



TESIS DE DOCTORADO

**COMUNICACIÓN BACTERIANA:
FUNDAMENTOS Y
ESTRATEGIAS DE
INTERFERENCIA**

Celina Vila Sanjurjo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021





DOCTORAL THESIS

BACTERIAL COMMUNICATION: FUNDAMENTALS AND INTERFERENCE STRATEGIES

Celina Vila Sanjurjo

INTERNATIONAL DOCTORAL SCHOOL
DOCTORAL PROGRAM IN DRUG RESEARCH AND DEVELOPMENT

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2021



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Comunicación bacteriana: fundamentos y estrategias de interferencia

D./Dña. Celina Vila Sanjurjo

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Bremen, Alemania.....2021

Fdo. Celina Vila
Sanjurjo







AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Comunicación bacteriana: fundamentos y estrategias de interferencia

D^a. M^a Carmen Remuñán López, como directora y tutora

D. Francisco M. Goycoolea Valencia, como director

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. Celina Vila Sanjurjo, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaran también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 2021,

En Leeds, Reino Unido,2021





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Comunicación bacteriana: fundamentos y estrategias de interferencia

D^a. M^a Carmen Remuñán López, como directora y tutora

D. Francisco M. Goycoolea Valencia, como director

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/D^a. Celina Vila Sanjurjo, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaran también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 2021,

En Leeds, Reino Unido,2021





*“Un ansia fuera”
Mariquina, mi madre*





Bacteria waltz.
Una abstracción del lenguaje de las bacterias,
inspirada en el *Vals de la Suite de Jazz N° 2*,
de Dimitri Shostakóvich.
Antonio Vila Agra, 2013.
Óleo s/tabla.

AGRADECIMIENTOS





“*Un ansia fuera*”, es la cita que he escogido, ya que era la coletilla de mi madre cuando nos habíamos quitado algún peso de encima —un examen, una preocupación— y, sin duda, sería lo primero que me diría una vez defendida esta tesis que tanto me ha costado. No tengo ya la suerte de que me lo pueda decir en persona, ni pueda celebrarlo conmigo, así que tiene que ser la primera persona a quien dirija mis agradecimientos. Mamá, te agradezco mi vida entera, el que me hayas enseñado a sorprenderme con la naturaleza y agradezco llevarte dentro, a todas partes. Espero que Mathilda reciba algo de ti a través de mí. Agradezco a mi padre, que siempre me ha apoyado y animado a seguir, siendo él mismo una muestra de superación y aprendizaje constante. Es un ejemplo de bondad y humanismo y un lujo de persona. Gracias por llenar mi vida de música, luz y belleza.

A Rudi y a Mathilda, por recordarme siempre lo que más importa, por nuestra familia cálida y maravillosa, por volver a dejarme ser Celina-niña cuando veo crecer a mi hija, por apoyarme, animarme y hacerme ver que puedo volar lejos.

A mis adoradísimos cuatro hermanos mayores: Antón, Ramón, Lucía y Alicia; de los cuales siempre hablo a todo el mundo por mi infinita admiración, por haberme casi criado y cuidado siempre. Por aguantar todos mis agobios y por celebrar por todo lo alto la vida, siempre que podemos. También por hacerme tía de los mejores sobrinos del planeta: Oli, Euge, Jorge, Julio, Pablo y Celi ¡Por fin van a ver lo que significa que la tía Celi acabe la tesis! Gracias también a mis cuñados, que son como hermanos.

Tengo que pararme en mi hermano Antón, ya que sin su apoyo y aguante no habría llegado a terminar todo esto. Él me invitó, cuando yo tenía solo 17 años, al laboratorio de Al Dahlberg en la Universidad Brown de EEUU, donde estaba terminando su propia tesis. Allí me ofreció sacar adelante unos experimentos para entender mutaciones en las interacciones antibiótico-ribosoma que me enseñaron, tan inexperta como era, todo lo que hoy sé sobre clonación. Esa oportunidad fue la base para decidir que yo también quería investigar y descubrir. Gracias por darme la oportunidad de volver, una vez graduada en Biología, a tu laboratorio en Berkeley, una de las experiencias más enriquecedoras de toda mi vida. No sé cómo pagarte todos estos años de revisiones,

reenfoques y ánimos. ¡Espero que con más publicaciones y proyectos juntos!

A mis extensísimas familias Vila, Sanjurjo y Enns.

Tengo que agradecer también la inmensa suerte de conservar un grupo de amigas desde la infancia que es un tesoro: Milika, Laura, Luchi, Iria, Silvia, Ana, Clara, Helena, Natalia, Tania, María, Carmen, Laura D., Lucía F.; y a los niños: Kikin, Jorge, Miguel. Por aguantar estoicamente mis rollos sobre ciencia, especialmente cuando me vengo arriba como divulgadora en tiempos Covid. Mis amigas siempre han pensado que, como científica, valgo mucho más de lo que valgo en la realidad, y han celebrado cada pequeño logro como si fuese el Nobel. Gracias por levantarme siempre, gracias por las risas y por escucharme. Pronto podremos hacer la fiesta que nos merecemos, celebrando todo lo que hemos tenido que aplazar y bailando sin parar. También a todas las grandes amistades que he ido incorporando durante la carrera y el doctorado: Ana, Lucía, Mariña, Cris, Eva, Jenny, Betty, Bianca, Brenda, Giovanni, Jorge, Talita, Roberta y tantos otros. He tardado demasiados años en cerrar este capítulo de mi vida y nombrar a todas las personas se hace imposible. Todos mis compañeros, técnicos de laboratorio y mentores tienen un lugar en mi memoria, por haber dedicado tiempo y enseñanzas, buenos momentos y apoyo en las múltiples crisis doctorales, haciendo que la carrera de fondo en que se convirtió mi doctorado haya merecido la pena. Gracias especialmente a los compañeros de proyecto y manuscritos, cuya contribución está muy presente en esta tesis: Christoph Engwer, Lea Hembach, Xiaofei Qin, Julius Netzer, Juan Pablo Fuenzalida, Stefan Hoffmann, Thomas Weikert, Stephan Kolkenbrock y Tania Verdía.

También a las personas que me han aportado nuevas visiones y ayudado a no verlo todo tan negro. Por las largas conversaciones en los últimos tiempos de confinamientos y rara normalidad, sobre las miserias y grandezas de la vida y las divagaciones científicas: a Silvia, Eva, Erika y Betty. Por sus ganas infinitas de bailar conmigo, aunque sea por medio de una pantalla, a Ana y a mi hermana Lucía, por cantar conmigo a grito pelado, a Ali. Por su disponibilidad a la hora de

ayudarme con todo tipo de trámites y papeleos: Loli Torres, Rafa Romero, Puri García, Susana Pereira, Cordula Kurth, Sagrario García, Giovanna Lollo, Fanny y Cris Fernández y Helena Rouco.

Me siento inmensamente afortunada de haber contado con dos directores como Carmucha y Francisco, que me han tratado como un miembro de su familia y siempre me han apoyado, a pesar de esta tendencia mía a hacer las cosas por caminos distintos a los que se suelen acostumbrar. Gracias por tantísimo esfuerzo compartido y por animarme a no abandonar.

Gracias también a los profesores externos y expertos de otras disciplinas que me han cedido sus laboratorios y herramientas para completar mis experimentos; en especial a mi tutor “Nouri” El Gueddari, en Münster, cuyo recuerdo guardo con especial cariño. A Bruno Moerschbacher, Stefan Schneider, Susanne Fetzner, Bodo Philipp y Antje von Schaewen, también en Münster. A Carlos Bustamante y Mariana Leguia, en Berkeley, a Anxo Vidal, Ana Otero y Manuel Romero en la USC; así como a todos los demás profesores de mi Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica: Alejandro Sánchez, Dolores Torres, María José Alonso y Begoña Seijo, que me acogieron con tanto cariño. Al Laboratorio Europeo de Radiación Sincrotrón de Grenoble y los consejos y ayuda de David Laurent y Cyrille Rochas. Por el cariño con el que me recibieron en las reuniones de Porto y Fortaleza, llenas de ciencia y samba, a las Sociedades Iberoamericana y a la Europea de Quitina y Quitosano (SIAQ y Euchis). Aprender de tantos campos distintos ha sido una gran riqueza.

Por último, agradezco a las entidades que han financiado mi doctorado: Ministerio de Educación, Xunta de Galicia, Fundación Pedro Barrié de la Maza y Servicio Alemán de Intercambio Académico.

Gracias a todos.

Celina Vila Sanjurjo
En Bremen, 27 de marzo de 2021



**ÍNDICE /
LIST OF CONTENTS**



<i>Índice de abreviaturas / List of abbreviations</i>	I
1. Resumen / Abstract	1
2. Introducción	9
2.1. El descubrimiento del <i>quorum</i> bacteriano	11
2.2. Falta de <i>quorum</i> entre los expertos en <i>quorum sensing</i>	14
2.3. Aspectos generales de la comunicación bacteriana por <i>quorum sensing</i>	16
2.4. <i>Quorum sensing</i> mediado por AHLs: el paradigma Lux de las bacterias Gram negativas	17
2.4.1. <i>Las familias de las AHLs y las sintasas</i> <i>LuxI</i> en bacterias Gram negativas	20
2.4.2. <i>La familia de los reguladores LuxR en</i> bacterias Gram negativas	21
2.4.3. <i>Genealogía LuxI-R en bacterias Gram negativas</i>	22
2.5. Excepciones al paradigma Lux	28
2.5.1. <i>Sistemas de Quorum Sensing multicanal:</i> <i>Bacterias plurilingües</i>	28
2.5.2. <i>LuxR huérfanos</i>	30
2.6. Nuevos horizontes en la investigación del <i>Quorum Sensing</i>	32
2.6.1. <i>Quorum Quenching – Interrupción del quorum</i>	34
2.6.1.1. <i>Inhibición mediada por antagonistas</i> <i>de las señales:</i>	36
2.6.1.2. <i>Quorum quenching mediado por</i> <i>hidrólisis enzimática de las señales</i>	41
2.6.1.3. <i>Secuestro de señales de Quorum Sensing</i>	42
2.6.1.4. <i>Nanosistemas dirigidos a la</i> <i>interrupción del quorum</i>	43
2.6.1.5. <i>Situación actual de la aplicación</i> <i>del Quorum Quenching en el</i> <i>desarrollo de fármacos</i>	51
2.7. Diseño y optimización de biosensores de <i>Quorum Sensing</i>	54

2.8. El quitosano como agente de control antimicrobiano y sus aplicaciones en la interferencia con el <i>quorum sensing</i>	58
3. Antecedentes, hipótesis y objetivos / Background, hypotheses and objectives	90
4. Chapter 1. Percolation theory can be used to describe the quorum-induced response of a synthetic <i>E. coli</i> biosensor	99
4.1. Abstract	101
4.2. Introduction.....	101
4.3. Materials and Methods.....	103
4.3.1. <i>E. coli</i> biosensor assays	103
4.3.2. <i>Microscopy</i>	104
4.3.3. <i>Inhibition assays with trans-cinnamaldehyde</i>	105
4.3.4. <i>Percolation function fitting</i>	106
4.3.5. <i>Discrete-step simulations</i>	107
4.3.6. <i>Simulation of the AHL-based response of bacteria in a 3D-cubic lattice model</i>	109
4.4. Results.....	111
4.4.1. <i>The QS response of a synthetic E. coli biosensor can be described by a percolation function</i>	111
4.4.2. <i>The response of the QS biosensor is sensitive to QS inhibitors</i>	118
4.4.3. <i>In silico modeling of the biosensor's response</i>	120
4.4.4. <i>The in silico simulated response can be fitted to the percolation function</i>	125
4.4.5. <i>In silico modeling of QS inhibition</i>	131
4.5. Discussion.....	138
4.6. Supporting Information.....	144
4.7. References.....	162
5. Chapter 2. Effect of the ultrastructure of chitosan nanoparticles in colloidal stability, quorum quenching and antibacterial activities	167

5.1. Abstract	169
5.2. Introduction.....	169
5.3. Materials and Methods.....	172
5.3.1. <i>Materials</i>	172
5.3.2. <i>Preparation and characterization of nanoparticles</i>	172
5.3.2.1. <i>Modulation of ionic strength</i>	172
5.3.2.2. <i>Covalent GNP co-crosslinking of NPs</i>	173
5.3.2.3. <i>Physicochemical characterization</i> <i>of IC- and CC-NPs</i>	173
5.3.2.4. <i>Determination of the concentration</i> <i>of IC-NPs and CC-NPs</i>	174
5.3.3. <i>Stability of IC- and CC-NPs in supplemented</i> <i>M9 minimal medium</i>	174
5.3.4. <i>Microbiological assays</i>	175
5.3.4.1. <i>Assays with the E.coli fluorescent biosensor</i>	175
5.3.4.2. <i>Determination of antimicrobial activity</i> <i>of CS NPs</i>	175
5.3.4.3. <i>Evaluation of the ability of CS NPs to inhibit</i> <i>the QS response in the E. coli biosensor</i>	176
5.4. Results.....	177
5.4.1. <i>Modulation of ionic strength for the optimization</i> <i>of size and polydispersity of ionically,</i> <i>TPP-crosslinked CS NPs (IC-NPs)</i>	177
5.4.2. <i>Covalent co-crosslinking of IC-NPs produces</i> <i>a defined core-shell structure</i>	180
5.4.3. <i>Physicochemical characterization of prototype</i> <i>IC-NPs and CC-NPs</i>	183
5.4.4. <i>CC-NPs remain stable during incubation</i> <i>in biological medium</i>	186
5.4.5. <i>Microbiological assays</i>	189
5.4.5.1. <i>Evaluation of the antimicrobial and QQ activity</i> <i>of the IC-NPs and CC-NPs</i>	189
5.5. Discussion.....	194

