil-ACP) por medio de un enlace amida, formado por la cadena acilo del Acil-ACP y el grupo amino del SAM. El intermediario (Acil-ACP-SAM) junto con la 5-metiloadenosina sufre una última reacción favoreciendo la síntesis de las AHLs [84]. Como ejemplo los géneros *Aliivibrio*, *Photobacterium* y *Vibrio* producen AHLs de bajo y alto peso molecular (C<sub>4</sub>-AHL, C<sub>6</sub>-AHL, el 3-OH-C<sub>8</sub>-AHL y la C<sub>10</sub>-AHL) [85]. Existe una gran cantidad de fenotipos regulados por el sensado de las AHLs. A continuación, en la tabla 2, se resumen algunos fenotipos regulados por las AHLs (de bajo y mediano peso molecular) en diferentes especies de *Vibrio*.

**Tabla 2.** Fenotipos regulados por los homólogos de LuxR en algunas especies de *Vibrio*.

Autoinductor	Función biológica	Bacteria	Referencia
C <sub>4</sub> -AHL y 3-oxo-C <sub>10</sub> -AHL	Infección de tejido y formación de biopelícula	<i>V. vulnificus</i> , <i>V. sinaloensis</i> y <i>V. alginoliticis</i>	[86-88]
3-oxo-C <sub>10</sub> -AHL	Proteasa extracelular, hemolisina y SST6	<i>V. fluvialis</i>	[89, 90]
AHL	Metaloproteasa (VvpE)	<i>V. vulnificus</i>	[91]
C <sub>12</sub> -AHL	Formación de biopelícula y patogenicidad	<i>V. scophthalmi</i>	[92]
C <sub>6</sub> -AHL y C <sub>8</sub> -AHL	Bioluminiscencia	<i>V. fisheri</i>	[93, 94]
AHL	Biosíntesis del sideróforo vulnibactina	<i>V. vulnificus</i>	[95]



**Figura 10.** La co-regulación de fenotipos en *Vibrio* por medio de los parálogos de LuxR (OpaR, SmR y HapR) [1]. Los números en las esferas lilas indican el número de genes que están siendo co-regulados por los reguladores maestros de QS.

Hace apenas unos años se encontraron reguladores transcripcionales de *Vibrio* que son parálogos de LuxR, los cuales se encuentran regulando fenotipos en varias especies de *Vibrio* [1]. En la figura 10 se muestran varios fenotipos regulados por LuxR, OpaR, SmR y HapR. Demostrando que estos reguladores activan una gran cantidad de fenotipos dependientes del QS en las especies de *Vibrio* como la biopelícula, la quimiotaxis, la utilización de hierro, la producción de proteasas, la activación de cinasas, la movilidad, el metabolismo, los sistemas de secreción (1, 3 y 6) y el transporte de membrana [1].

Todos los factores de virulencia expresados por *Vibrio* que son co-regulados por los reguladores

maestros del QS son de importancia conocerlos a detalle, ya que los patógenos como *Vibrio* pueden provocar enfermedad en seres humanos cuando el balance de la microbiota se rompe, debido a que el ser humano atraviesa etapas de baja inmunidad, enfermedades del corazón e inmunoterapia. Para lo cual *Vibrio* puede actuar como patógeno oportunista teniendo efectos negativos en la salud de los seres humanos [96].

### Variantes del autoinductor-1 en *Vibrio* sintetizadas naturalmente y por síntesis *de novo*

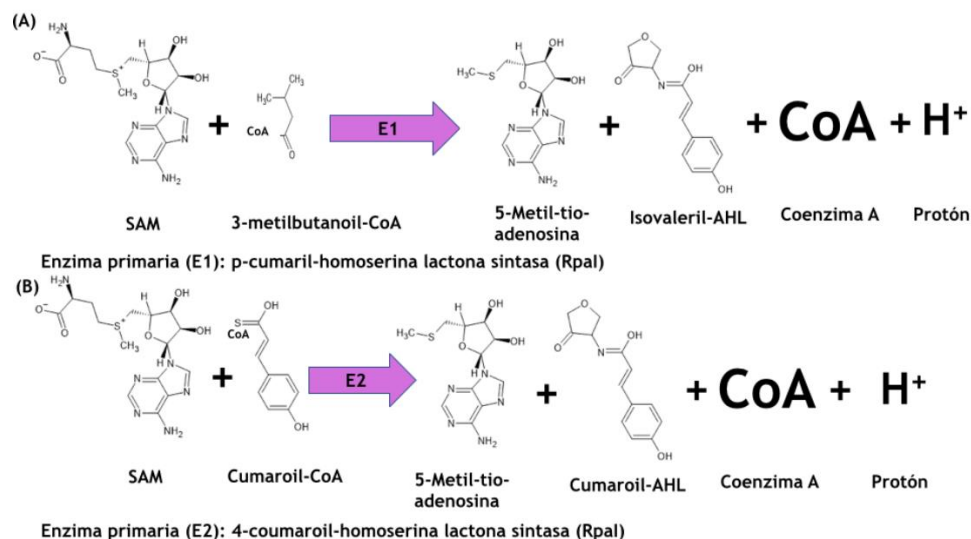
Se ha encontrado que algunas bacterias pueden producir la molécula autoinductora p-cumaroil-AHL, la cual se deriva del ácido p-cumárico. Esta señal puede desempeñar un papel

ecológico y de comunicación inter-especies de bacterias y algunas plantas [97, 98]. Se reportan 3 variantes de las AHLs conocidas como la p-cumaroil-AHL, isovaleril-AHL y cinnamoil-AHL producidas a partir de la lignina obtenida de plantas hospederas. Estas moléculas son bioconvertidas a sustratos que son utilizados por la enzima LuxI homóloga para sintetizar la variante del autoinductor como es el caso de las especies *Rhodopseudomonas palustris*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium* ORS278 [18, 19]. También, se ha reportado que la bacteria fotosintética *R. palustris* produce 2 variantes del autoinductor-1 denominadas fenilacetil-AHL y la p-cumaroil-AHL [98].

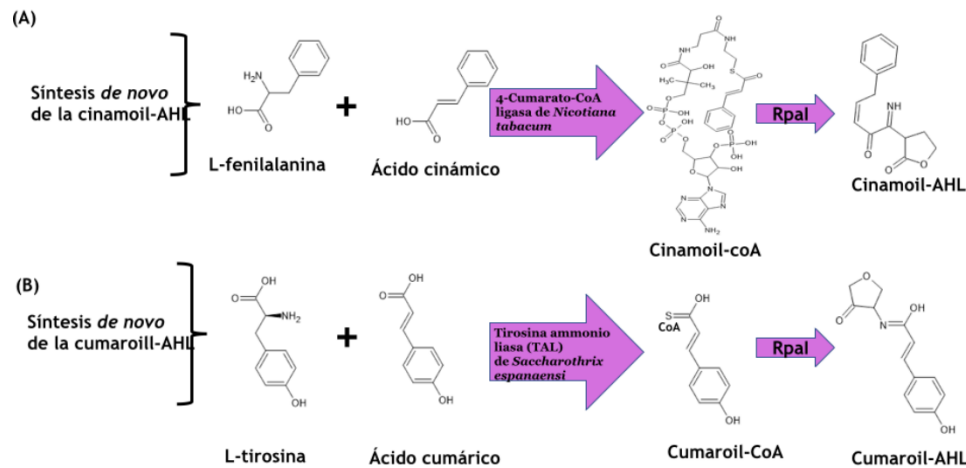
Algunos investigadores han intentado conocer cómo es que se sintetizan las variantes del AI-1, con el antecedente de que ácidos fenólicos

producidos en los exudados de las raíces influyen la producción de las variantes de las AHLs y utilizado algunos ácidos fenólicos como sustratos, tal es el caso del cinnamoil-CoA, p-cumaroil-CoA, cafeoil-CoA y el feruloil-CoA para simular la síntesis de las AHLs. Encontrando que al seguir una estrategia de sobrealimentar la vía del CAM con ciertos sustratos (tirosina, SAM y L-metionina) y sobreexpresar en *E. coli* las enzimas RpaI y p-cumaroil-CoA de *Rhodopseudomonas palustris* es posible obtener a la molécula a autoinductora p-cumaroil-HSL con altos rendimientos [77].

Las homoserina lactonas como la isovaleril-AHL y la cumaroil-AHL, se sintetizan mediante reacciones sencillas en microorganismos Gram-negativos tal como se observa en las figuras 11A y 11B.



**Figura 11.** (A) Síntesis de la isovaleril-AHL y (B) La síntesis de la cumaroil-AHL por *Vibrio*. Las reacciones de síntesis fueron obtenidas de MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome [99].



**Figura 12.** (A) Síntesis *de novo* de la cinamoil-AHL. (B) Síntesis de la cumaroil-AHL a partir de ácidos fenólicos obtenidos de lignina y de los exudados radiculares de plantas expresando la enzima autoinductor sintasa RpaI en *E. coli*. Imagen adaptada de la base de datos de MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome [99].

Las vías de obtención de las variantes de las moléculas autoinductoras (cinamoil-AHL y la síntesis de la cumaroil-AHL), utilizando sustratos provenientes de la lignina mediante el uso de la síntesis *de novo* también se muestran (Figura 12A y B).

### Mecanismo del QS en *Vibrio* regulado por el autoinductor CAI-1

El autoinductor CAI-1, es considerado una de las principales moléculas autoinductoras producidas por *Vibrio*. La síntesis de esta molécula es a partir de la decanoil-CoA y necesita de dos pasos enzimáticos para su síntesis. El primer paso utiliza la enzima autoinductor sintasa conocida como CqsA, que es codificada por el gen *cqsA* y el sustrato decanoil-CoA, cuya función es eliminar la S-

metil-5'-tioadenosina del sustrato SAM (S-adenosil metionina) y la coenzima A, resultado en la síntesis del 3-aminotridec-2-en-4-ona. Este compuesto sufre una desaminación hidrolítica espontánea para formar la tridecan-3,4-diona, que más adelante es reducida por una oxidoreductasa para formar el producto final CAI-1 [99].

### Mecanismo del QS en *Vibrio* regulado por el AI-2

Este mecanismo se basa en la síntesis del AI-2 por medio de la enzima LuxS utilizando el ciclo de activación del metilo o CAM. Después de la síntesis, el AI-2 es secretado tanto por bacterias Gram-negativas o Gram-positivas y se utiliza para la comunicación entre especies. La regulación de la expresión de LuxS, ocurre en

respuesta a cambios de la densidad celular y se le denomina detección de quórum [101-103]. Varios estudios han demostrado que el homodímero de la proteína LuxS posee ciertas similitudes entre varias especies bacterianas, debido a que existen datos sobre la topografía de la enzima, la cual es muy similar por ejemplo en *Vibrio* y *Bacillus* [104]. Las principales características de la enzima LuxS son que posee un sitio activo, presenta un átomo de hierro no hemo divalente mononuclear, tres residuos de aminoácidos clave para su actividad biológica (His-54, His-58 y Cys-128) y el sitio de coordinación del metal ocupado por una molécula de agua que da lugar a la conformación apo de la enzima LuxS [104]

Adicionalmente, el mecanismo de QS en *Vibrio* está muy descrito y se basa en que el AI-2 llegue a un umbral de concentración adecuado para que la molécula señal salga al espacio extra citoplasmático, sense las condiciones ambientales y a su vez la molécula regrese a la célula, con la finalidad de que las proteínas transmembranales LuxP y LuxQ sensen la molécula autoinductora. Posteriormente, se forman complejos con el AI-2 y como respuesta se activan los reguladores transcripcionales AphA, HapR y LuxR, con la finalidad de activar la producción de la bioluminiscencia y otros factores de virulencia en *Vibrio*. En cuanto a fenotipos regulados por el AI-2 se han

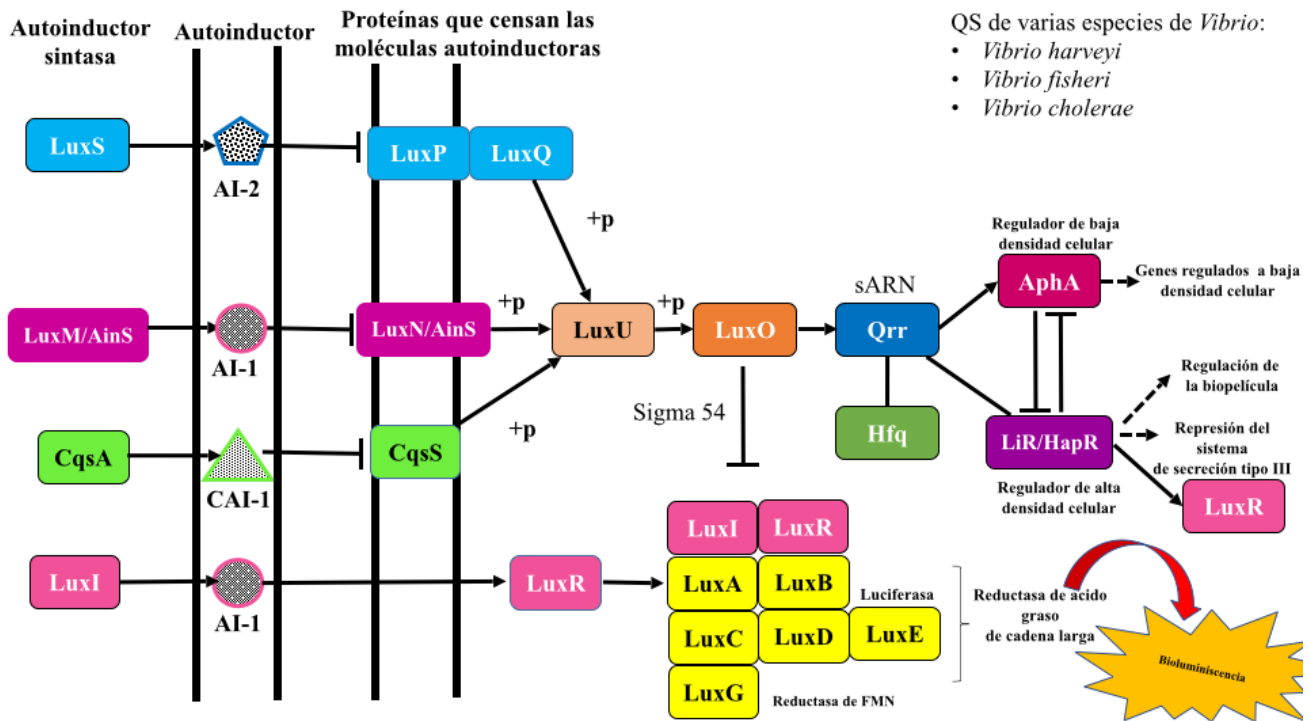
encontrado como ejemplos la biopelícula bioluminiscencia y el SST3 en *V. harveyi* [105]. En el caso de *V. parahaemolyticus* encontrando que el AI-2, la glucosa y el NaCl tienen un efecto en la formación de biopelícula al colonizar al camarón “tigre negro” [106].

Mientras que, en *V. anguillarum* la regulación de los fenotipos como el SST6, la producción de pigmentos, la respuesta al estrés y la producción de metaloproteasas es regulada por el AI-2 [107-110]. Y por otra parte, se ha comprobado que el AI-2 promueve la interacción fago-hospedero observando un aumento en la lisogenia de *Vibrio* [110]. A su vez, *Vibrio* puede defenderse de los fagos mediante el mecanismo de QS, regulando estrategias de defensa por ejemplo contra el fago KVP40 por medio de la producción de biopelículas cuya función es bloquear al receptor del fago *ompK*. Por otro lado, el uso de fagos se ha propuesto como una terapia alternativa contra las especies de *Vibrio* que enferman animales marinos. Finalmente, el QS de *V. anguillarum* regula al SST6, la producción de pigmentos y la respuesta al estrés mediante la producción y sentido del AI-2, destacando la importancia de la molécula señal en patógenos monitoreados en el proceso de la acuicultura [107, 108, 110]. A modo de resumen en la figura 13 se observa el mecanismo molecular del QS de algunas

especies de *Vibrio* en el cual participan 3 moléculas autoinductoras. En este apartado fueron de interés el AI-1 y sus variantes, así como el autoinductor CAI-1 y el AI-2. Así como las enzimas autoinductor sintasa (LuxM/CsqA/LuxI/LuxS) involucradas en el primer paso del mecanismo del QS. Además de los reguladores transcripcionales del QS y los genes que son activados por cada señal autoinductora en *Vibrio*. Así como fue de interés resaltar la importancia de cada regulador maestro de QS en el modelo de *Vibrio* para comprender su mecanismo molecular.

### El mecanismo de QS en *Vibrio* regulado por QseB/KdpE

El sistema QS se encuentra regulado por el sistema de proteínas QseB/KdpE que son proteínas de tipo sensor cinasa que corresponden a un sistema de doble componente como QseF/QseE, involucrado en la regulación de la virulencia y el metabolismo en algunas bacterias Gram-negativas. Este sistema regula la formación del pedestal en las células epiteliales del huésped durante la infección de algunas enterobacterias, regula varios genes metabólicos, genes de virulencia y



**Figura 13.** El Quorum Sensing de algunas especies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. fisheri* y *V. cholerae*), regulado por moléculas autoinductoras (AI-2, AI-1 y CAI-1). Imagen adaptada de la información del KEGG [105].

genes de utilización de hierro. También regula algunos sistemas de doble componente como RcsB/RcsC (involucrado en la síntesis de la cápsula de ácido colánico, la formación de biopelículas, la división celular y la síntesis de proteínas de la membrana externa) y al par de proteínas PhoP/PhoQ (involucrado en la regulación de la expresión de genes implicados en la virulencia, la adaptación a entornos ácidos, de baja concentración de  $Mg^{2+}$  y la resistencia a los péptidos antimicrobianos producidos como defensa por el huésped) [23, 111-113].

El sistema QS regulado por el sistema de proteínas QseB/KdpE depende de las hormonas asociadas al estrés epinefrina (E) y norepinefrina (NE) producidas por los seres humanos. Estas señales activan la transcripción de algunos factores de virulencia y el crecimiento bacteriano por medio del secuestro de hierro del huésped, observando que por ejemplo *V. cholerae* se beneficia de estas hormonas del estrés y posee la proteína cinasa QseC que reconoce a las moléculas N y NE [114].