5.6. Supporting Information.....	198
5.6.1. <i>Additional notes on the UV-VIS spectroscopy analysis of the crosslinking reaction between IC-NPs and GNP</i>	200
5.7. References.....	212
6. Chapter 3. Covalently and ionically, dually crosslinked chitosan nanoparticles block quorum sensing and affect cell growth on a cell-density dependent manner	219
6.1. Abstract	221
6.2. Introduction.....	221
6.3. Materials and Methods.....	223
6.3.1. <i>Materials</i>	223
6.3.2. <i>Chemical pre-crosslinking of CS with GNP</i>	224
6.3.3. <i>Preparation of PC-NPs</i>	226
6.3.4. <i>Physicochemical characterization of PC-NPs</i>	226
6.3.5. <i>Determination of the PC-NP production yield and concentration</i>	226
6.3.6. <i>Stability of PC-NPs in supplemented M9 minimal medium</i>	228
6.3.7. <i>Bacterial strains and culture conditions</i>	228
6.3.8. <i>Evaluation of the ability of the PC-NPs to inhibit the QS response in a fluorescent E. coli biosensor of AHL-mediated QS</i>	228
6.3.9. <i>Microscopy</i>	229
6.4. Results.....	230
6.4.1. <i>Chemical co-crosslinking of CS with GNP</i>	230
6.4.2. <i>Optimization of PC-NP size and polydispersity</i>	234
6.4.3. <i>PC-NP stability in M9 minimal medium</i>	237
6.4.4. <i>Evaluation of the activity of PC-NPs using a fluorescence E. coli biosensor</i>	238
6.5. Discussion	243
6.6. Supporting Information.....	254
6.8. References.....	262

7. Chapter 4. Ongoing experiments	268
7.1. Percolation theory can describe violacein accumulation in <i>Chromobacterium violaceum</i>	270
7.1.1. Summary	270
7.1.2. Introduction	270
7.1.3. Methodology	271
7.1.3.1. End-point evaluation of violacein production at various AHL concentrations by plate bioassays	271
7.1.3.2. Estimation of AHL diffusion profile from the calibration with BMB	272
7.1.3.3. Percolation analysis of published data	272
7.1.4. Results and Discussion	273
7.2. The <i>in silico</i> simulated response of virtual cells carrying a single <i>luxR</i> locus can be fitted to the percolation function	283
7.2.1. Summary	283
7.2.2. Introduction	283
7.2.3. Methodology	285
7.2.3.1. Simulation of the AHL-based response of bacteria in a 3D-cubic lattice model	285
7.2.4. Results and discussion	285
7.3. References	298
8. Discusión	303
8.1. La “trampa de AHL”	307
8.2. El QS explicado desde la teoría de la percolación	309
8.3. La relación inversa entre el tiempo crítico de percolación y los niveles de LuxR	318
8.4. Modelo de inhibición del QS por trans-cinamaldehído (CA)	322
8.5. El modelo de inhibición de nanopartículas (NPs) a base de quitosano (CS)	323
8.5.1. La estructura de las CS NPs y su influencia sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas	324
8.5.2. Efecto de las CS NPs sobre la cinética de	

<i>respuesta de QS</i>	327
8.5.3. <i>CS NPs: ¿Actividad antimicrobiana, anti-QS, o ambas? ..</i>	329
8.5.4. <i>Las nanopartículas de quitosano promueven la agregación bacteriana</i>	331
8.6. <i>Perspectivas futuras:</i>	337
8.7. <i>Referencias:</i>	340
9. Conclusiones / Conclusions	349
10. Anexo 1 (Anexo a la Introducción)	363
10.1. <i>Referencias</i>	399
11. Anexo 2 (Anexo a la Introducción)	407
11.1. <i>Referencias</i>	431
12. Anexo 3. Los resultados de estudios publicados de quorum sensing también pueden ser descritos desde la teoría de la percolación	435
12.1. <i>Metodología</i>	444
12.2. <i>Referencias</i>	445
13. Declaraciones: conflicto de intereses, uso de imágenes y contenido publicado	447
14. Listas de verificación	465



**INDICE DE ABREVIATURAS/
LIST OF ABBREVIATIONS**





a.n.:	agent-normalized.
a.u.:	arbitrary units
Abs.N.:	absolute numbers
acil-ACP:	proteína transportadora de acilo
AHL:	acil-homoserín lactona / <i>N</i> -acyl-homoserine lactone
AHL_{taken}:	virtual intracellular AHL
AI:	autoinductor / autoinducer
AI-2:	autoinductor-2, furanosil borato diéster
AIPs:	péptidos autoinductores
<i>air</i>:	antibiotic-induced response
AUC:	área bajo la curva / area under the curve
BMB:	bromophenol blue
<i>b_s</i>:	producción basal de AHL
C6-HSL:	<i>N</i> -hexanoíl-homoserín lactona / <i>N</i> -hexanoyl-L homoserine lactone
C8-HSL:	<i>N</i> -octanoíl-homoserín lactona
CA:	<i>trans</i> -cinnamaldehído / <i>trans</i> -cinnamaldehyde
CCD:	charge-coupled device
CC-NPs:	nanopartículas de quitosano-TPP co-entrecruzadas covalentemente con genipina / covalently, GNP-co-crosslinked chitosan-TPP nanoparticles
CLSM:	confocal laser scanning microscopy
CRE:	enterobacterias resistentes a carbapenémicos
CS:	quitosano / chitosan
CS NCs:	nanocápsulas recubiertas con quitosano / chitosan-based nanocapsules
CS NPs:	nanopartículas de quitosano / chitosan nanoparticles
3D:	three dimensional
<i>d</i>:	fractal dimension
DA:	degree of acetylation

DLS-NIBS:	dispersión de luz dinámica con retrodispersión no invasiva / dynamic light scattering with non-invasive back scattering
d.n.:	density-normalized
ESRF:	European Synchrotron Radiation Facility
FDA:	Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU / Food and Drug Administration
FI:	intensidad de fluorescencia / fluorescence intensity
FI/OD₆₀₀:	fluorescencia normalizada por la densidad celular / density-normalized fluorescence intensity
FI/OD₆₀₀ máx.:	máximo de fluorescencia, normalizada por la densidad celular
FTIR:	Fourier transform infrared spectroscopy
GFP:	proteína fluorescente verde / green fluorescent protein
GNP:	genipina / genipin
GRAS:	generalmente reconocido como seguro / generally recognized as safe
I:	ionic strength
IC₅₀:	concentración inhibitoria semi-máxima / half maximal inhibitory concentration
IC-NPs:	nanopartículas de CS-TPP fabricadas por el método de gelificación iónica / ionically crosslinked chitosan-TPP nanoparticles
<i>inact-[LuxR-AHL]₁</i>:	LuxR-AHL-CA complex under the simulation's inactivation scenario 1
<i>inact-[LuxR-AHL]₂</i>:	LuxR-AHL-CA complex under the simulation's inactivation scenario 2
Kcps:	kilo counts per second
k_{Hill}:	constante de la función de Hill / Hill constant
K_s:	constante de disociación del dímero activo [LuxR-AHL] ₂ con el promotor de <i>luxI</i>

k_s :	tasa de producción de AHL una vez inducido el bucle de retroalimentación positiva a nivel de <i>luxI</i>
LB :	Luria Bertani
<i>LuxR</i>₁ :	unbound LuxR monomer
[LuxR]₁ :	monómeros libres de LuxR / unbound LuxR monomers
[LuxR]_{all species} :	all LuxR species, including unbound- and bound monomers and dimers
[LuxR-AHL]₁ :	complejo monomérico de LuxR con AHL / LuxR-AHL monomeric complex
[LuxR-AHL]₂ :	complejo dimerizado de LuxR con AHL / LuxR-AHL dimerized complexes
[LuxR-ant]₁ :	LuxR-CA complex under the simulation's antagonist scenario
λ_{em} :	fluorescence emission wavelength
λ_{ex} :	fluorescence excitation wavelength
M3-PALS :	mixed-mode phase-analysis light scattering
MW :	molecular weight
NCs :	nanocapsules
NMR :	nuclear magnetic resonance
NPs :	nanopartículas / nanoparticles
OD₆₀₀ :	densidad óptica a $\lambda=600$ nm / optical density at $\lambda=600$ nm
OD_{t0} :	initial optical density
3-OH-PAME :	4-hidroxi palmitato metil éster
OMS :	Organización Mundial de la Salud
3-oxo-C12-HSL :	3-oxo-dodecanoíl homoserín lactona
3-oxo-C6-HSL :	3-oxo-hexanoíl homoserín lactona
<i>P</i> parameters :	user-assignable probabilities for the formation and degradation of virtual LuxR species and LuxR-ligand complexes.
<i>P</i>₊₁ :	user-assignable probability for the degradation of virtual LuxR ₁ species
<i>P</i>₊₂ :	user-assignable probability for the conversion of virtual LuxR ₁ into [LuxR-AHL] ₁ complexes

P_{+3} :	user-assignable probability for the conversion of virtual [LuxR-AHL] ₁ monomeric complexes into [LuxR-AHL] ₂ dimers
P_{+a} :	user-assignable probability for the conversion of virtual <i>LuxR</i> ₁ species into [LuxR-ant] ₁ complexes
P_{+i1} :	user-assignable probability for the irreversible conversion of [LuxR-AHL] ₁ species into [LuxR-AHL-inact] ₁ complexes
P_{+i2} :	user-assignable probability for the irreversible conversion of the [LuxR-AHL] ₂ species into [LuxR-AHL-inact] ₂ complexes
P_{-1} :	user-assignable probability for the degradation of virtual LuxR ₁ species
P_{-2} :	user-assignable probability for the dissociation of virtual [LuxR-AHL] ₁ complexes to LuxR ₁
P_{-3} :	user-assignable probability for the dissociation of virtual [LuxR-AHL] ₂ dimer to [LuxR-AHL] ₁ monomeric complexes
P_{-a} :	user-assignable probability for the degradation of virtual [LuxR-ant] ₁ complexes to LuxR ₁
PAMAM:	poliamidoamina
p_c :	umbral de percolación / percolation threshold
PC-A:	prototipo A de PC-NPs / PC-NP prototype A
PC-B:	prototipo B de PC-NPs / PC-NP prototype B
PC-NPs:	nanopartículas fabricadas por pre-entrecruzamiento de CS con genipina, seguido de gelificación iónica con TPP / GNP-pre-crosslinked CS-TPP NPs
PD:	polymer polydispersity index
PdI:	índice de polidispersión de partícula / particle polydispersity index
PEI:	polietilenimina
PLGA:	ácido poli(láctico-co-glicólico)
PT:	percolation theory

QQ:	interrupción del <i>quorum</i> / <i>quorum</i> quenching
QS:	percepción del <i>quorum</i> / <i>quorum</i> sensing
QSIG:	selectores de inhibidores de QS / QS inhibitor selectors
R²:	grado de correlación / correlation factor
RGB:	digital imaging, red, green and blue channels
r_m:	concentración máxima de [LuxR-AHL] ₂
ROI:	region of interest
ROS:	especies de oxígeno reactivas
SAM:	S-adenosil-L-metionina
SARM:	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
SAXS:	dispersion de rayos X de ángulo reducido / small-angle X-ray scattering
SR:	relación estequiométrica / stoichiometric ratio
t_c =	tiempo crítico de percolación / percolation critical time
TEM:	transmission electron microscopy
t_{gel-DLS}:	critical gel time obtained by DLS-NIBS
t_{gel-rheo}:	rheological critical gel time
t_{máx}:	tiempo que precisa el biosensor <i>E. coli</i> para alcanzar el máximo de fluorescencia
TPP:	trifosfato de sodio / sodium triphosphate
u.a:	unidades arbitrarias
wt:	wild type
ζ:	potencial zeta / zeta potential.