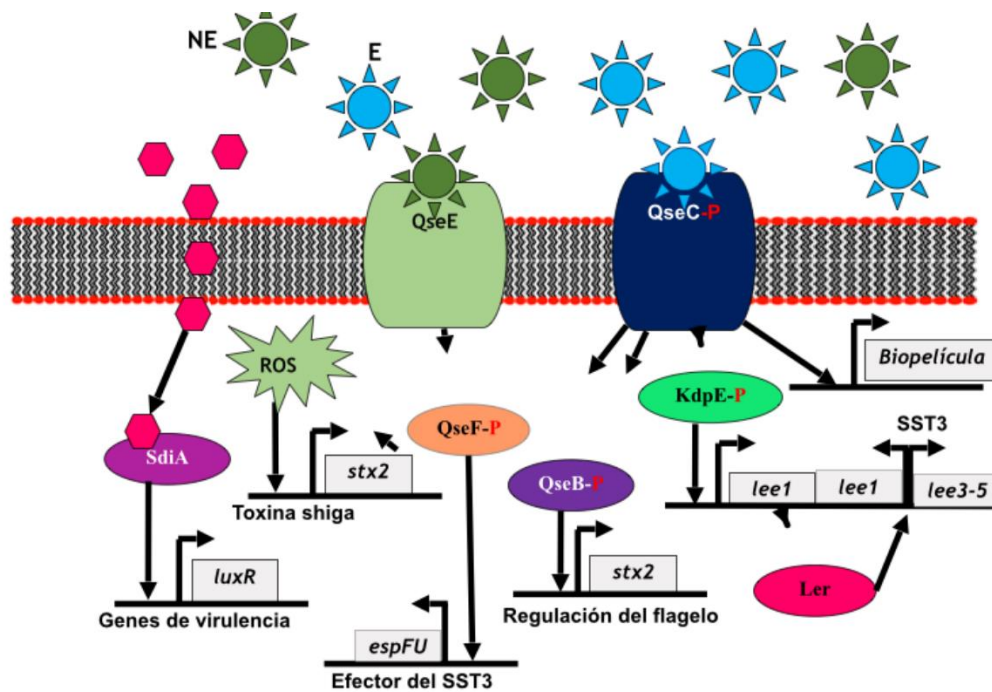
Lo anterior, se dilucidó al observar que *V. cholerae* (el agente causal del cólera), exhibe una respuesta específica a epinefrina y noradrenalina. Lo anterior fue confirmado con un monitoreo de genes por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR). Los

resultados revelaron que existe un aumento de los niveles de transcripción del gen *qseC* y *pomB* (que codifica para un componente estructural del complejo motor del flagelo), bajo la influencia de la E y NE [114]. Además, en *V. parahaemolyticus* por medio de la vía QseC se regulan algunos genes relacionados con la virulencia como es el caso de la producción de pilina del sistema de secreción tipo IV, la movilidad del flagelo, la formación de biopelícula, el sistema de secreción tipo VI y la biosíntesis de la pared celular bacteriana [113]. Además, por medio del análisis de secuencias genómicas en las bases de datos de NCBI, se han encontrado los principales componentes del QS como los genes que codifican para el regulador transcripcional correspondiente al sistema de doble componente QseB (número de acceso; AWB75687), la cinasa-histidínica QseE (número de acceso; SUP35035) y la proteína QseF (número de acceso; QGM33530), confirmando que es posible que el sistema de sensado del AI-3 se encuentre en el género *Vibrio* [23].

Además, se ha descrito el mecanismo de activación de ciertos genes en las enterobacterias por medio de la activación de la cinasa QseC al sensar la E y NE de huéspedes humanos. Para lo cual el mecanismo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se ha descrito y

consiste en que QseC modula el estado de fosforilación del regulador respuesta QseB y posteriormente se une a la región reguladora del flagelo (*flhDC*). En contraste, la desfosforilación de QseB es fundamental para desreprimir al regulón *flhDC* y mantener la expresión génica de la movilidad. También, QseC fosforila a 2 reguladores respuesta (QseF y KdpE), juntos activan la expresión de los genes del sistema de secreción tipo III y el gen de toxina Shiga *stx2* [112]. Asimismo, se ha encontrado que el regulador transcripcional KdpE en la secuencia genómica de *V. cholerae* (número de acceso; A0A0H6EMM7) [115,

116]. Y de esta proteína se sabe que regula un sistema de transducción de señales, ubicado en un operón (KdpABC), el cual es parte de la maquinaria de osmorregulación en *Vibrio* [116]. Finalmente, se ha descubierto que *Vibrio* posee un sistema incompleto de QS del tipo LuxR-solo o SdiA cuya función es detectar al AI-1 exógeno producido por diferentes especies bacterianas y propiciar una comunicación entre especies, así como la activación de genes en respuesta al comportamiento bacteriano. A continuación, en la figura 14 se muestra el mecanismo de QS regulado por QseB, KdpE y SdiA en *Vibrio*.



**Figura 14.** El sistema de QS en *Vibrio* está regulado por la detección de la epinefrina (E), norepinefrina (NE) y el AI-1 (por medio del regulador SdiA). Imagen adaptada de la información obtenida por varios autores [111-113, 117].

## Otras moléculas señal involucradas en la regulación del QS en algunas especies de *Vibrio*

### La etanolamina

Es un metabolito intestinal comúnmente producido por hospederos de bacterias. Algunos estudios han demostrado que la etanolamina interactúa con la proteína cinasa CqsR producida por *V. cholerae* en el dominio de unión al periplasma, inhibiendo la expresión génica de la virulencia en el huésped cuando hay una alta densidad celular [112]. El mecanismo de unión de la etanolamina a la proteína CqsR se ha descrito por medio de la interacción de la etanolamina con el dominio CACHE de la proteína CqsR, que es importancia para la detección y la transducción de señales [118]. Sugiriendo que *V. cholerae* utiliza la cinasa CqsR como un receptor para integrar información obtenida al captar señales. Es decir, sensa la etanolamina exógena como una señal ambiental producida por otras especies con la finalidad de modular los principales factores de virulencia de *V. cholerae* e incluso el comportamiento grupal con otras especies y durante la colonización del hospedero [118].

### Detección de óxido nítrico (NO)

El NO es producido por una gran variedad de células animales como un mecanismo

antibacteriano. Tras la detección de NO, algunas especies bacterianas expresan un conjunto de genes de respuesta para contrarrestar este compuesto tóxico. Por lo que, las proteínas de unión al grupo hemo conocidas como H-NOX, se unen al NO por medio de un dominio hemo de Fe (II). La función del grupo H-NOX es modular la actividad de las cinasas del QS, que se asocian a una cinasa histidínica conocida como HqsK. En *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, la cinasa histidínica se alimenta en los circuitos del QS utilizando a las proteínas LuxPQ, CqsS y LuxN. En ausencia de NO, la cinasa histidínica HqsK fosforila a la proteína LuxO por medio de la proteína LuxU [112]. Lo cual, disminuye la fosforilación de LuxU y LuxO, lo que resulta en la producción de bioluminiscencia en *V. harveyi* [112, 119]. También, se ha descrito que la simbiosis de *V. harveyi* se produce porque el patógeno se adhiere a las superficies de animales marinos para conseguir nutrientes como el órgano emisor de luz bilobulado del calamar brindando bioluminiscencia al hospedero [120]. Para iniciar esta asociación, las células de *V. harveyi* pasan por varias etapas distintas desde la vida libre en el bacterioplancton, hasta la formación de una agregación multicelular cerca de los poros en la superficie del órgano de luz del calamar, pasando por la migración a través de los poros y hacia las criptas profundas en el

órgano de luz, donde la población de simbioses crece y produce luz [120]. Este fenómeno simbiótico modula la colonización simbiótica de *V. fisheri* en el calamar *Euprymna scolope*. Por medio del sensado de NO producido por el calamar, revelando que *V. fisheri* normalmente detecta la molécula señal NO generada por el calamar, por medio de la proteína H-NOX. Con la finalidad de modular la expresión de la capacidad de absorción de hierro durante las primeras etapas de la simbiosis en los órganos de luz del calamar. Sugiriendo que *Vibrio* utiliza la proteína H-NOX como un mecanismo de adaptación de *Vibrio* en su hospedero debido a que la concentración de NO es tóxica para la bacteria [121]. A su vez, se ha descubierto que el NO coordina la expresión de genes de virulencia como la producción de flagelo y la formación de biopelícula. Observando que tanto *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* pueden cambiar su estilo de vida bacteriana, adaptándose a los cambios de las condiciones ambientales. Por medio de pequeñas moléculas como el NO, utilizando el QS e incluso el di-GMPc [119, 122, 123].

Hay que resaltar que el NO promueve la transcripción del gen regulador maestro *opaR* a baja densidad celular. Además de que hay una relación indirecta de NO con los reguladores maestros de QS (AphA, LuxR y LitR), que concluye en la activación de genes bacterianos

como la bioluminiscencia [123]. Cuyo mecanismo se basa en que, a baja densidad celular las dos cinasas (LuxQ y AinR) activan una cascada de fosforilación que va de LuxU a LuxO. Y a su vez, ambas proteínas activan la transcripción del gen *qrr1*, disminuyendo la transcripción del regulador LitR. Esta proteína tiene un papel como regulador positivo que promueve la producción de bioluminiscencia en *V. cholerae* y el ortólogo de LitR conocido como HapR controla la transcripción del gen *dns*, que codifica para una nucleasa que interfiere con la captación de ADN. En comparación con el comportamiento anterior, en alta densidad celular hay una alta producción de autoinductores (1 y 2) como efecto se observa que la actividad enzimática de LuxQ y AinR cambia a fosfatasa, disminuyendo así los niveles de Qrr1 aumentando los niveles de LitR y la producción de bioluminiscencia en *Vibrio* [124].

En conclusión, el sensado del NO es de importancia para *Vibrio* porque permite coordinar su comportamiento como una estrategia para sobrevivir como simbiote en el calamar, en sinergia con el QS [95].

### **Detección del 3,5-dimetil-pirazin-2-ol (DPO)**

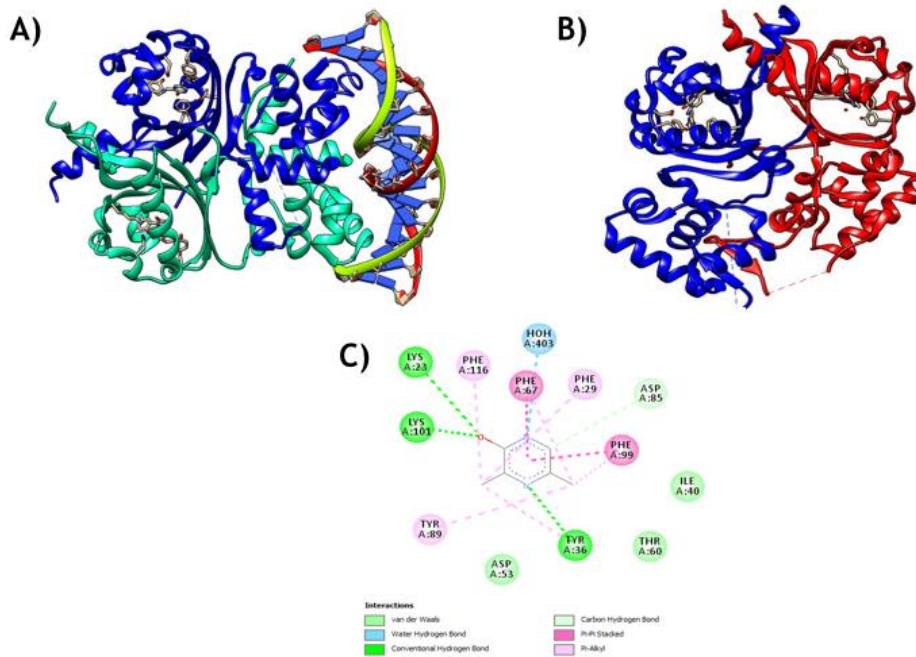
El análisis de las moléculas señal ha demostrado que un grupo hidroxilo y carbonilo

ubicado en la posición 2' del DPO posee un papel biológico importante debido a que asegura la unión VqmA (un regulador transcripcional de QS) [130]. Al comparar la estructura química del DPO se encontró que utiliza sustratos de síntesis parecidos a su homólogo el AI-3 descrito por Sperandio y cols [112]. La molécula del DPO puede formar un complejo con el regulador VqmA, el cual posee un dominio de unión al ADN y regula el mecanismo de QS activando algunos genes bacterianos en *Vibrio* (figura 15A) [129]. El mecanismo de regulación se basa en que el regulador VqmA sensa la molécula DPO, activando la transcripción de *vqmR*, que codifica para un ARN pequeño. Su función es reprimir los genes necesarios para la formación de biopelícula y la producción de toxinas del tipo Rtx. Por medio de la represión del regulador transcripcional de unión al ADN (VpsT) [12, 19, 129, 125]. Gracias al análisis de genomas se ha encontrado que el sistema de QS del patógeno *V. cholerae* y *E. coli* son parecidos debido a que presentan muchas de las proteínas y reguladores que conforman el sistema QS como la proteína VqmA, la cual se une al ADN activando algunos genes en respuesta al QS [12, 112].

De acuerdo con recientes estudios en *V. cholerae*, se ha encontrado que VqmA activa la transcripción del gen *vqmR* a nivel basal en

ausencia del DPO. Y la actividad transcripcional de VqmA aumenta en respuesta a concentraciones crecientes del DPO, lo que permite que VqmA impulse la transición de detección de quórum [125]. A su vez, estudios adicionales de cristalización del regulador VqmA revelaron que la proteína posee un dominio homodímero (PAS) en el N-terminal y un dominio de unión al ADN en el C-terminal. Se ha concluido que la proteína VqmA se une directamente a una molécula de DPO por medio de un bolsillo hidrofóbico compacto en la proteína, que consta de una hoja  $\beta$  antiparalela de seis hebras y varias hélices  $\alpha$  como se observa en la figura 15B bajo un modelo de lazos y listones [126].

Otro elemento importante es que el dímero del regulador VqmA interactúa con la secuencia cuasi-palindrómica del promotor del gen *vqmR* utilizando el dominio de unión al ADN. Adicionalmente, los estudios de cristalización y acoplamiento molecular han permitido vislumbrar que los residuos aminoacídicos como Phe-67 y Lys-101 ubicados en la proteína reguladora VqmA juegan un papel clave en el reconocimiento de moléculas (figura 15C) [126]. Además, se ha encontrado que la proteína VqmA permite la unión del fago VP882 y utiliza el QS para infectar a *V. cholerae* manipulando la biología de la bacteria utilizando un receptor de QS conocido como



**Figura 15.** (A) Estructura cristalina que representa la unión del regulador VqmA con el ADN [129]. El PDB de la proteína corresponde al código 6IDE y las imágenes fueron visualizadas en USF chimera [127, 128]. (B) Unión del regulador VqmA-DPO obtenido de los estudios experimentales de [129, 130]. El PDB de la proteína corresponde al código 6KJU. (C) Representa la interacción ligando-proteína del complejo VqmA-DPO. Las imágenes fueron visualizadas en USF chimera y Discovery studio, 2020 [127, 128].

VqmA<sub>Phage</sub>, [126]. Por lo que es de importancia conocer los mecanismos por los cuales el fago infecta a *Vibrio* para combatir la virulencia causada por el microorganismo, ya que los fagos son ampliamente utilizados como terapia en la acuicultura [126].

El mecanismo de sensado de la etanolamina, el NO y el DPO, así como su relación con el QS de *Vibrio* se observa en la figura 16, mostrando que la etanolamina y DPO entran a la célula mediante difusión pasiva. Para lo anterior, la etanolamina necesita de la proteína

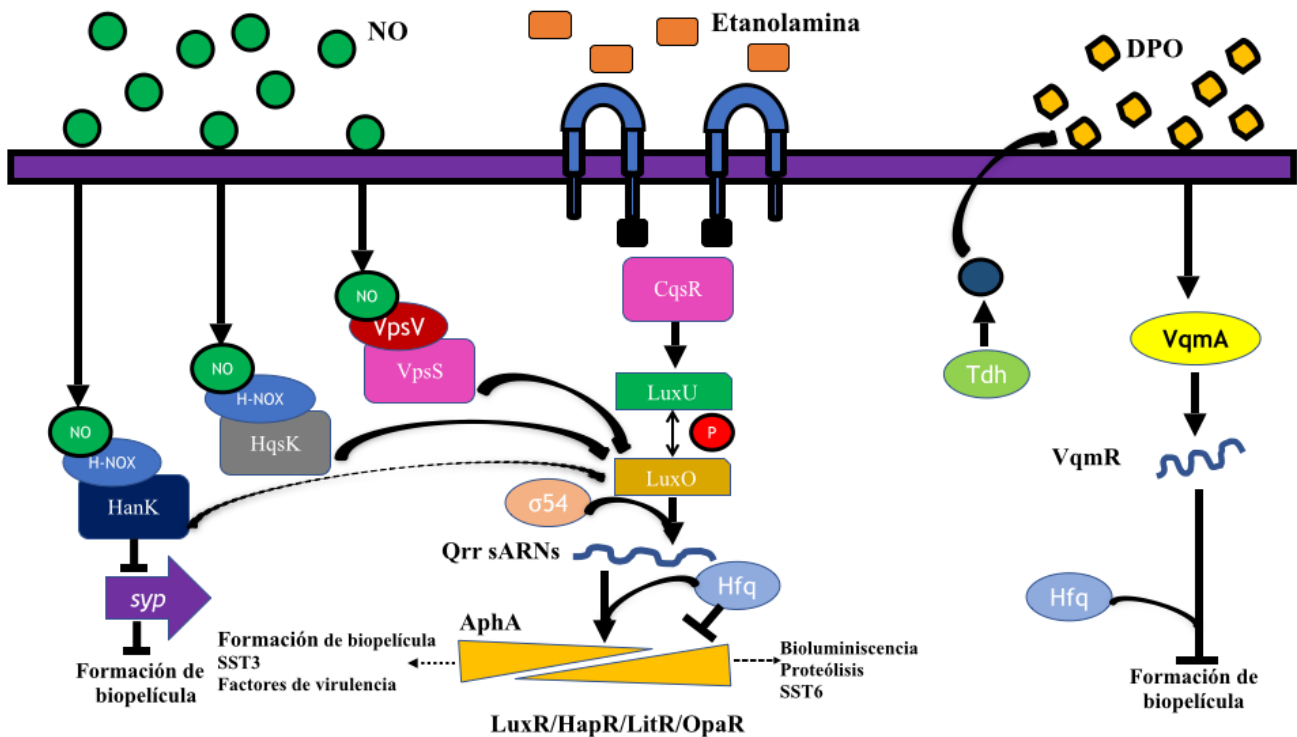
transmembranal CqsR para activar a la proteína LuxU y posteriormente se inicie una cascada de regulación por medio de los Qrr. Activando a los reguladores maestros de QS (AphA, LuxR, LitR y OpaA) cuya función es activar genes a baja y alta densidad celular, de acuerdo con las necesidades de la bacteria. Mostrando que a baja densidad celular se activan los genes de la biopelícula, los factores de virulencia y el sistema de secreción tipo III. En alta densidad celular se activan genes como la bioluminiscencia y el sistema de secreción tipo

VI. Mientras que, el DPO se une al regulador VqmA para activar al ARN regulador VqmR y a su vez se observa que Hfq regula negativamente los genes de la síntesis de la biopelícula [112].