**1. RESUMEN /
ABSTRACT**





RESUMEN

El término *quorum sensing* (QS) engloba una serie de mecanismos de regulación de fenotipos bacterianos mediados por la detección de moléculas señal, los cuales dan lugar a comportamientos multicelulares coordinados entre los que destacan procesos de virulencia y formación de biopelículas, entre muchos otros. En un contexto de emergencia global de resistencias a los agentes antimicrobianos clásicos, el conocimiento fundamental de los procesos de comunicación bacteriana dependientes de QS es crucial para desarrollar nuevos agentes de control frente a bacterias patógenas y oportunistas. En la búsqueda de agentes para la interferencia con el *quorum* — estrategia conocida como *quorum quenching* (QQ) —, el quitosano (CS) está ganando terreno. En concreto, las nanopartículas (NPs) a base de CS ofrecen una serie de cualidades fisicoquímicas y biológicas que las hacen especialmente adecuadas para el control microbiano y la interferencia con el QS, considerada esta última dentro de las estrategias antimicrobianas de nueva generación. Entre las propiedades de las NPs de CS destacan, además, su baja toxicidad y bioadhesividad, así como su gran versatilidad para incorporar ligandos multifuncionales o capacidad para asociar moléculas activas, incluyendo agentes de QQ. Sin embargo, las propiedades de QQ intrínsecas a las NPs de CS no se conocen a fondo. Teniendo esto en cuenta, en esta tesis se plantea la hipótesis de que las características estructurales de las NPs de CS pueden afectar drásticamente su comportamiento en la interfase NP-bacteria, determinando la bioactividad desplegada por las mismas, concretamente en el contexto del QQ. En base a esta premisa, se presentan dos estrategias de fabricación de nanopartículas de quitosano con ultraestructura y características fisicoquímicas específicas, a partir de su entrecruzamiento iónico y co-entrecruzamiento iónico/covalente, y se explora su capacidad de interferencia con el QS.

Para caracterizar la actividad de las nanopartículas, se utilizó un biosensor fluorescente y altamente sensible basado en *Escherichia coli*, portador de un sistema de regulación de QS dependiente del regulador LuxR. Este biosensor permite la cuantificación de la respuesta de QS

dependiente de la inducción por medio de acil-homoserín lactona (AHL) exógena, así como la caracterización precisa de las perturbaciones sobre el mecanismo de regulación.

Durante la optimización y caracterización del biosensor se descubrió que la respuesta inducida seguía una cinética acorde con una transición de fase, concretamente de percolación, similar a la que opera en otros fenómenos críticos en la naturaleza. En base a estas observaciones, una parte importante de la tesis se ha centrado en explicar el mecanismo de QS basado en LuxR bajo el marco teórico de un modelo de percolación. Este enfoque ha permitido desentrañar, combinando ensayos microbiológicos y simulaciones *in silico*, algunas características fundamentales del mecanismo de regulación dependiente de LuxR y AHL, con importantes implicaciones en el diseño de estrategias de interferencia con el QS. En concreto, estos estudios han derivado en la propuesta de un mecanismo teórico novedoso para la inactivación de los complejos LuxR-AHL, el cual podría traducirse en el desarrollo de estrategias dirigidas a interacciones precisas entre los reguladores de QS y los agentes inhibidores.

El conocimiento generado con el biosensor se utilizó para interpretar los resultados de QQ obtenidos con las NPs de CS generadas en este trabajo. Un hallazgo central de esta tesis es la capacidad de interacción de las NPs de CS con las células del biosensor, en un mecanismo co-dependiente de la densidad bacteriana y de la dosis de nanopartículas. Este mecanismo es consistente con la existencia de una relación estequiométrica NP/bacteria, la cual se establece de forma natural durante el crecimiento bacteriano. El trabajo de esta tesis abre nuevas puertas al desarrollo de agentes antimicrobianos de nueva generación basados en nanomateriales, con capacidad para perturbar el QS y reducir así la virulencia bacteriana. Además, se plantea este trabajo como base de esfuerzos futuros encaminados al desarrollo de nanomateriales a base de CS con capacidad para interferir, de forma dirigida, con los mecanismos de virulencia de bacterias patógenas en momentos específicos del crecimiento bacteriano, así como para incorporar y liberar moléculas activas en contextos donde la interferencia con los mecanismos naturales de agregación bacteriana

puede ser particularmente relevante, como en heridas e infecciones crónicas pulmonares.



ABSTRACT

The term quorum sensing (QS) encompasses a series of regulatory mechanisms of bacterial phenotypes which are mediated by the secretion and detection of signal molecules. At a population scale, these processes give rise to multicellular and density-dependent, coordinated behaviors. QS is involved in relevant bacterial traits, including biofilm formation and virulence, among many others. In the current context of emergent resistances to classical antibiotics, to deepen into fundamental knowledge of QS-based, bacterial communication and virulence processes is key to develop new antimicrobials against pathogenic and opportunistic bacteria. In the search for agents aimed to quorum interference - a strategy known as quorum quenching (QQ) - chitosan (CS) is gaining momentum. Specifically, CS-based nanoparticles (NPs) offer a series of physicochemical and biological assets that make them especially suitable for microbial control and interference with QS. These properties comprise, among others, their low toxicity, bioadhesive capacity and amenability to be conjugated with multifunctional ligands or associate bioactive molecules, including QQ agents, hence making them ideal platforms for the development of new generation antimicrobials. However, the QQ properties intrinsic to CS NPs are not yet fully explored. Taking this into account, this thesis hypothesizes that the ultrastructural characteristics of CS NPs can drastically affect their behavior at the NP-bacterium interface, and determine their bioactivity, specifically in the context of QQ. Based on this premise, we present two fabrication strategies, by means of ionic crosslinking and ionic/covalent co-crosslinking, to obtain CS NPs with specific ultrastructure and physicochemical characteristics, and we explore their ability to interfere with QS.

To characterize NP's bioactivity, we used a highly sensitive fluorescent biosensor based on *Escherichia coli*, which carries a QS regulation system dependent on the LuxR activator. This biosensor allows the quantification of the QS response by means of exogenous induction with acyl-homoserine lactone (AHL), as well as the precise characterization of the perturbations on the regulatory mechanism.

During the optimization and characterization of the biosensor, we discovered that the kinetics of the induced response was consistent with that of a phase transition, specifically a percolation process, similar to that occurring in other critical phenomena in nature. Based on these observations, an important part of the thesis focused on explaining the LuxR-dependent QS mechanism under the theoretical framework of a percolation model. This approach made it possible to delve, by means of both microbiological work and *in silico* simulations, into some fundamental characteristics of the regulatory mechanism dependent on LuxR and AHL, which might have important implications in the design of QQ strategies. Specifically, these studies led us to propose of a novel theoretical mechanism for the inactivation of LuxR-AHL complexes, which could guide the development of strategies aimed at precise interactions between QS regulators and inhibitors.

The knowledge gained from the characterization of the biosensor was used to interpret the QQ results obtained with the CS NPs generated in this work. A central finding of this thesis is the ability of CS NPs to interact with biosensor cells and disturb their QS response, in a mechanism that is co-dependent on bacterial density and nanoparticle dose. This mechanism is consistent with the existence of a stoichiometric NP / bacteria ratio, which is established naturally during bacterial growth. The work embodied in this thesis opens a new horizon to the development of new generation antimicrobial agents based on nanomaterials, with the capacity to disturb the QS and thus reduce bacterial virulence. In addition, this work is proposed as a basis for future efforts aimed at the development of CS-based nanomaterials with the ability to interfere, in a targeted way, with the virulence mechanisms of pathogenic bacteria at specific times of bacterial growth, as well as to incorporate and release active molecules in contexts where interference with the natural mechanisms of bacterial aggregation may be particularly relevant, such as in wounds and chronic lung infections.



2. INTRODUCCIÓN





Se conoce como detección de *quorum*, o en inglés “*quorum sensing*” (QS) a los mecanismos de comunicación celular bacteriana por medio de la secreción y percepción de señales extracelulares. Desde su descubrimiento hace cinco décadas, se ha venido relacionando este tipo de mecanismos con la capacidad de las bacterias de percibir la densidad poblacional e iniciar comportamientos orquestados a nivel grupal una vez alcanzado un número determinado de células. En su visión más aceptada hasta la fecha, se explica este mecanismo como consecuencia de la acumulación, en paralelo al crecimiento poblacional, de las moléculas señal, o *autoinductores* (AIs), en el medio extracelular hasta alcanzar una concentración umbral desencadenante de la respuesta coordinada de la población de bacterias. Dicho de otro modo, a medida que la colonia crece, más y más células producen y exportan AIs, lo que conlleva un incremento sustancial de la concentración ambiental e intracelular de la molécula señal. Una vez que se alcanza una concentración crítica de AIs, éstos se unen de forma productiva a receptores intracelulares específicos, activando una cascada transcripcional que da lugar a cambios en los patrones de expresión génica y fenotípicos a nivel de la población de bacterias. Se desencadena entonces una respuesta coordinada y cooperativa de la colonia dependiente de la densidad celular. De esta manera, los niveles externos de autoinductor actuarían como elementos contabilizadores del “censo” o *quorum* bacteriano ^{1,2}.

2.1. EL DESCUBRIMIENTO DEL *QUORUM* BACTERIANO

Las primeras evidencias de autoinducción bacteriana surgieron entre los años 60 y 80 a partir del estudio de las respuestas coordinadas de bioluminiscencia en los vibrios marinos *Vibrio fischeri* (actualmente *Aliivibrio fischeri*) ³ y *Vibrio harveyi* ^{1,4-6}. Observaciones en estas especies revelaban que la producción de luz no era directamente proporcional a la densidad del cultivo, sino que curiosamente se producía, de forma digital, cuando se alcanzaba una densidad crítica, aumentando entonces en varios órdenes de magnitud. Los experimentos de Nealson *et al.* ^{4,7} y otros trabajos posteriores ^{5,8} demostraron la inducción positiva, o *autoinducción*, de los genes implicados en la actividad luciferasa, por acumulación en el medio de

cultivo de señales químicas producidas por las células, que alcanzaban una concentración activa una vez que la población crecía hasta alcanzar una densidad crítica (**Lámina 1**).

A pesar de esas primeras evidencias tempranas de autoinducción en bacterias marinas bioluminiscentes, hubo que esperar hasta los años 90 para bautizar este tipo de mecanismos con el término “*quorum sensing*” y para profundizar en sus mecanismos moleculares de regulación^{1,9}. Muy pronto, se acumularon suficientes evidencias de la existencia generalizada de procesos similares al de *Vibrio spp.* entre distintos taxones bacterianos como: *Pseudomonas*¹⁰⁻¹², *Erwinia*¹³⁻¹⁵, *Agrobacterium*¹⁶, *Serratia*¹⁷, *Rhizobium*¹⁸; donde controlaban diversos fenotipos^{1,2,13,19,20}.

Anteriormente al descubrimiento de los procesos de QS, mecanismos como la formación de biopelículas, comportamientos coordinados de predación, sacrificios reproductivos coordinados y suicidio programado en ciertas especies de bacterias eran considerados excepciones con respecto a la norma de la vida solitaria unicelular¹. Es por esto que el descubrimiento de los mecanismos de sincronización de la actividad grupal por medio de QS, análogos a un sistema multicelular, ha supuesto una revolución en el conocimiento de la biología bacteriana²¹. Hoy en día, el estudio del QS no está restringido únicamente al enfoque de la Microbiología clásica, sino también al de disciplinas más modernas como son la Biología Sintética, Biología de Sistemas, Bioinformática, entre otros campos²²⁻²⁴. Además el QS se ha convertido en los últimos años en un marco conceptual que permite comprender la emergencia de otros comportamientos coordinados basados en la comunicación célula a célula no limitados a bacterias como, por ejemplo, los mecanismos de señalización química entre procariontes y eucariontes^{25,26}, la formación de sinapsis neuronales^{27,28} o los procesos de invasión de células cancerosas^{29,30}.

A pesar del enorme interés que suscita, continúan existiendo hoy en día teorías en conflicto y gran ambigüedad en la comprensión de aspectos fundamentales del QS. En este sentido, se discuten asuntos cruciales relativos a evolución y funciones ecológicas de los mecanismos de QS³¹⁻³⁷, debate que se abordará en mayor detalle en la siguiente sección.

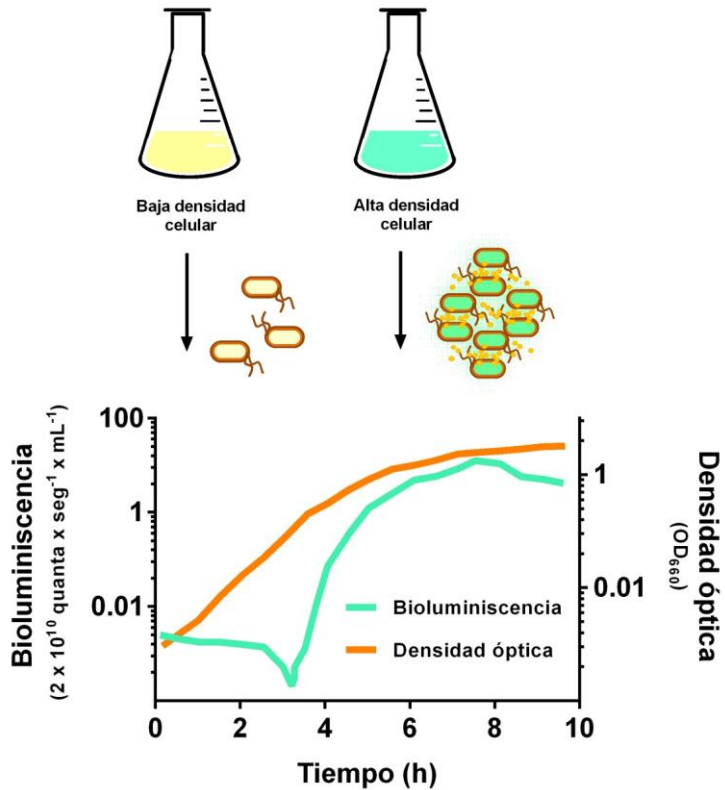


Lámina 1. Reproducción y adaptación del trabajo original de Nealon *et al.* ⁷, que dio origen a la hipótesis de la autoinducción de la respuesta bioluminiscente en *V. harveyi*.

Leyenda Lámina 1: Reproducción y adaptación del trabajo original de Nealson *et al.* ⁷, que dio origen a la hipótesis de la autoinducción de la respuesta bioluminiscente en *V. harveyi*. El gráfico es una reproducción del mostrado en Nealson *et al.* (*J Bacteriol.* 1970;104 (1):313-322. Permitido por Editorial ASM). El trazo turquesa (eje y izquierdo) muestra la evolución temporal de la bioluminiscencia (trazo turquesa, eje y izquierdo), con relación a la densidad del cultivo. En cultivos recién inoculados, a baja densidad celular (matraz en la parte superior izquierda), la bioluminiscencia atraviesa una fase de latencia seguida de una depresión, o “período de eclipse” durante la fase inicial de crecimiento (entre 0 y -3.5 h de incubación). A partir de ese momento, coincidiendo aproximadamente con la mitad de la fase log de crecimiento, se dispara la bioluminiscencia y se incrementa en varios órdenes de magnitud. Las tasas de producción de bioluminiscencia y de crecimiento celular están, por tanto, desconectadas entre sí. Esto se traduce en que el viraje desde el cultivo a baja densidad, “apagado” (matraz de la parte superior izquierda), al cultivo bioluminiscente (matraz de la parte superior derecha), se produce súbitamente de manera prácticamente digital y no graduada, de acuerdo al aumento progresivo de la densidad celular. Además, se observó que la actividad luciferasa *in vitro* correlacionaba perfectamente con el patrón de bioluminiscencia *in vivo* ⁷. Tras gran debate, se terminó atribuyendo este comportamiento a un proceso de regulación transcripcional de los genes de la luciferasa, mediado por una sustancia producida por las propias bacterias ^{5,8,38}. Se denominó a esta sustancia *autoinductor* (AI) y al proceso de regulación génica *autoinducción*, siendo este último activado únicamente cuando el AI se acumulaba hasta alcanzar un nivel umbral a altas densidades celulares. En las ilustraciones de la parte superior, junto a las flechas, se representan células aisladas a baja densidad y no autoinducidas (izquierda), mientras que a alta densidad celular (derecha) el AI, representado por círculos amarillos, se acumula en el medio extracelular y dentro de las células y determina que éstas se “enciendan”. Este descubrimiento resultó fundamental para comenzar a comprender los procesos de comunicación celular bacteriana que hoy conocemos como QS ¹.

2.2. FALTA DE QUORUM ENTRE LOS EXPERTOS EN QUORUM SENSING

La secuencia de acontecimientos que tuvieron lugar desde el descubrimiento de los procesos de *autoinducción* en vibrios hasta la evidencia de la presencia generalizada de estos procesos en la filogenia bacteriana, no siempre se comprendieron en la mentalidad de la Microbiología clásica del momento y fueron objeto de intenso debate durante las primeras décadas de investigación en QS ¹. El enorme interés de este tipo de mecanismos ha provocado una verdadera avalancha de información y estudios sobre el tema en los últimos años, que ha llevado consigo el establecimiento y aceptación generalizada de ciertos modelos e hipótesis que, en algunos casos necesitan una revisión más profunda, con el fin de ser confirmados a la luz de nuevas evidencias moleculares y evolutivas ¹. Desde su introducción en 1994

⁹, el término *quorum sensing* ha determinado en gran medida el prisma desde el cual se han contemplado este tipo de procesos, asimilándolos a las ideas de la existencia de *lenguajes bacterianos* o *comunicación bacteriana*, las cuales encierran un gran atractivo para el público general y han inundado los títulos de los artículos científicos en los últimos tiempos ^{31,39-47}. En torno al concepto del *quorum*, históricamente se han explicado este tipo de mecanismos bacterianos desde el punto de vista de la autoinducción dependiente de la densidad, o censo celular, que implica un compromiso de la colonia dependiente de un número mínimo de células ^{9,31,44,48-50}. Además, el término *autoinductor* implica la existencia de un bucle de retroalimentación positiva o mecanismo de autorregulación en el que la molécula señal controla su propia síntesis. Sin embargo, este tipo de bucles de retroalimentación no están presentes en gran número de circuitos de QS ^{51,52}. Aunque se ha demostrado en gran cantidad de estudios que el número de células afecta dramáticamente el establecimiento de comportamientos coordinados de QS ⁵³⁻⁵⁶, algunos autores han planteado que esta visión clásica puede no ser necesariamente la descripción más exacta del fenómeno. Estos autores defienden que la concentración extracelular de AIs puede, efectivamente, ser un reflejo de la densidad poblacional *in vitro*, mientras que en los ambientes naturales está sujeta a una combinación de factores abióticos y bióticos que pueden ser fluctuantes. Por tanto, las condiciones experimentales de laboratorio, principalmente las usadas en cultivos líquidos, homogéneos y clonales y que reflejan el fenómeno del *quorum* celular ligado a la concentración extracelular de AIs, pueden no ser extrapolables al contexto natural ^{35,36,57,58}.

En ambientes naturales complejos, como puede ser la rizosfera, el tracto gastrointestinal humano, y otros, la distribución espacial de las células no es homogénea y éstas se ven a menudo aisladas o confinadas en agrupaciones sometidas a microambientes cambiantes ⁵⁸. En estos ambientes, los AIs no se acumulan a un ritmo constante, sino que la difusión y percepción de las señales fuera de las bacterias puede verse comprometida por factores abióticos (pH, temperatura, compartimentalización o composición del medio extracelular, entre otros), o por factores fisiológicos, como mensajeros y metabolitos

secundarios en respuesta a las condiciones tróficas o de estrés celular⁵⁸⁻⁶⁰. Por su lado, otros miembros de la comunidad bacteriana y organismos eucariotas pueden ser capaces de degradar las señales o producir compuestos que son capaces de mimetizarse con los AIs, compitiendo con ellos o actuando como antagonistas. A nivel celular, la maquinaria genética del QS está integrada en circuitos regulatorios complejos, que incluyen cascadas de reguladores transcripcionales y post-transcripcionales que afectan a la síntesis de los AIs⁶¹. La secreción de AIs podría además ser empleada por las células individuales para percibir las dinámicas de flujo de su ambiente inmediato y no para calcular el número de células de su colonia o de colonias vecinas. Esta habilidad por parte de las bacterias les permitiría optimizar la síntesis de moléculas de alto coste energético a nivel extracelular, como hidrolasas, sideróforos, antibióticos, etc, que deben permanecer cerca de las células productoras, testando primero las propiedades de difusión del microambiente por medio de la excreción de metabolitos más sencillos³⁵. Esta tesis ha sido defendida por diversos autores en teorías alternativas conocidas como “percepción de la difusión” y “percepción de la eficiencia”^{32-36,57,62,63}.

En realidad, múltiples factores pudieron haber influido en la evolución del QS, con lo que la teoría clásica del QS y las alternativas que se han ido proponiendo, como la percepción de la difusión, no tienen por qué ser mutuamente excluyentes^{31,33,35,36}. Pese a esto, las teorías alternativas no han recibido gran atención por parte de la comunidad científica, que mayoritariamente abraza la visión del *quorum* bacteriano³¹.

2.3. ASPECTOS GENERALES DE LA COMUNICACIÓN BACTERIANA POR QUORUM SENSING

El descubrimiento continuo de nuevos circuitos de regulación y AIs ha puesto de manifiesto la enorme dificultad para manipular y caracterizar a nivel individual cada uno de los sistemas de QS que se van identificando en distintas cepas bacterianas. A pesar de la gran diversidad de mecanismos de señalización y de fenotipos asociados, algunos de los aspectos del esenciales QS son análogos para distintos taxones de bacterias. Así, para simplificar su clasificación, los sistemas

de QS se agrupan de forma generalizada en función de características comunes en cuanto a la naturaleza química de los AIs y/o las proteínas reguladoras involucradas. En bacterias Gram positivas, el QS está fundamentalmente inducido por péptidos cíclicos. En bacterias Gram negativas existen dos categorías principales de QS, cada una mediada por una clase distinta de autoinductor, por un lado, los de la familia de las acil-homoserín lactonas (AHLs) y, por otro, el autoinductor AI-2⁶⁴. La primera categoría representa el sistema de señalización propio de bacterias Gram negativas, inicialmente descubierto en *A. fischeri* y mejor caracterizado. La segunda categoría ha sido propuesta como mecanismo de comunicación interespecífica tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas². La **Lámina 2** muestra los distintos grupos de moléculas señal, además de las dos principales categorías de QS mencionadas.

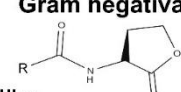
Las subsecciones siguientes describirán en mayor profundidad las generalidades del mecanismo mediado por AHLs, en el cual se enmarca el contenido de esta tesis.

2.4. QUORUM SENSING MEDIADO POR AHLs: EL PARADIGMA LUX DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

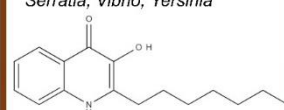
Como se ha mencionado en secciones anteriores, el mecanismo de control de bioluminiscencia de *A. fischeri* fue el primer sistema de QS mediado por AHL descrito a nivel molecular⁵ y constituyó la punta del iceberg del descubrimiento hasta la actualidad de una larga lista de mecanismos análogos en otros taxones de bacterias Gram negativas²⁰. En *A. fischeri*, las células se iluminan únicamente cuando se encuentran en simbiosis en el órgano luminoso de su hospedador marino, hacinadas a altas densidades, pero no cuando se encuentran en estado planctónico y, por tanto diluidas⁶⁵. Su circuito de regulación basado en el operón *lux* constituye el paradigma por medio del cual se explicaron otros sistemas de QS descubiertos posteriormente en bacterias Gram negativas^{20,46,66}.

El circuito simplificado de QS representado en la **Lámina 3** muestra el esquema canónico de la señalización mediada por AHLs. El clúster genético de regulación de bioluminiscencia de *A. fischeri* consiste en ocho genes (*luxA-E*, *luxG*, *luxI* y *luxR*), organizados en dos operones

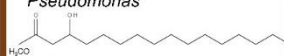
Gram negativas



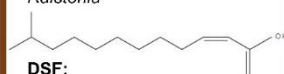
AHLs:
Acinetobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Burkholderia, Chromobacterium, Erwinia, Pseudomonas, Rhizobium, Serratia, Vibrio, Yersinia



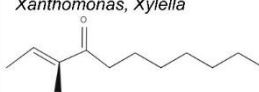
PQS:
Pseudomonas




3-OH PAME:
Ralstonia



DSF:
Burkholderia, Stenotrophomonas, Xanthomonas, Xylella

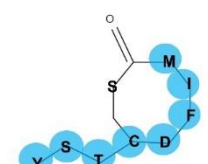


CAI-1, Ea-C8-CAI-1:
Vibrio, Legionella

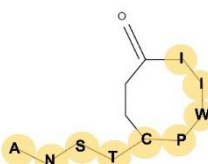


Epinefrina (+AI-3*):
Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Legionella, Salmonella, Shigella, Yersinia

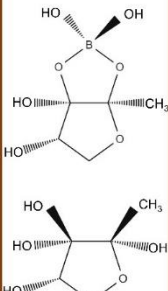
Gram positivas



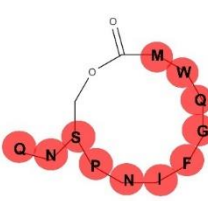
AIP-1:
Staphylococcus



AgrD:
Clostridium



AI-2:
Vibrio, Salmonella



GBAP:
Enterococcus

Lámina 2. Principales autoinductores de QS.