Finalmente, se ha descrito que el DPO forma complejos con la proteína VqmA<sub>Phage</sub>, para intervenir el sistema QS del huésped mediante la unión tanto al DPO producido por el huésped como a su promotor afín (Pqtip) para inducir la transición de lisogenia a lisis del fago. Mientras que VqmA no puede influir en la vía inducida por VqmA<sub>Phage</sub>, lo que sugiere una regulación asimétrica [112, 129].

### cFP: Ciclo-(L-Phe-L-Pro)

La molécula cFP es una dicetopiperazina o autoinductor producido por *Vibrio*. El cFP es una molécula difusible que no requiere energía ni maquinaria de membrana para transportarse por la membrana bacteriana. El autoinductor cFP alcanza niveles máximos de concentración cuando las células entran en fase estacionaria y a su vez, desencadena la expresión de una serie de genes asociados con la patogenicidad de *Vibrio* [130, 131].



**Figura 16.** Mecanismo de co-regulación de la activación de genes de QS en *Vibrio* por el sentido de la etanolamina, NO y DPO. Imagen adaptada de Barrasso *et al.*, 2020 [112].

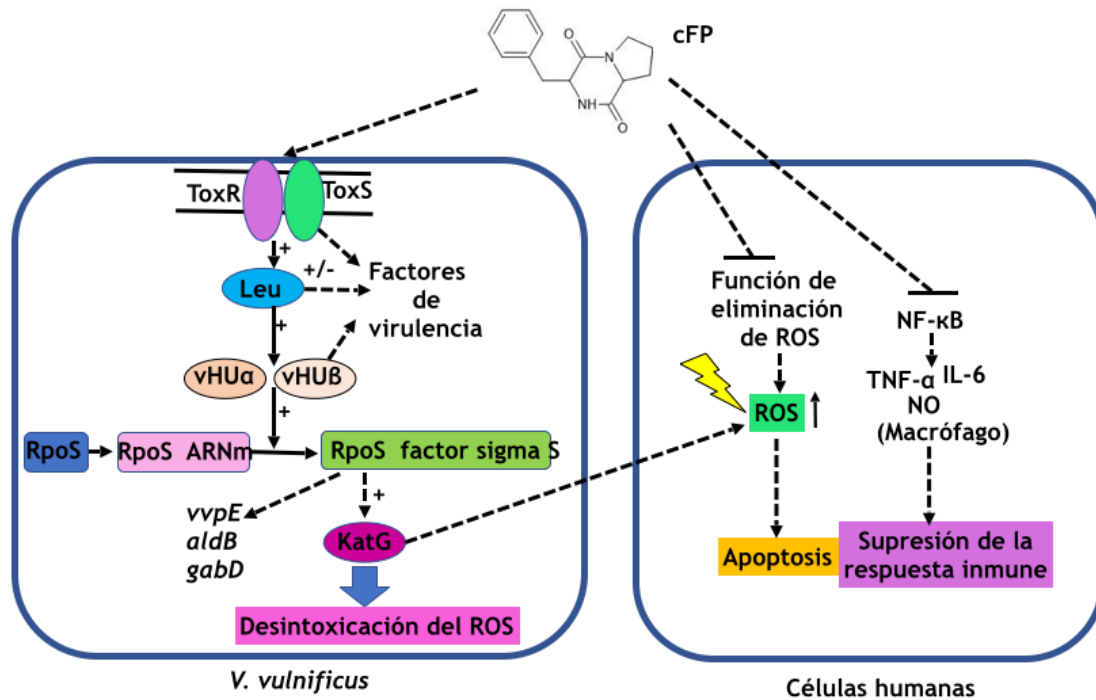
La molécula cFP posee varias actividades biológicas como: antibacteriana, antifúngica, puede inducir la diferenciación de tipo intestinal de células de carcinoma de colon humano, inhibe a las topoisomerasas de ADN bacteriano e induce la apoptosis en células con cáncer de colon. Además, inhibe la producción de interferón (IFN)- $\beta$  al inducir un cambio conformacional en el gen inducible por ácido retinoico (RIG-I), afectando la respuesta inmune innata que causa la apoptosis de líneas celulares humanas al elevar los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas características sugieren que la cFP no es solo una molécula de señalización, sino que también actúa como un factor de virulencia en *Vibrio* [130, 131].

Estudios recientes en *Vibrio* han ayudado a descubrir que la proteína estructural nucleoide del tipo histona (H-NS), puede reprimir la expresión del regulador maestro de la vía de señalización de cFP conocido como LeuO al unirse directamente en la región ubicada río arriba del gen *leuO* [131]. Además, existe un mecanismo de activación de genes de virulencia en *Vibrio*, cuyo mecanismo de señalización inicia mediante el sensado de la molécula cFP y se desencadena la activación de una vía de transducción de señales en el patógeno *Vibrio* por medio del complejo de proteínas ToxR-LeuO-vHU. Esta cascada de señalización inicia

con la unión del ARNm con el factor sigma alterno RpoS que a su vez, induce la transcripción del gen *katG* que codifica una peroxidasa que desintoxica y protege al patógeno *Vibrio* del ROS producidas por el huésped. En la figura 17, se representa la estructura química del autoinductor cFP y el mecanismo de respuesta en *V. vulnificus* al sensar las ROS producidas por las células humanas [131].

## CONCLUSIONES

El presente estudio describió los hallazgos en el género *Vibrio* con respecto a los mecanismos de QS, la regulación de ciertos procesos bacterianos relacionados con la virulencia. A la fecha, el mecanismo de QS en *Vibrio* está encargado de sensar moléculas autoinductoras con la finalidad de activar a los reguladores transcripcionales de QS a baja y alta densidad celular (AphA, LuxR, LitR y OpaA). Y además de regular fenotipos bacterianos, que en su mayoría son factores de virulencia como la producción de toxinas, los sistemas de secreción (3, 4 y 6), la biopelícula, la producción de metaloproteasas, la movilidad y la defensa de *Vibrio* en contra de algunos fagos. A su vez, se ha dilucidado por medio de diferentes estudios, que *Vibrio* posee el sistema de señalización dominado por el par de cinasas histidínicas QseC y QseE, que en respuesta a las



**Figura 17.** Mecanismo de activación de factores de virulencia y respuesta a las ROS por medio del autoinductor cFP en *V. vulnificus* [130]. Abreviaturas. ToxR (regulador de la toxina del cólera), ToxS (regulador transmembranal que interactúa con ToxR), vHU $\alpha$  y vHU $\beta$  (proteínas similares a las histonas), vvpE (gen que codifica para una metaloproteína), aldB (gen que codifica para la alfa-acetolactato descarboxilasa), gabD (gen que codifica para la succinato-semialdehído deshidrogenasa), LeuO (activador transcripcional de leucina del tipo LysR), NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células  $\beta$  activadas), TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) y IL-6 (interleucina-6).

moléculas noradrenalina, epinefrina y el AI-3, activan genes de virulencia. Este sistema se caracteriza porque es muy parecido al de las enterobacterias porque posee reguladores homólogos a QseB, QseF y KdpE. También, se han dilucidado nuevos mecanismos de QS relacionados con el sensado de moléculas señal como el caso de la respuesta a los cambios de concentración del NO producido por animales, cuya función es regular la expresión de genes de virulencia como la producción del flagelo y

la biopelícula. Además de la modulación de la colonización simbiótica al responder a la etanolamina, producida por el hospedero. Con la finalidad de atraer a la especie *Vibrio* por quimiotaxis y el sensado de moléculas autoinductoras mediante una comunicación entre reinos. Por último, la molécula cFP es una molécula de señalización, que participa en la activación de la virulencia en *Vibrio* y como un factor de virulencia porque inhibe la producción de interferón (IFN)- $\beta$  en humanos impidiendo

la producción de ROS. Demostrando que el sistema de QS se dirige principalmente por 10 moléculas señal que participan en la regulación de múltiples factores de virulencia en *Vibrio*. Y a su vez, son co-regulados por múltiples proteínas y reguladores de QS, ya sea a baja y alta densidad celular. Observando que hay una regulación de los genes durante las diferentes fases del crecimiento de *Vibrio*, que son dependientes de la detección de quórum y de múltiples reguladores. Encontrando que *Vibrio* ajusta la expresión de sus genes para responder al estrés al expresar el SST6, el QS, las ROS y la producción de biopelícula. Obteniendo una gran variedad de vías de regulación positiva y negativa de los factores de virulencia de *Vibrio*. Incluso se ha obtenido más información sobre los genes de virulencia regulados a baja densidad celular por el regulador maestro AphA y la co-regulación de ciertos genes con los homólogos de LuxR.