Leyenda Lámina 2: Principales autoinductores de QS. A la izquierda aparecen representadas algunas de las moléculas señal más abundantes en bacterias Gram negativas. Éstas incluyen las acil-homoserín lactonas (AHLs), que constituyen la clase más abundante ⁶⁷, pero también quinolonas, como la PQS de *Pseudomonas aeruginosa* ⁶⁸, el 4-hidroxi palmitato metil éster (3-OH-PAME) y ácidos grasos, como el DSF, de los géneros *Ralstonia*, *Burkholderia* o *Xylella* ^{69,70}; además de hormonas eucariotas como la epinefrina, que actúa en combinación con el autoinductor AI-3* en bacterias enterohemorrágicas de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter* o *Legionella*, entre otros ⁷¹. En bacterias Gram positivas, la diversidad química de las señales de QS es más limitada y principalmente basada en el uso de péptidos autoinductores (AIPs). A la derecha aparecen representados algunos de los principales tipos de AIPs. Éstos son péptidos cíclicos específicos de especie y han sido descritos en *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* o *Enterococcus faecalis*, entre otras ⁷². En el centro, se muestran dos tipos de furanosil diéster, conocidos como autoinductor-2 (AI-2), empleados tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas y que se han relacionado con mecanismos de comunicación interespecífica o *lenguaje universal* ⁷³⁻⁷⁵. Esquema adaptado del publicado en Rémy *et al.* ⁶⁴ (Front Pharmacol. 2018 Mar 7;9:203. Con licencia Creative Commons).

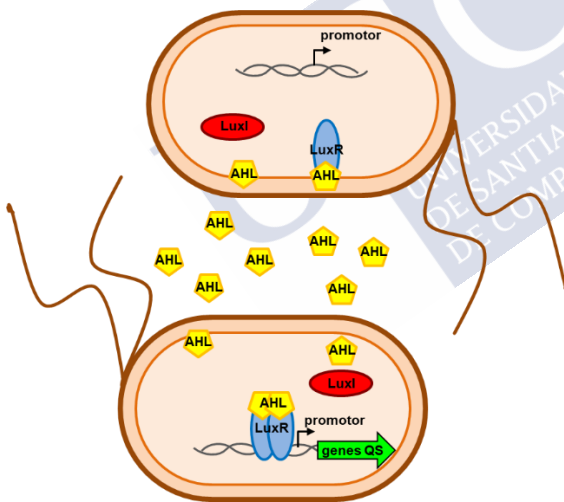


Lámina 3. Representación esquemática del paradigma *lux* de *A. fischeri*. La proteína LuxR es un activador del operón *lux* dependiente de AHL que dirige la expresión del propio gen *luxR* y del gen de la sintasa de la señal, *luxI*, además de la expresión de los genes responsables de la producción de bioluminiscencia. En gran número de especies de bacterias Gram negativas, el mecanismo de autoinducción es homólogo al representado en el esquema, con mayor o menor complicación ^{87,88}.

que se transcriben bi-direccionalmente. La interacción de la 3-oxo-hexanoíl homoserín lactona (3-oxo-C6-HSL) con el regulador transcripcional LuxR determina la expresión concertada de

* El AI-3 posee estructura química aun por ser elucidada

bioluminiscencia. Según el modelo más aceptado, a baja densidad de población, las células individuales expresan el gen *luxI* a un nivel basal, de manera que la concentración de AHL en el medio extracelular se mantiene baja. A medida que la densidad celular crece dentro del órgano luminoso del hospedador o del matraz en el laboratorio, la concentración de AHL aumenta de forma concomitante. Una vez se alcanza una concentración umbral de AHL, correspondiente a una densidad celular determinada o *quorum* bacteriano, ésta se uniría a LuxR, que es altamente inestable en ausencia del ligando^{2,5,8,20}. Como resultado, se produce la activación de la proteína, por medio de un cambio conformacional y dimerización^{20,76-81}. La proteína LuxR activa se une a una región de 20 pares de bases en el cromosoma bacteriano, conocida como caja *lux*, que está situada unas 40 pares de bases aguas arriba del sitio de inicio de transcripción de *luxI*, y promueve la transcripción del clúster *luxICDABEG*^{20,82-84}. Como consecuencia de este proceso, se incrementan los niveles celulares de los transcritos de RNAm que codifican para las proteínas implicadas tanto en la bioluminiscencia como en la síntesis de AHL. Por tanto, la expresión de bioluminiscencia depende de un bucle de retroalimentación positiva: cuantas más moléculas de AHL se producen, más LuxR se activan y mayor es la intensidad luminosa. Además, la expresión de *luxR* está sujeta a un segundo bucle de retroalimentación, dependiente asimismo de la concentración de AHL: cuando los niveles de AHL son bajos, LuxR activa su propia síntesis^{82,84,85}, mientras que a niveles abundantes de AHL, LuxR actúa como represor de la transcripción de su gen^{59,85,86}.

A continuación, abordaremos en mayor detalle las características y funcionamiento de los módulos LuxI-R, de las AHLs, así como su distribución filogenética en distintos taxones de bacterias Gram negativas.

2.4.1. Las familias de las AHLs y las sintasas LuxI en bacterias Gram negativas

Las AHLs presentan una estructura común, a pesar de lo cual los sensores LuxR poseen por lo general una alta especificidad para detectar su AHL particular⁸⁹. Esta estructura se caracteriza por un anillo homoserín lactona insustituído en las posiciones β - y γ -, con un

grupo acilo en la posición –R (**Lámina 2**). Las cadenas aciladas, con longitud variable entre cuatro y ocho carbonos, pueden estar saturadas o insaturadas y presentar, o no, sustituyentes de tipo hidroxilo u oxo a nivel del carbono 3². Las AHLs son producidas por numerosos géneros de bacterias Gram negativas, incluyendo a *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Vibrio* y *Yersinia*. Sin embargo, no siempre están presentes en todas las cepas del mismo género^{48,90}. Las AHLs de distintas especies difieren en la longitud de su cadena acilada, el grado de saturación y el sustituyente localizado en el C3. Las AHLs de cadena más corta difunden de forma pasiva a través de las membranas, mientras que las de cadena larga son transportadas por medio de transportadores activos^{10,58,91,92}. La vida media de las AHLs es sensible a factores abióticos como el pH y temperatura ambientales. Así un pH alcalino o temperaturas superiores a 37 °C, son suficientes para provocar la apertura del anillo lactona y privar a la molécula de sus propiedades señalizadoras. La estabilidad de las AHLs depende de la longitud de la cadena acilada, de manera que las AHLs deben contener al menos cuatro carbonos para asegurar una estabilidad y actividad suficientes en las condiciones de pH predominantes en los hábitats de la mayoría de cepas bacterianas⁵⁸. Las sintasas de tipo LuxI emplean como sustratos la proteína transportadora de acilo (acil-ACP) como donante de la cadena acilada y S-adenosil-L-metionina (SAM) como donante de la fracción homoserín lactona, que además participan en el metabolismo central de la célula como donantes de grupos metilo y en la biosíntesis de lípidos, respectivamente^{48,58,93–96}. Las sintasas de tipo LuxI comparten similitudes estructurales con proteínas de tipo N-acetiltransferasa de eucariotas, las cuales emplean asimismo precursores de ácidos grasos como sustrato^{48,94,97}.

2.4.2. La familia de los reguladores LuxR en bacterias Gram negativas

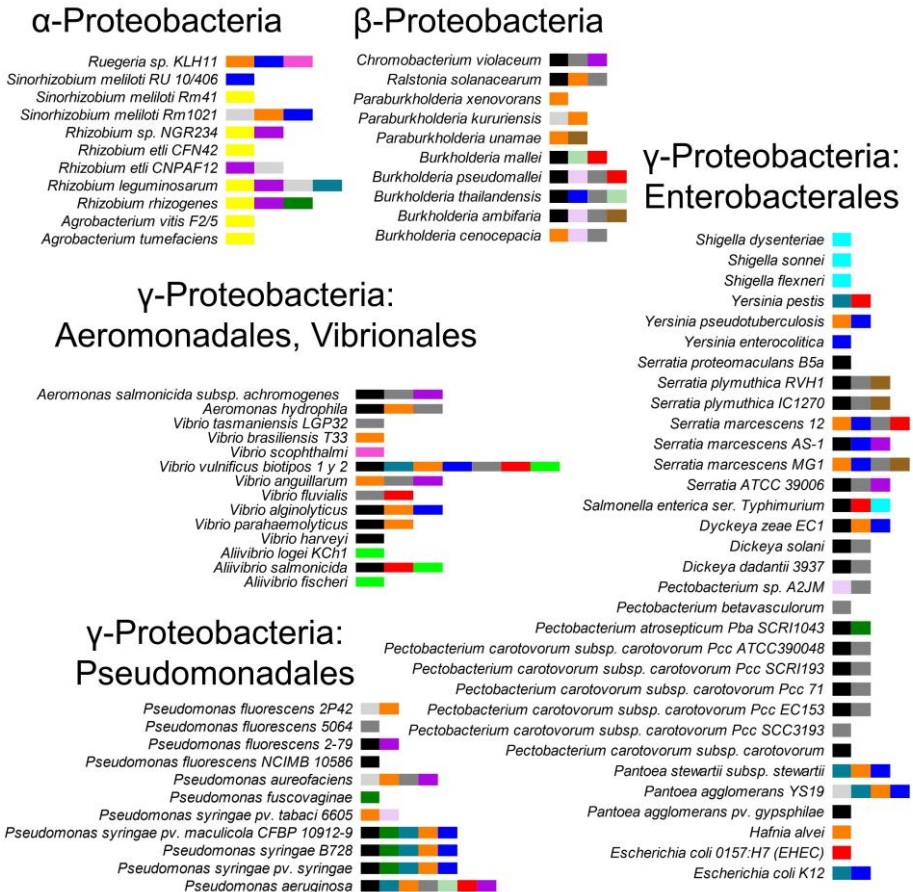
Como ya se mencionó en líneas anteriores, aparte de la sintasa de AHL, el segundo componente principal del QS dependiente de AHLs es generalmente un regulador transcripcional perteneciente a la familia de proteínas LuxR. La AHL se une y activa a LuxR, de tal forma que el

complejo LuxR/AHL es responsable bien de activar, bien de reprimir los genes diana. Las proteínas de tipo LuxR interactúan con las AHLs por su extremo N-terminal^{20,76,98-102}. Por su parte, el extremo C-terminal de LuxR contiene una región con un motivo hélice-giro-hélice fundamental para asegurar su unión al ADN. Parece que esta región es también responsable de la oclusión, en la conformación inactiva de la proteína, de los sitios responsables de la multimerización y de unión al ADN, que se liberarían por medio de la unión de la AHL al extremo N-terminal^{20,79-81,103-105}. La secuencia del ADN que contiene el sitio de unión de LuxR es la denominada caja *lux*. Se trata de una repetición invertida de 20 nucleótidos que, en *A. fischeri* está situada en la región intergénica entre *luxR* y *luxI* y es necesaria para la regulación primaria de la expresión de los genes *lux*. Esta región está altamente conservada en otras proteínas LuxR, aunque puede presentar diferentes topologías con relación a la organización génica de *A. fischeri*¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Sin embargo, existe gran variabilidad en la familia de las proteínas LuxR en cuanto a sus mecanismos de activación transcripcional⁴⁸. Hasta la fecha únicamente se ha conseguido resolver la estructura total o parcial de un número limitado de homólogos de LuxR¹⁰⁸⁻¹¹³. Aunque en gran número de taxones las proteínas LuxR siguen el modelo canónico y forman complejos reguladores tras la unión a la AHL cognada, existen numerosas excepciones en las que el regulador es activo en ausencia de la AHL o incluso son antagonizadas por unión a la señal¹⁰⁶. En el siguiente apartado profundizaremos en las divergencias evolutivas y taxonómicas de la superfamilia LuxR.

2.4.3. Genealogía LuxI-R en bacterias Gram negativas

Los homólogos de proteínas LuxI y LuxR han sido identificados en más de 70 cepas de proteobacterias Gram negativas, incluyendo a bacterias púrpuras no del azufre, vibrios marinos, bacterias de la rizosfera, comensales entéricas y patógenos oportunistas de animales y plantas. En estas especies, los sistemas de tipo LuxI-R regulan funciones fisiológicas tan dispares como la síntesis de exoenzimas, conjugación de plásmidos, producción de antibióticos, luminiscencia o producción de biopelículas, así como interacciones hospedador-huésped de simbiosis o patogénesis^{2,20,66,114-116}. La **Tabla 1 – Anexo 1**

Lámina 4. Representación de la distribución de los fenotipos de QS en taxones emparentados de Proteobacteria



Legenda de fenotipos de QS:

- Producción de exoenzimas: proteasas, celulasas, pectinasas, celulasas, caseinasa, quitinasa, lipasa, biosurfactantes
- Actividad degradadora de colesterol, fenoles, alcoholes
- Resistencia al estrés. Supervivencia en fase estacionaria. Rutas metabólicas alternativas
- Producción de lectinas
- Producción de exopolisacárido, biopelículas, componentes de la superficie celular, agregados celulares.
- Motilidad, quimiotaxis, regulación de los genes flagelares
- Detección de AHLs de otras especies
- Simbiosis en animales. Interacción con el organismo hospedador
- Bioluminiscencia
- Patogénesis en animales y humanos. Interacción patógeno-hospedador
- Producción de sideróforos
- Producción de antibióticos, factores de virulencia, toxinas
- Producción de pigmentos
- Patogénesis en plantas. Interacción patógeno-hospedador
- Simbiosis en plantas. Nodulación. Colonización de la rizosfera
- Transferencia conjugativa de plásmidos

Leyenda Lámina 4: Representación de la distribución de los fenotipos de QS en taxones emparentados de Proteobacteria. Los fenotipos de QS, recogidos de la Tabla 1-Anexo 1 se organizan por categorías y se codifican en colores tal y como se recoge en el cuadro inferior. Las distintas especies recogidas en la Tabla 1 aparecen organizadas por clase (α -, β -, γ -Proteobacteria) y, en algunos casos también por orden, y acompañadas del código de color de sus fenotipos de QS correspondientes

recopila un extenso escrutinio de la literatura en busca de sistemas de regulación de tipo LuxI-R así como de los fenotipos asociados a éstos en diversas cepas de bacterias Gram negativas. En concreto, esta tabla recoge información de un total de 12, 11 y 60 cepas de las clases α -, β - y γ - de las Proteobacterias. La idea inicial de elaborar esta Tabla era tratar de establecer conexiones a nivel funcional y/o estructural entre los sistemas de regulación LuxI-R de taxones relacionados, así como a nivel de los fenotipos que estos sistemas controlan. Pese a que estas conexiones son evidentes en numerosas cepas (*cf.* los pares de proteínas tipo TraI-R y su papel en la transferencia de plásmidos en los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, **Tabla 1 – Anexo 1**), llama la atención la enorme heterogeneidad en la arquitectura y funciones de los sistemas de señalización en otras cepas altamente relacionadas (véase *Aliivibrio spp.* y *Vibrio spp.*, **Tabla 1 – Anexo 1**). La gran variabilidad de los fenotipos controlados por sistemas LuxI-R entre taxones cercanos aparece más claramente representada en la **Lámina 4**, donde se organizan por categorías los distintos fenotipos recogidos en la **Tabla 1 – Anexo 1**, permitiendo su visualización organizada por taxones emparentados.

Pese a constituir una superfamilia proteica conservada evolutivamente, los análisis de alineamiento de secuencias de aminoácidos han revelado que la homología de las distintas proteínas LuxI-R conocidas, con respecto a las respectivas de *A. fischeri* no es tan elevada (entre el 18 y 25%) y que presentan un reducido número de aminoácidos conservados en todas ellas^{20,114}. Todavía existen dudas acerca del origen evolutivo de estas familias proteicas y de cómo se diseminaron a lo largo del vasto árbol evolutivo de las proteobacterias Gram negativas, aunque parece claro que estos sistemas son ancestrales en muchas especies, lo cual hace suponer que los mecanismos de QS se establecieron muy temprano en la evolución de *Proteobacteria*^{114,117}. En la mayoría de los filos, los genes *luxI* y *luxR* ocupan locus contiguos

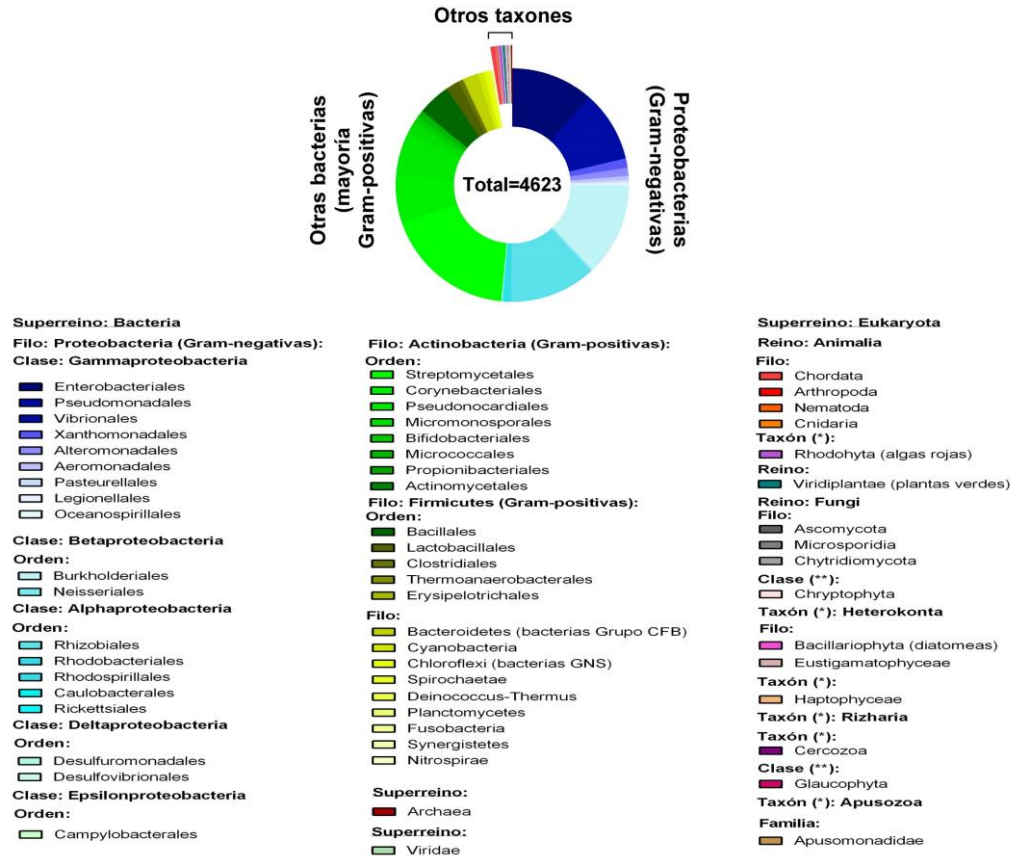
en el cromosoma y funcionan como pares, lo que indica, en la mayoría de los casos, una historia evolutiva compartida ¹¹⁷. Por otro lado, dada la distribución filogenética discontinua de muchos homólogos LuxI y LuxR, se pudieron haber producido episodios paralelos de pérdida y/o transferencia genética horizontal entre filos a lo largo de la evolución ^{114,117}.

En su mayoría, los homólogos de LuxR actúan como activadores transcripcionales y dependen de la unión de AHLs cognadas, necesarias para su correcto plegamiento y resistencia a la degradación por proteasas ¹⁰¹. Este es el caso de los homólogos LuxR, LasR y TraR. Sin embargo, existe un subgrupo de la superfamilia LuxR que se activan únicamente en ausencia de AHLs y, por el contrario, son inhibidas por éstas ¹¹⁸. Un ejemplo de este subgrupo es la proteína EsaR de *Pantoea stewartii*, la cual reprime la expresión de su propio gen y es capaz de activar la expresión de otros genes, pero es inhibida por su AHL cognada. A pesar de que no es raro que ciertos activadores transcripcionales activen algunos promotores y repriman otros, dependiendo de si se unen aguas arriba o abajo del promotor, el hecho de que la AHL cognada antagonice a EsaR está completamente desconectado de las funciones de las proteínas LuxR estándar (LuxR, LasR, TraR). EsaR, por el contrario, se puede plegar y unirse al ADN en ausencia de AHL ^{84,118}. Esta clara bifurcación entre proteínas LuxR típicas –dependientes de AHLs– y proteínas tipo EsaR tiene importantes implicaciones evolutivas. El análisis filogenético de los diferentes homólogos de LuxR ha revelado que aquellas proteínas cuya actividad es antagonizada por AHLs forman un clado independiente y poseen una serie de características comunes: todas ellas pertenecen al orden Enterobacteriales; su AHL cognada es, por lo general, la oxo-C6-AHL, generalmente no regulan la expresión del gen de la sintasa de AHL y normalmente funcionan como represores. En este tipo de sistemas, los fenotipos de QS se inducen igualmente a altas densidades celulares, dado que la expresión de los genes, reprimida por la proteína de tipo EsaR, es activada una vez se acumula la AHL, que actúa en estos casos como antagonista ¹¹⁸.

Por otro lado, las proteínas de la superfamilia LuxR poseen características comunes con otros reguladores transcripcionales de

taxones distintos a bacterias. Por ejemplo, la región característica hélice-bucle-hélice de unión al ADN es común a un elevado número de factores transcripcionales tanto procariontes como eucariotes ⁹. La **Lámina 5** ilustra la presencia de secuencias génicas, completas o parciales, con cierto grado de homología con las de LuxR, agrupadas por taxones y no limitadas únicamente a bacterias. Se trata de un barrido superficial, basado en la herramienta abierta de NCBI de predicción de anotaciones genómicas ¹¹⁹ y que en absoluto pretende llegar a un análisis filogenético profundo. A pesar de que la presencia de fragmentos de secuencias homólogas a las de LuxR no implica la presencia de este tipo de proteínas en todos los taxones representados en la **Lámina 5**, resulta interesante visualizar la abundancia de secuencias conservadas a lo largo de la filogenia. Esta ubicuidad puede en efecto ser un reflejo de la homología de ciertos fragmentos de las proteínas LuxR con los de otros reguladores transcripcionales, tal y como mencionábamos líneas arriba, pero además resulta especialmente interesante teniendo en cuenta que los procesos de QS se comienzan a extrapolar a comportamientos colectivos en organismos superiores ^{88,120,121}. Además, cada vez se acumulan más evidencias de que muchas de las moléculas señal de bacterias, incluyendo las AHLs, son empleadas por diversos dominios filogenéticos, en los cuales son capaces de provocar diversos efectos a nivel celular; como respuestas inmunes o alteración de la señalización endógena, entre otros ²⁵. En conjunto, las divergencias evolutivas de las distintas proteínas conocidas dentro de la superfamilia LuxR y la existencia de proteínas similares en distintos taxones, con funciones distintas al QS, mantienen en el aire la cuestión de si los reguladores de tipo LuxR evolucionaron específicamente hacia su función de efectores del QS o se adaptaron a ésta a partir de otras funciones de regulación transcripcional más primitivas. Conocer los mecanismos evolutivos de estos reguladores resulta de vital importancia, dado que se les considera potenciales dianas para el desarrollo de nuevas estrategias de control antimicrobiano.

Lámina 5. Presencia de secuencias génicas de tipo *luxR*, parciales o totales, en los genomas de distintos organismos



Leyenda Lámina 5: Representación de la presencia de secuencias génicas de tipo *luxR*, parciales o totales, en los genomas de distintos organismos. Los datos fueron obtenidos por medio de la herramienta abierta de NCBI de predicción de anotaciones genómicas ¹¹⁹ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>; acceso: 01/06/2016; 17:05; current annotated genes, búsqueda: luxR; NCBI taxonomy database). Identificar genes *luxR* en los genomas bacterianos es una tarea delicada, debido a que las proteínas LuxR están emparentadas estructuralmente con otras familias proteicas muy abundantes en los genomas. LuxR consta de dos dominios, el dominio de unión al ADN GerE (id de PFAM: PF00196) y el dominio de unión al autoinductor (id de PFAM: PF03472). Ambos dominios se pueden encontrar en cerca de 300 proteínas distintas de LuxR ¹²². Para que un ORF pueda ser considerado como genuino de una proteína LuxR es necesario que posea similitudes con ambos dominios y que éstos se encuentren en el orden adecuado, así como presentar una longitud total en el rango del de LuxR conocidas. Cuando se buscan circuitos canónicos de QS, es sencillo filtrar falsos positivos bajo el requisito de que los genes *luxR* y *luxI* estén localizados dentro de una cierta distancia en el cromosoma. En el caso de la búsqueda de genes *luxR* huérfanos, no es posible emplear este requisito y es sencillo caer en falsos positivos ¹²². El gráfico de sectores muestra la abundancia de secuencias conservadas de *luxR* en distintos genomas a lo largo de la filogenia. El alto grado de conservación de algunas de las secuencias génicas de las proteínas LuxR con respecto a otras proteínas reguladoras podría tener importantes implicaciones a la hora de entender el origen y evolución de los mecanismos de percepción de señales, comunicación intercelular y comportamientos celulares coordinados no solo en bacterias sino también en otros taxones.

2.5. EXCEPCIONES AL PARADIGMA LUX

Los procesos de señalización por QS en la mayoría de las bacterias Gram negativas son normalmente más complejos que el modelo general representado en la **Lámina 3** y con frecuencia incluyen arquitecturas jerárquicas de señalización multicanal. ^{1,2}. Además, se han identificado homólogos de los genes *luxI* y *luxR*, formando parte de pares o en solitario, tanto en los cromosomas bacterianos como en plásmidos extracromosómicos ^{114,122,123}.

2.5.1. Sistemas de *quorum sensing* multicanal. Bacterias plurilingües

En paralelo al descubrimiento de nuevos mecanismos homólogos a LuxI-R, en numerosas especies de bacterias Gram negativas fueron apareciendo mecanismos alternativos de síntesis y detección de autoinductores, no homólogos de los módulos LuxI-R, formando parte de circuitos de QS más o menos jerarquizados y que en ocasiones

incluían a su vez pares LuxI-R, complicando considerablemente la visión homogénea que se tenía sobre estos mecanismos².