Además, se han descrito múltiples vías de QS que son reguladas por las moléculas señal como las mencionadas en el presente trabajo. Con el objeto de dar importancia a los mecanismos de regulación de los factores de virulencia, porque hasta ahora, se desconocen las formas en que muchas moléculas de señalización de QS producidas por la microbiota intestinal se comunican con los patógenos como *Vibrio*, lo que dificulta encontrar moléculas novedosas

que apaguen el quórum para reducir la patogenicidad de las variantes de *Vibrio*. Por ello es de importancia conocer los componentes moleculares del QS de *Vibrio* que ya están descritos y los nuevos, ya que pueden ser blanco molecular de inhibidores de QS para disminuir o atenuar la virulencia de *Vibrio*, en especial, porque es un patógeno de animales marinos de consumo humano y se reportan personas que han enfermado por consumo de productos contaminados por *Vibrio*.

## CONFLICTO DE INTERESES

La autora declara que no tiene conflicto de intereses.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Martín Pérez Santos por su valioso trabajo y enseñanzas para el desarrollo de este proyecto.

## REFERENCIAS

- [1]. Metzger LC, Matthey N, Stoudmann C, Collas EJ, Blokesch M. Ecological implications of gene regulation by TfoX and TfoY among diverse *Vibrio* species. *Environ Microbiol.* 2019; 21(7):2231-2247.
- [2]. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970;

104(1):313-322.

[3]. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 1979; 43(4):496–518.

[4]. Bansal T, Jesudhasan P, Pillai S, Wood TK, Jayaraman A. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008; 78(5):811-819.

[5]. Stevens AM, Greenberg EP. Quorum Sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol.* 1997; 179(2):557-562.

[6]. Ohtani K, Yuan Y, Hassan S, Wang R, Wang Y, Shimizu T. Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol.* 2009; 191(12):3919-3927.

[7]. Bai AJ, Rai VR. Bacterial Quorum Sensing and food industry. *Compr Rev Food Sci f.* 2011; 10(3):183-193.

[8]. Høyland-Kroghsbo NM, Mærkedahl RB, Svenningsen SL. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio.* 2013; 4(1):1-8.

[9]. Taghadosi R, Shakibaie MR, Masoumi S. Biochemical detection of N-Acyl homoserine lactone from biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection samples. *Rep Biochem Mol Biol.*

2015; 3(2):56–61.

[10]. Laganenka L, Colin R, Sourjik V. Chemotaxis towards autoinducer 2 mediates autoaggregation in *Escherichia coli*. *Nat Commun.* 2016; 7(1):1-11.

[11]. Patterson AG, Jackson SA, Taylor C, Evans GB, Salmond G, Przybilski R, Fineran PC. Quorum Sensing controls adaptive immunity through the regulation of multiple CRISPR-Cas systems. *Mol cell.* 2016; 64(6):1102-1108.

[12]. Papenfort K, Silpe JE, Schramma, KR, Cong JP, Seyedsayamdost MR, Bassler BL. A *Vibrio cholerae* autoinducer–receptor pair that controls biofilm formation. *Nat Chem Biol.* 2017; 13(5):551-557.

[13]. Gibbs KA, Federle MJ. A social medium: ASM's 5th Cell-Cell communication in bacteria meeting in Review. *J Bacteriol.* 2015; 197(13):2084-2091.

[14]. Rajput A, Kaur K, Kumar M. SigMol: repertoire of Quorum Sensing signaling molecules in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(1):634-639.

[15]. Reading NC, Sperandio V. Quorum Sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 254(1):1-11.

[16]. Lade H, Paul D, Kweon JH. Quorum quenching mediated approaches for control of membrane biofouling. *Int J Biol Sci.* 2014;

10(5):550–565.

[17]. Federle MJ, Bassler BL. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Investig.* 2003; 112(9):1291-1299

[18]. Ahlgren NA, Harwood CS, Schaefer AL, Giraud E, Greenberg EP. Aryl-homoserine lactone Quorum Sensing in stem-nodulating photosynthetic bradyrhizobia. *PNAS.* 2011; 108(17): 7183-7188.

[19]. Papenfort K, Förstner KU, Cong JP, Sharma CM, Bassler BL. Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *PNAS.* 2015; 112(7):766-775.

[20]. Gessler NN, Filippovich SY, Bachurina GP, Kharchenko EA, Groza NV, Belozerskaya TA. Oxylipins and oxylipin synthesis pathways in fungi. *Appl Biochem Microbiol.* 2017; 53(6):628-639.

[21]. Rodrigues CF, Černáková L. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. *Genes.* 2020; 11(4):1-5.

[22]. Kunjapur AM, Hyun JC, Prather K L. Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli de novo* vanillin biosynthesis pathway. *Microb Cell Factories.* 2016; 15(1):1-17.

[23]. Park H, Park S, Yang YH, Choi KY.

Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2021; 14(6):1-23.

[24]. Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Givskov M. Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiol.* 2002;148(1):87-102.

[25]. Manefield M, Rasmussen TB, Hentzer M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. Halogenated furanones inhibit Quorum Sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiol.* 2002;148(4):1119-1127.

[26]. Galloway WR, Hodgkinson JT, Bowden S, Welch M, Spring DR. Applications of small molecule activators and inhibitors of Quorum Sensing in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2012; 20(9):449-458.

[27]. Lilley BN, Bassler BL. Regulation of Quorum Sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol Microbiol.* 2000; 36(4):940-954.

[28]. Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C. UniProt protein knowledgebase. *Prot Bioinform.* 2017:41-55.

[29]. Ulrich DL, Kojetin D, Bassler BL, Cavanagh J, Loria JP. Solution structure and dynamics of LuxU from *Vibrio harveyi*, a phosphotransferase protein involved in

bacterial Quorum Sensing. *J Mol Biol.* 2005; 347(2): 297-307.

[30]. Freeman JA, Lilley BN, Bassler BL. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates Quorum Sensing in *Vibrio harveyi*. *Mol Microbiol.* 2000; 35(1):139-149.

[31]. Neiditch MB, Federle MJ, Miller ST, Bassler BL, Hughson FM. Regulation of LuxPQ receptor activity by the quorum-sensing signal autoinducer-2. *Mol Cell.* 2005; 18(5):507-518.

[32]. Boyaci H, Shah T, Hurley A, Kokona B, Li Z, Ventocilla C, Hughson FM. Structure, regulation, and inhibition of the quorum-sensing signal integrator LuxO. *PLoS Biol.* 2016;14(5):1-20.

[33]. Feng L, Rutherford ST, Papenfort K, Bagert JD, Van Kessel JC, Tirrell DA, Bassler BL. A *qrr* noncoding RNA deploys four different regulatory mechanisms to optimize quorum-sensing dynamics. *Cell.* 2015; 160:228-240.

[34]. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23(21):2947-2948.

[35]. Hunter GA, Keener JP. Mechanisms underlying the additive and redundant Qrr phenotypes in *Vibrio harveyi* and *Vibrio*

*cholerae*. *J Theor Biol.* 2014; 340:38-49.

[36]. Svenningsen SL, Tu KC, Bassler BL. Gene dosage compensation calibrates four regulatory RNAs to control *Vibrio cholerae* Quorum Sensing. *EMBO J.* 2009;28(4):429-439.

[37]. Tu KC, Bassler BL. Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control Quorum Sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev.* 2007;21(2):221-233.

[38]. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547–1549.

[39]. Wen Y, Kim IH, Kim KS. Iron-and quorum-sensing signals converge on small quorum-regulatory RNAs for coordinated regulation of virulence factors in *Vibrio vulnificus*. *J Biol Chem.* 2016; 291(27):14213-14230.

[40]. Bridges AA, Bassler BL. The intragenus and interspecies quorum-sensing autoinducers exert distinct control over *Vibrio cholerae* biofilm formation and dispersal. *PLoS Biol.* 2019;17(11):1-28.

[41]. Eickhoff MJ, Fei C, Huang X, Bassler BL. LuxT controls specific quorum-sensing-regulated behaviors in *Vibrionaceae* spp. via repression of *qrr1*, encoding a small regulatory RNA. *PLoS Genet.* 2021;17(4):1-29.