Algunos de estos sistemas multicanal aparecen reflejados en la **Tabla 1 – Anexo 1**. Curiosamente, la organización de este tipo de sistemas jerarquizados, así como la naturaleza de los módulos proteicos regulatorios, no siempre guarda relación filogenética clara entre cepas emparentadas. Ejemplos de este tipo se dan en *Pseudomonas spp.*, o entre los géneros *Vibrio* y *Aliivibrio* (**Tabla 1 – Anexo 1**).

Sorprendentemente, en *V. harveyi*, el organismo que demostró el control de la bioluminiscencia mediante autoinducción⁷ (**Lámina 1**), ésta no depende del modelo paradigmático, sino de una cascada de transducción multicanal que incluye el par LuxM-N y un regulador transcripcional maestro, que no son homólogos del par LuxI-R de *A. fischeri* (ver **Tabla 1 – Anexo 1**). Aún así, debido al orden cronológico con el que fueron surgiendo las primeras evidencias de autoinducción en estas dos especies de vibrios, al regulador maestro del circuito de QS de *V. harveyi* se le bautizó como LuxR y así se le conoce hasta nuestros días¹²⁴. A pesar de compartir nombre y de controlar procesos de bioluminiscencia en ambas cepas, el LuxR de *V. harveyi* no guarda ninguna homología con el LuxR paradigmático de su pariente *A. fischeri*, sino que es una proteína reguladora de tipo TetR¹²⁴. En *V. harveyi*, la producción de bioluminiscencia, así como la producción de metaloproteasa y del sistema de secreción de tipo III, están también reguladas por un regulón *lux*, que incluye señalización mediada por una AHL. En este caso, la sintasa, LuxM, y su receptor, LuxN, de tipo histidín quinasa, aunque funcionalmente relacionados con el par LuxI-R de *V. fischeri*, tampoco guardan homología estructural con éste (véase **Tabla 1 – Anexo 1**). Además, en *V. harveyi* existen otras dos rutas de señalización paralelas, las mediadas por el autoinductor “universal” AI-2 y el autoinductor CAI-1, este último también presente en *Vibrio cholerae*. Las tres rutas de señalización de *V. harveyi* parecen tener un papel aditivo en la regulación de los genes de QS. Estos tres canales convergen en la defosforilación de la proteína LuxU, que activa de forma indirecta el regulador maestro LuxR (véase **Tabla 1 – Anexo 1**)
31,125

Incluso en *A. fischeri*, portador del par paradigmático LuxI-R, éste no actúa en solitario, sino en serie junto con otros dos pares sintasa-receptor no homólogos del primero, dependientes de una cascada de transducción de tipo quinasa^{74,126,127}. El circuito multicanal completo de *A. fischeri* aparece explicado en detalle en la **Lámina 6** (véase también la **Tabla 1 – Anexo 1**).

Por su parte, *Pseudomonas aeruginosa* presenta un sistema jerarquizado que incluye 2 módulos de tipo LuxI-R (LasI-R y RhII-R) y un LuxR huérfano (QscR), que además están conectados a otros circuitos regulatorios distintos, controlados por el regulador dependiente de AMP cíclico Vfr, el regulador anaeróbico ANR y la ruta de señalización mediada por quinolonas¹²⁸⁻¹³¹.

2.5.2. LuxR huérfanos

En los últimos años, se ha demostrado la presencia de proteínas de tipo LuxR solitarias en los genomas de gran número de bacterias Gram negativas^{31,122,132-136}. En estos casos, la proteína no aparece asociada a un par de tipo LuxI, aunque algunas especies presentan a su vez módulos adicionales de tipo LuxI-R. Una serie de estudios recientes ha arrojado luz sobre la distribución filogenética y la evolución de estas proteínas huérfanas^{122,137,138}. Sin embargo, la función de estas proteínas solitarias todavía no se entiende en su totalidad y no parece encajar con el modelo clásico de QS, centrado en la síntesis y recepción coordinadas de AHL.

Las LuxR solitarias presentan, al igual que la LuxR de *A. fischeri*, un dominio de unión a AHL y otro de unión al ADN¹³⁷. A pesar de sumayor o menor grado de homología con las LuxR canónicas, algunas de estas proteínas huérfanas presentan distinto tamaño, con secuencias truncadas o adicionales. Otras carecen de algunos residuos conservados que son críticos para la función de la mayoría de las proteínas LuxR. La función de estos homólogos truncados podría ser la de reconocer AHLs mediante mecanismos alternativos, desarrollar actividades independientes de ligando, actuar como inhibidores o incluso detectar otras moléculas de pequeño tamaño. En otros casos, mantienen todos o la mayor parte de los residuos críticos y se piensa que este tipo de LuxR

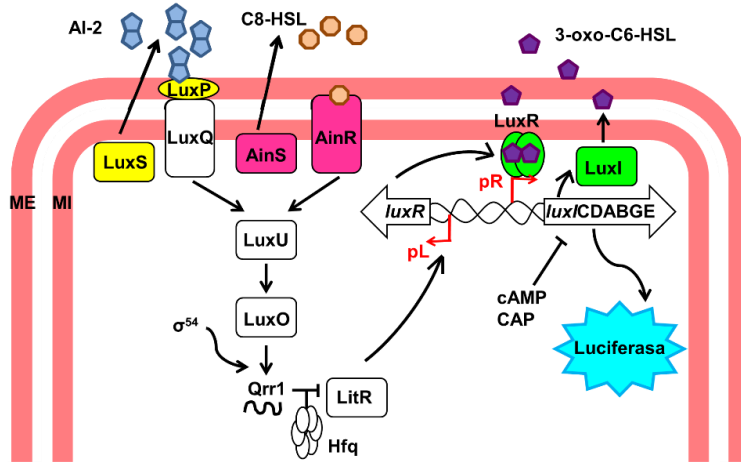


Lámina 6. Circuito completo de QS en *A. fischeri*. Adaptado de Liu *et al.* ¹²⁶ (J Bacteriol Parasitol 2013, 4:3. Con licencia Creative Commons). En *A. fischeri*, la 3-oxo-C6-HSL es sintetizada por la sintasa LuxI, utilizando S-adenosilmetionina (SAM) y proteínas transportadoras de grupos acilo (ACP) como sustrato ¹⁴². Esta AHL se une a su receptor específico, LuxR, en la membrana citoplasmática ¹⁴³. Esta proteína tiene además función de regulador transcripcional. A baja concentración de AHL, la región N-terminal de LuxR emmascara su dominio hélice-giro-hélice y bloquea su unión al ADN. A medida que la AHL se acumula a mayor concentración y difunde al interior de la célula, la unión de la 3-oxo-C6-HSL al extremo N-terminal de LuxR y la formación de dímeros (LuxR-AHL)₂, permite su unión a la región reguladora de la caja *lux*. Como consecuencia, se activa la propia expresión de *luxR* y de los genes *luxICDABGE*, a partir de los promotores divergentes pL y pR, respectivamente. De esta manera, los niveles de 3-oxo-C6-HSL establecen un doble bucle de retroalimentación positiva, regulado a nivel transcripcional por la forma activa de LuxR ^{77,79,84,85,100,144}. Además existe un segundo nivel de regulación positiva de la expresión de *luxR*, mediada por el complejo formado por adenosín monofosfato cíclico y la proteína activadora por catabolitos (cAMP-CAP) ⁸⁵. En paralelo al circuito LuxI-R, existen otros dos circuitos no homólogos, los módulos AinS-R y LuxS-PQ. La sintasa AinS sintetiza la N-octanoil-homoserín lactona (C8-HSL), que interacciona con la quinasa AinR. La sintasa LuxS produce el furanosil borato diéster (AI-2) ⁷⁴. AI-2 se une a la proteína periplasmática LuxP y el complejo LuxP-AI-2 es reconocido por la quinasa LuxQ. En ausencia de los autoinductores correspondientes, a baja densidad celular, las quinasas AinR y LuxQ se autofosforilan y se inicia una cascada de transferencia del grupo fosforilo a las proteínas histidín-transferasas LuxU y LuxO. Esta última coopera con el factor σ^{54} para activar la transcripción del RNA pequeño regulador, Qrrq, que silencia la expresión de LitR en presencia de la chaperona Hfq. A medida que aumenta la densidad celular, los autoinductores se acumulan y se unen a sus receptores cognados, que se convierten en fosfatasa, y defosforilan en secuencia las proteínas LuxU y LuxO. Esta última, ahora en su estado inactivo, permite la expresión estable de LitR. LitR además regula positivamente la transcripción de LuxR, modulando a su vez la expresión de los genes de bioluminiscencia ¹²⁷.

huérfanos altamente conservados podrían responder a AHLs endógenas, producidas por una sintasa no asociada del mismo organismo o incluso a señales de otros organismos^{122,139-141}. Ejemplo de éstas últimas es la proteína SdiA, presente en los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Erwinia*^{132,137}. Se ha demostrado para algunas de estas cepas que ciertos genes diana son regulados en ausencia de unión a AHLs y se ha propuesto que, en estos casos, las AHLs podrían alterar la especificidad de unión al ADN de SdiA, mientras que otros promotores son dependientes de su unión a AHL¹³⁷. Dentro del sub-grupo de LuxRsolitarias capaz de responder a AHLs endógenas se encuentra QscR de *P. aeruginosa*^{12,122,137,139}. Aunque se ha propuesto que las LuxR huérfanas son remanentes de pares LuxI-R en los que se ha perdido la sintasa¹³², algunos autores han defendido, a partir de análisis filogenéticos, que la evolución de estas proteínas solitarias pudo haber ocurrido de forma independiente de la evolución de los operones de QS¹²². La ubicuidad de estas proteínas solitarias nos hace preguntarnos si la capacidad de recepción de AHLs podría haber sido adquirida por las bacterias de manera independiente a la capacidad de síntesis de la señal^{114,117,122,145}. Por ejemplo, en un momento dado de la evolución, las moléculas de tipo LuxR podrían haber aprendido a percibir el *quorum* tras unirse a ciertos metabolitos que se acumularían de forma natural durante el crecimiento celular¹⁴⁶. El perfeccionamiento del mecanismo de QS por medio de la incorporación de sintasas de tipo LuxI podría haber ocurrido en pasos evolutivos subsecuentes. La posibilidad de que algunas de las LuxR solitarias sean remanentes de funciones primitivas de “escucha” de metabolitos bacterianos a partir de las cuales pudieron haber evolucionado los sistemas canónicos de QS dependientes de AHL debería ser considerada en mayor profundidad¹²².

2.6. NUEVOS HORIZONTES EN LA INVESTIGACIÓN DEL *QUORUM SENSING*

En los últimos años se han dedicado grandes esfuerzos a desarrollar modelos matemáticos y biofísicos, así como simulaciones *in silico* que ayuden a comprender mejor los mecanismos de comunicación celular

por QS. Sin embargo, dado que las células pueden producir comportamientos sincronizados a nivel de la población a partir de las dinámicas estocásticas celulares a nivel individual, la aplicación correcta de dichas aproximaciones continúa siendo un reto y planteando numerosas preguntas abiertas.

Dentro del enfoque tradicional del QS, una respuesta colectiva implicaría que las células pueden intercambiar información precisa dentro de la colonia. Sin embargo, existe actualmente cierto debate acerca de cómo puede una población de bacterias estimar de forma precisa su número de constituyentes si la información que reciben e integran las células a nivel individual está sometida a altos niveles de oscilación y ruido ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Algunos estudios han demostrado que la secuencia de retroalimentación positiva: síntesis de AI- recepción del AI- activación de los genes de QS- síntesis de más AI, es uno de los ejes fundamentales que rigen la capacidad de la población de células para responder sincronizada y drásticamente a cambios en los niveles de AIs. De esta forma, los circuitos de QS actuarían como interruptores capaces de traducir la percepción de AIs a respuestas poblacionales de tipo biestable. Esto significa que la magnitud de la expresión génica y los tiempos a los que ésta se produce, inducida por los niveles de AI son altamente heterogéneos a nivel de células individuales ^{23,56,150-152}. Además, ciertos estudios han demostrado que el ruido molecular juega un importante papel en el funcionamiento de sistemas biestables ^{147,152-154}. En base a esto, cada día está más aceptado que las colonias conectadas por QS no funcionan como un todo homogéneo, como se pensaba en los orígenes del estudio del *quorum* bacteriano, sino que existe un alto grado de heterogeneidad sub-poblacional. Las diferencias vienen definidas por el propio diseño de los circuitos de QS, sometidos a fluctuaciones aleatorias debidas a ruido molecular a nivel de la regulación génica y la señalización ^{147,150,151}. Esto implica que la precisión del interruptor molecular de QS para determinar el número de células en la colonia es altamente dinámica, pudiendo bien prevenir o bien promover cambios fenotípicos dependiendo del contexto ambiental, con importantes implicaciones desde el punto de vista de adaptabilidad celular ^{147,153}.

Parece evidente a la luz de los estudios más recientes ^{147,149} que la respuesta celular a nivel individual es altamente heterogénea y que el ruido a nivel de la expresión de *luxR* es el factor principal que determina esta variabilidad.