- [42]. Deng Y, Chen C, Zhao Z, Zhao J, Jacq A, Huang, X, Yang Y. The RNA chaperone Hfq is involved in colony morphology, nutrient utilization and oxidative and envelope stress response in *Vibrio alginolyticus*. PLoS One. 2016;11(9): 1-21.
- [43]. Zhao Y, Ren J, Jiang H, Chen X, Xu M, Li Y, Liu H. Metabolomics and lipidomics analyses delineating Hfq deletion-induced metabolic alterations in *Vibrio alginolyticus*. Aquac. 2021; 535(30):19-24.
- [44]. De Silva RS, Kovacicova G, Lin W, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ. Crystal structure of the virulence gene activator AphA from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily. J Biol Chem. 2005; 280(14):13779-13783.
- [45]. Van Kessel JC, Rutherford ST, Shao Y, Utria AF, Bassler BL. Individual and combined roles of the master regulators AphA and LuxR in control of the *Vibrio harveyi* quorum-sensing regulon. J Bacteriol. 2013; 195(3):436-443.
- [46]. Kovacicova G, Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by Quorum Sensing: HapR functions at the aphA promoter. Mol Microb. 2022; 46(4): 1135-1147.
- [47]. Zheng J, Shin OS, Cameron, DE, Mekalanos JJ. Quorum Sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. PNAS. 2010; 107(49):21128-21133.
- [48]. Liu X, Pan J, Gao H, Han Y, Zhang A, Huang Y, Liang W. CqsA/LuxS-HapR Quorum Sensing circuit modulates type VI secretion system VflSST62 in *Vibrio fluvialis*. Emerg Microbes Infec. 2021; 10(1):589-601.
- [49]. Joshi A, Kostiuik B, Rogers A, Teschler J, Pukatzki S, Yildiz FH. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. Trends Microbiol. 2017; 25(4):267-279.
- [50]. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Bryant SH. The NCBI biosystems database. Nucleic Acids Res. 2010; 38(1):492-496.
- [51]. Hao B, Mo ZL, Xiao P, Pan HJ, Lan X, Li GY. Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation, and virulence. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(6):2575-2585.
- [52]. Sheng L, Gu D, Wang Q, Liu Q, Zhang Y. Quorum Sensing and alternative sigma factor RpoN regulate type VI secretion system I (T6SSVA1) in fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. Arch Microbiol. 2012; 194(5): 379-390.
- [53]. Miyata ST, Kitaoka M, Wieteska L, Frech C, Chen N, Pukatzki, S. The *Vibrio cholerae*

type VI secretion system: evaluating its role in the human disease cholera. *Front Microbiol.* 2010;1:117.

[54]. Pérez-Reytor D, Plaza N, Espejo RT, Navarrete P, Bastías R, Garcia K. Role of non-coding regulatory RNA in the virulence of human pathogenic *Vibrios*. *Front Microbiol.* 2017; 7(2160):1-13.

[55]. Zhang Y, Hu L, Osei-Adjei G, Zhang Y, Yang W, Yin Z, Zhou D. Autoregulation of ToxR and its regulatory actions on major virulence gene loci in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018; 8:1-12.

[56]. Gao H, Zhang J, Lou J, Li J, Qin Q, Shi Q, Kan B. Direct binding and regulation by Fur and HapR of the intermediate regulator and virulence factor genes within the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2020; 11:1-12.

[57]. Bachmann, V, Kostiuk B, Unterweger D, Diaz-Satizabal L, Ogg S, Pukatzki S. Bile salts modulate the mucin-activated type VI secretion system of pandemic *Vibrio cholerae*. *PLOS Negl Trop Dis.* 2015; 9(8): 1-22.

[58]. Ho BT, Fu Y, Dong TG, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* type 6 secretion system effector trafficking in target bacterial cells. *PNAS.* 2017; 114(35):9427-9432.

[59]. Página del administracion de Drogas y alimentos (FDA). Sitio web:

<https://www.fda.gov/>. Página visitada en junio del 2021.

[60]. Página del centro de control de enfermedades (CDC). Sitio web: <https://www.cdc.gov/>. Página revisada en mayo del 2021.

[61]. Hernández-Cabanyero C, Sanjuán E, Fouz B, Pajuelo D, Vallejos-Vidal E, Reyes-López FE, Amaro C. The effect of the environmental temperature on the adaptation to host in the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Front Microbiol.* 2020; 11:489.

[62]. Yan J, Sharo AG, Stone HA, Wingreen NS, Bassler BL. *Vibrio cholerae* biofilm growth program and architecture revealed by single-cell live imaging. *PNAS.* 2016; 113(36):5337-5343.

[63]. Drescher K, Dunkel J, Nadell CD, Van Teeffelen S, Grnja I, Wingreen NS, Bassler BL. Architectural transitions in *Vibrio cholerae* biofilms at single-cell resolution. *PNAS.* 2016; 113(14):2066-E2072.

[64]. De Silva RS, Kovacicova G, Lin, W, Taylor RK, Skorupski K, Kull FJ. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J Bacteriol.* 2007; 189(15):5683-5691.

[65]. Haycocks J, Warren G, Grainger D. AphA is a master regulator of natural competence in *Vibrio cholerae*. *Access Microbiol.*

2019;1(1A):309.

[66]. Beyhan S, Bilecen K, Salama SR, Casper-Lindley C, Yildiz FH. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of *vpsT*, *vpsR*, and *hapR*. *J Bacteriol Res.* 2007; 189(2):388-402.

[67]. Gao H, Xu J, Lu X, Li J, Lou J, Zhao H, Kan B. Expression of hemolysin is regulated under the collective actions of HapR, Fur, and HlyU in *Vibrio cholerae* El Tor serogroup O1. *Front Microbiol.* 2018; 9:1-11.

[68]. Fidopiastis PM, Miyamoto CM, Jobling MG, Meighen EA, Ruby EG. LitR, a new transcriptional activator in *Vibrio fischeri*, regulates luminescence and symbiotic light organ colonization. *Mol Microbiol.* 2002; 45(1):131-143.

[69]. Rzhetsky A, Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol.* 1992; 9:945-967.

[70]. Zuckerkandl E, Pauling L. Evolutionary divergence and convergence in proteins. In *evolving genes and proteins*. Aca Press. 1965: 97-166.

[71]. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.

[72]. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing

phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4:406-425.

[73]. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci.* 1992; 8:275-282.

[74]. Dial CN, Eichinger SJ, Foxall R, Corcoran CJ, Tischler AH, Bolz RM, Visick KL. Quorum Sensing and Cyclic di-GMP Exert Control Over Motility of *Vibrio fischeri* KB2B1. *Front Microbiol.* 2021; 12:1-17.

[75]. Hansen H, Bjelland AM, Ronessen M, Robertsen E, Willassen, NP. LitR is a repressor of *syp* genes and has a temperature-sensitive regulatory effect on biofilm formation and colony morphology in *Vibrio (Aliivibrio) salmonicida*. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80(17):5530-5541.

[76]. Miller MB, Bassler BL. Quorum Sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55(1):165-199.

[77]. Czajkowski R, Jafra S. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent Quorum Sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochim Pol.* 2009; 56(1):1-16.

[78]. Heckler I, Boon EM. Insights into nitric oxide modulated Quorum Sensing pathways. *Front Microbiol.* 2019; 10(2174):1-8.

[79]. Smith JL, Fratamico PM, Novak JS.

Quorum Sensing: a primer for food microbiologists. *J Food Prot.* 2004; 67(5):1053-1070.

[80]. Rajamanikandan S, Srinivasan P. Exploring the selectivity of auto-inducer complex with LuxR using molecular docking, mutational studies and molecular dynamics simulations. *J Mol Struct.* 2017; 1131:281-293.

[81]. Podbielski A, Kreikemeyer B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis.* 2004; 8(2):81-95.

[82]. Dirix G, Monsieurs P, Dombrecht B, Daniels R, Marchal K, Vanderleyden J, Michiels J. Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide *in silico* screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides.* 2004; 25(9):1425-1440.

[83]. Bandara HMHN, Lam OLT, Jin LJ, Samaranyake L. Microbial chemical signaling: a current perspective. *Crit Rev Microbiol.* 2012; 38(3):217-249.

[84]. Purohit AA, Johansen JA, Hansen, H, Leiros HK, Kashulin A, Karlsen C, Willassen NP. Presence of acyl-homoserine lactones in 57 members of the *Vibrionaceae* family. *J Appl Microbiol.* 2013; 115(3):835-847.

[85]. Valiente E, Bruhn JB., Nielsen K., Larsen

JL, Roig FJ, Gram L, Amaro C. *Vibrio vulnificus* produces Quorum Sensing signals of the AHL-class. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009; 69(1):16-26.

[86]. Tan PW, Tan WS, Yunos NYM, Mohamad NI, Adrian TGS, Yin WF, Chan KG. Short chain N-acyl homoserine lactone production in tropical marine *Vibrio sinaloensis* strain T47. *Sensors.* 2014; 14(7):12958-12967.

[87]. Liu J, Fu K, Wang Y, Wu C, Li F, Shi L, Zhou L. Detection of diverse N-acyl-homoserine lactones in *Vibrio alginolyticus* and regulation of biofilm formation by N-(3-oxodecanoyl) homoserine lactone *in vitro*. *Front Microbiol.* 2017; 8(1097):1-15

[88]. Wang Y, Wang H, Liang W, Hay AJ, Zhong Z, Kan B, Zhu J. Quorum Sensing regulatory cascades control *Vibrio fluvialis* pathogenesis. *J Bacteriol.* 2013;195(16):3583-3589.

[89]. Hubert C. Characterising the role of *Vibrio vulnificus* type 6 secretion systems 1 and 2 in an *in vivo* oyster model. Revisado en 2-6-2021. Sitio web: <http://hdl.handle.net/10871/122848>.

[90]. Ha C, Kim SK, Lee MN, Lee JH. Quorum Sensing-dependent metalloprotease VvpE is important in the virulence of *Vibrio vulnificus* to invertebrates. *Microb Pathog.* 2014; 71(72):8-14.

- [91]. García-Aljaro C, Melado-Rovira S, Milton DL, Blanch AR. Quorum-sensing regulates biofilm formation in *Vibrio scophthalmi*. BMC Microbiol. 2012; 12(1):1-9.
- [92]. Pérez PD, Weiss JT, Hagen SJ. Noise and crosstalk in two quorum-sensing inputs of *Vibrio fischeri*. BMC Syst Biol. 2011; 5(1):1-14.
- [93]. Chong G, Kimyon Ö, Manefield M. Quorum Sensing signal synthesis may represent a selective advantage independent of its role in regulation of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. PloS one. 2013; 8(6):1-8.
- [94]. Wen Y, Kim IH, Son JS, Lee BH, Kim KS. Iron and Quorum Sensing coordinately regulate the expression of vulnibactin biosynthesis in *Vibrio vulnificus*. J Biol Chem. 2012; 287(32):26727-26739.
- [95]. Ivanova K, Fernandes MM, Tzanov T. Strategies for silencing bacterial communication. In Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight. Springer. 2015:197-216.
- [96]. Horinouchi S, Ueda K, Nakayama J, Ikeda T. Cell-to-cell communications among microorganisms. in Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. 2010(4): 283-337.
- [97]. Kang SY, Lee JK, Jang JH, Hwang BY, Hong YS. Production of phenylacetyl-homoserine lactone analogs by artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact. 2015; 14(1):1-10.
- [98]. Kang SY, Lee JK, Jang JH, Hwang BY, Hong YS. Production of phenylacetyl-homoserine lactone analogs by artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. Microb Cell Fact. 2015; 14(1):1-10.
- [99]. Caspi R, Altman T, Billington R, Dreher K, Foerster H, Fulcher CA, Karp PD. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome Databases. Nucleic Acids Res. 2014; 42(1):459-471.
- [100]. Wu K, Zheng Y, Wu Q, Chen H, Fu S, Kan B, Tu J. *Vibrio parahaemolyticus* cqsA controls production of Quorum Sensing signal molecule 3-hydroxyundecan-4-one and regulates colony morphology. J Microbiol. 2019; 57(12):1105-1114.
- [101]. Bassler BL. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. Cell. 2002; 109(4):421-424.
- [102]. Sun J, Daniel R, Wagner-Döbler, I, Zeng AP. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. BMC Evol Biol. 2004; 4(1): 1-11.
- [103]. Almeida O, Vitulo N, De Martinis E,

Felis GE. Pangenome analyses of LuxS-coding genes and enzymatic repertoires in cocoa-related lactic acid bacteria. *Genomics*. 2021; 113(4): 1659-1670.

[104]. Bux K, Hofer TS, Moin ST. Exploring interfacial dynamics in homodimeric S-ribosylhomocysteine lyase (LuxS) from *Vibrio cholerae* through molecular dynamics simulations. *RSC Adv*. 2021; 11(3):1700-1714.

[105]. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(1):27-30.

[106]. Mizan MFR, Ashrafudoulla M, Sadekuzzaman M, Kang I, Ha SD. Effects of NaCl, glucose, and their combinations on biofilm formation on black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) surfaces by *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Control*. 2018; 89:203-209.

[107]. Weber B, Hasic M, Chen C, Wai SN, Milton DL. Type VI secretion modulates Quorum Sensing and stress response in *Vibrio anguillarum*. *Environ Microbiol*. 2009; 11(12):3018-3028.

[108]. Tan D, Svenningsen SL, Middelboe M. Quorum Sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. *MBio*. 2015; 6(3):1-10.

[109]. Li X, Dierckens K, Bossier P, Defoirdt T. The impact of Quorum Sensing on the

virulence of *Vibrio anguillarum* towards gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquac Res*. 2018; 49(11):3686-3689.

[110]. Tan D, Hansen MF, de Carvalho, LN, Røder HL, Burmølle M, Middelboe M, Svenningsen SL. High cell densities favor lysogeny: induction of an H20 prophage is repressed by Quorum Sensing and enhances biofilm formation in *Vibrio anguillarum*. *The ISME J*. 2020; 14(7):1731-1742.

[111]. De Nisco NJ, Rivera-Cancel G, Orth K. The biochemistry of sensing: enteric pathogens regulate type III secretion in response to environmental and host cues. *MBio*. 2018; 9(1):1-15.

[112]. Barrasso K, Watve S, Simpson CA, Geyman LJ, Van Kessel JC, Ng WL. Dual-function quorum-sensing systems in bacterial pathogens and symbionts. *PLoS Pathog*. 2020; 16(10):1-7.

[113]. Yang Q, Zou P, Cao Z, Wang Q, Fu S, Xie G, Huang J. QseC inhibition as a novel Antivirulence Strategy for the Prevention of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;10(867):1-10.

[114]. Halang P, Toulouse C, Geißel B, Michel B, Flauger B, Müller M, Steuber J. Response of *Vibrio cholerae* to the catecholamine hormones

epinephrine and norepinephrine. *J Bacteriol Res.* 2015; 197(24):3769-3778.

[115]. Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K<sup>+</sup> homeostasis and virulence. *PLoS Pathog.* 2013; 9(3): 1-9.

[116]. Sergeev G, Roy S, Jarek M, Zapolskii V, Kaufmann DE, Nandy RK, Tegge W. High-throughput screening and whole genome sequencing identifies an antimicrobially active inhibitor of *Vibrio cholerae*. *BMC Microbiol.* 2014; 14(1):1-13.

[117]. Williams TC, Blackman ER, Morrison SS, Gibas CJ, Oliver JD. Transcriptome sequencing reveals the virulence and environmental genetic programs of *Vibrio vulnificus* exposed to host and estuarine conditions. *PloS one.* 2014; 9(12):1-27.

[118]. Watve S, Barrasso K, Jung SA, Davis KJ, Hawver LA, Khataokar A, Ng WL. Ethanolamine regulates CqsR quorum-sensing signaling in *Vibrio cholerae*. *BioRxiv.* 2019:1-41.

[119]. Plate L, Marletta MA. Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior. *Trends Biochem Sci.* 2013; 38(11):566-575.

[120]. Bongrand C, Ruby EG. The impact of *Vibrio fischeri* strain variation on host colonization. *COMICR.* 2019; 50:15-19.

[121]. Wang Y, Dufour YS, Carlson HK, Donohue TJ, Marletta MA, Ruby EG. H-NOX-mediated nitric oxide sensing modulates symbiotic colonization by *Vibrio fischeri*. *PNAS.* 2010; 107(18):8375-8380.

[122]. Henares BM, Xu Y, Boon EM. A nitric oxide-responsive Quorum Sensing circuit in *Vibrio harveyi* regulates flagella production and biofilm formation. *Int J Mol Sci.* 2013;14(8):16473-16484.

[123]. Ueno T, Fischer JT, Boon EM. Nitric oxide enters Quorum Sensing via the H-NOX signaling pathway in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol.* 2019; 10:1-12.

[124]. Cohen JJ, Eichinger SJ, Witte DA, Cook CJ, Fidopiastis PM, Tepavčević J, Visick KL. Control of competence in *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol.* 2021; 87(6):1-15.

[125]. Huang X, Duddy OP, Silpe J E, Paczkowski JE, Cong J, Henke BR, Bassler BL. Mechanism underlying autoinducer recognition in the *Vibrio cholerae* DPO-VqmA quorum-sensing pathway. *J. Biol Chem.* 2020; 295(10): 2916-2931.

[126]. Bassler BL, Duddy O, Huang X, Silpe J. Mechanism underlying the DNA-binding preferences of the *Vibrio cholerae* and vibriophage VP882 VqmA quorum-sensing receptors. *BioRxiv.* 2021:1-37.

[127]. Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE.

Software extensions to UCSF chimera for interactive visualization of large molecular assemblies. *Structure*. 2005; 13(3):473-482.

[128]. Temml V, Kaserer T, Kutil Z, Landa P, Vanek T, Schuster D. Pharmacophore modeling for COX-1 and-2 inhibitors with ligandscout in comparison to discovery studio. *Future Med Chem*. 2014; 6(17):1869-1881.

[129]. Wu H, Li M, Guo H, Zhou H, Li B, Xu Q, He J. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* vqmA–ligand–DNA complex provides insight into ligand-binding mechanisms relevant for drug design. *J Biol Chem*. 2019; 294(8): 2580-

5171.

[130]. Wu H, Li M, Peng C, Yin Y, Guo H, Wang W, He J. Large conformation shifts of *Vibrio cholerae* VqmA dimer in the absence of target DNA provide insight into DNA-binding mechanisms of LuxR-type receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 520(2):399-405.

[131]. Park NY, Lee KW, Kim KS. H-NS silences gene expression of LeuO the master regulator of the cyclic (Phe-Pro)-dependent signal pathway, in *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol Biotechn*. 2020; 30(6):830-838.