Los avances en la comprensión de los mecanismos de regulación y coordinación celular tienen importantes implicaciones a la hora de diseñar estrategias tecnológicas enfocadas al control del QS, las cuales serán tratadas en mayor profundidad en el epígrafe siguiente. Por otro lado, los circuitos de QS basados en LuxR/LuxI y los modelos matemáticos derivados de su estudio se consideran en ocasiones como circuitos sencillos extrapolables a otros sistemas de comunicación celular, incluyendo los de organismos multicelulares ^{45,147}. De este modo los avances en la comprensión de estos mecanismos así como los efectos de la perturbación de su funcionamiento pueden tener importantes repercusiones en el desarrollo de terapias clínicas y otras aplicaciones de alto impacto sanitario y tecnológico ¹⁵⁵.

2.6.1. *Quorum quenching* – Interrupción del *quorum*

Teniendo en cuenta el amplio espectro de procesos regulados por QS y los efectos que éstos tienen sobre ámbitos humanos tan relevantes como la salud, la acuicultura o la agricultura, no sorprende que la investigación del QS este campo de estudio haya atraído gran interés con vistas al desarrollo de aplicaciones terapéuticas o tecnológicas ^{2,156}. A partir del descubrimiento de la penicilina en 1928, el desarrollo de antibióticos ha sido una de las piedras angulares de la medicina moderna y ha permitido tratar de manera efectiva la mayoría de las infecciones bacterianas agudas. Sin embargo, en los últimos tiempos estamos sufriendo una aceleración en la tasa de aparición y propagación de resistencias a los antibióticos ^{2,157,158}. En los años 40, saltó la primera alarma con la aparición de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina, y marcó el inicio de la “carrera armamentística” entre bacterias y antibióticos. En el año 2004 se estimó que más del 70% de las cepas patogénicas son ya resistentes a al menos uno de los antibióticos disponibles en la actualidad ¹⁵⁸. En 2014, un exhaustivo informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) titulado “Antimicrobial resistance: global report on surveillance”

(<http://www.who.int>)¹⁵⁹ ofrecía por vez primera un análisis detallado de la magnitud global de la expansión de las resistencias a agentes antimicrobianos y de las medidas de vigilancia necesarias para controlarla¹⁶⁰. La combinación de tres factores fundamentales, léase el desarrollo de resistencias frente a antibióticos existentes, el abuso en el empleo de agentes antimicrobianos y la baja disponibilidad de antibióticos de nueva generación, raramente incluidos en los dossieres de I+D de las compañías farmacéuticas, está provocando una verdadera debacle que nos traslada prácticamente a la era pre antibiótica.

Vivimos, pues una grave crisis en cuanto al abastecimiento y efectividad de los antibióticos convencionales^{160,161}. Éstos inhiben normalmente procesos celulares que son esenciales para la supervivencia microbiana, de manera que estimulan, por presión selectiva, la aparición y establecimiento de mutaciones de resistencia al antibiótico. En la actualidad nos enfrentamos a una gran problemática sanitaria debido a la expansión de patógenos multirresistentes, como son las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE), así como cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* y patógenos emergentes como *Acinetobacter baumannii*^{161,162}. De estos grupos, un número significativo de especies emplean el QS en la expresión de factores de virulencia y la formación de biopelículas. Es por tanto un momento idóneo para considerar nuevas estrategias para el control de los mecanismos de virulencia y que, a diferencia de los antibióticos clásicos, no ataquen directamente la viabilidad de los patógenos. De esta manera, éstos no serían capaces de lanzar el proceso de infección y podrían ser eliminados por el sistema inmune del hospedador. Aunque los sistemas de QS son empleados por numerosos patógenos bacterianos para regular sus mecanismos de virulencia, en principio no son esenciales para la supervivencia de estas especies. De este modo, las estrategias encaminadas a la interrupción del *quorum*, más conocidas por su término anglosajón “*quorum quenching*” (QQ), eventualmente atenuarían la patogenicidad sin imponer presión selectiva —o minimizando esta presión— sobre las células. El inciso anterior no es trivial, y hay que guardar cierta cautela a la hora de considerar la inocuidad del QQ en cuanto al desarrollo de resistencias.

De hecho, existe un debate abierto sobre si la alteración sobre componentes esenciales del QS puede resultar en diferencias de eficacia biológica durante procesos de infección, con potencial selección de mutantes resistentes a los agentes de QQ ^{158,163-165}.

En la actualidad se contemplan cuatro escenarios posibles de inhibición de QS, representados en la **Lámina 7**: (1) bloqueo de la sintasa de la señal (*e. g.* LuxS en el caso de la señalización por AI-2 ¹⁶⁶ o LuxI en el caso de la señalización por medio de AHLs ¹⁶⁷); (2) bloqueo de la señal, por medio de degradación enzimática ^{168,169} o secuestro por anticuerpos específicos ¹⁷⁰ y aptámeros ¹⁷¹; (3) bloqueo del receptor por unión a análogos químicos de la señal ^{168,172}. (4) Uso de liposomas, nanopartículas metálicas y poliméricas y biomateriales para inhibir el QS y la formación de biopelículas. Este último enfoque forma parte del tema central de esta tesis (Capítulos 2 y 3)

Algunos autores defienden el uso de antagonistas y enzimas frente a la manipulación genética de los elementos reguladores del QS, donde el efecto de la perturbación permanece en la célula y en generaciones subsiguientes ^{2,160}. A continuación, desarrollamos en mayor detalle algunas de las estrategias de QQ correspondientes a los escenarios (2), (3) y (4).

2.6.1.1. Inhibición mediada por antagonistas de las señales:

Una de las principales estrategias de QQ se centra en el uso de moléculas de pequeño peso molecular, no nativas y/o de síntesis pero similares a los autoinductores nativos ¹⁵⁷. Los primeros compuestos naturales descubiertos con capacidad para inhibir el QS fueron las furanonas halogenadas del alga roja *Delisea pulchra* ¹⁷³. Las furanonas halogenadas son estructuralmente similares a las AHLs y han mostrado alta actividad inhibitoria tanto frente a señales de tipo AHL como AI-2 en diversas cepas bacterianas ^{2,160,174,175}. Sin embargo, el mecanismo de acción sobre estos dos tipos de señales es distinto. En el caso de AI-2, las furanonas actúan inactivando la sintasa LuxS ¹⁷⁶. En el caso de los procesos mediados por AHLs, la unión de las furanonas halogenadas hace al receptor cognado LuxR altamente inestable frente a la degradación proteolítica o reduce su capacidad para unirse a la región promotora del ADN ^{177,178}. También variados son los fenotipos de QS

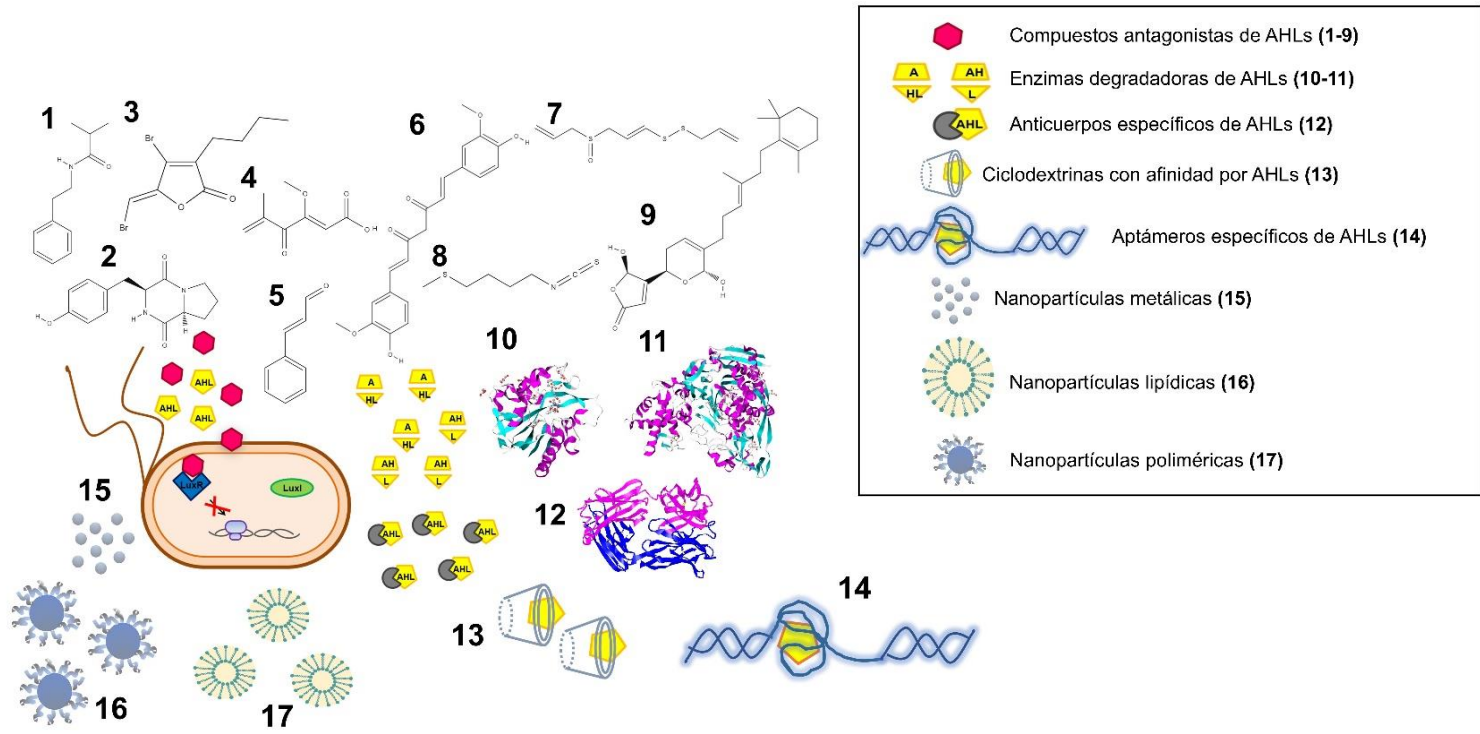


Lámina 7. Estrategias principales de *quorum quenching* en sistemas de QS dependientes de AHLs.

Leyenda Lámina 7: Estrategias principales de quorum quenching en sistemas de QS dependientes de AHLs. (1-9) Inhibición de la unión de la AHL a LuxR mediante compuestos antagonistas naturales: (1) *N*-(2'-feniletíl)-isobutiramida (bacteriano; *Halobacillus salinus*), (2) ciclo-L-prolina-L-tirosina (bacteriano; *Bacillus cereus*), (3) 4-bromo-5-bromoetilen-3-butíl-2(5H)-furanona (alga; *Delisea pulchra*), (4) ácido penicílico (fúngico; *Penicillium sp.*), (5) cinnamaldehído (vegetal; canela, *Cinnamomum sp.*), (6) curcumina (vegetal; cúrcuma, *Curcuma longa*), (7) ajoeno (vegetal; ajo, *Allium sativum*), (8) erucin (vegetal; brócoli, *Brassica oleracea*), (9) manoalida (animal; esponja, *Luffariella variabilis*). Las estructuras químicas 1-9 fueron obtenidas de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)ⁱ. **(10-11)** Hidrólisis enzimática de las AHLs. (10) Lactonasa AiiA (bacteriana; *Bacillus sp.*)¹⁷⁹, (11) acilasa PvdQ (bacteriana; *P. aeruginosa*)¹⁸⁰. **(12)** Secuestro de AHLs por anticuerpos específicos. Anticuerpo monoclonal de ratón Fab RS-2-1G9¹⁸¹. Las estructuras cristalográficas 10-12 fueron obtenidas de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)ⁱⁱ. **(13)** Secuestro de AHLs por ciclodextrinas. **(14)** Secuestro de AHLs por aptámeros específicos. **(15-17)** Nanosistemas para la interferencia con el QS: (15) nanopartículas metálicas, de óxidos metálicos y metaloides; (16) nanopartículas de naturaleza lipídica; (17) nanopartículas a base de polímeros sintéticos y naturales.

ⁱ Listado de estructuras químicas obtenidas de PubChem:

1. Identificador Pubchem: CID 290550. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N-Phenethylisobutyramide>
2. Identificador Pubchem: CID 119404. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Maculosin>
3. Identificador Pubchem: CID 9839657. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9839657>
4. Identificador Pubchem: CID 5385314. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penicillic-acid>
5. Identificador Pubchem: CID 637511. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cinnamaldehyde>
6. Identificador Pubchem: CID 969516. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516>
7. Identificador Pubchem: CID 5386591. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5386591>
8. Identificador Pubchem: CID 78160. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/78160>
9. Identificador Pubchem: CID 6437368. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6437368>

ⁱⁱ Listado de estructuras cristalográficas obtenidas de NCBI:

10. Identificador PDB: 4J5H. (Liu *et al.* *Biochemistry* (2013) **52** p.1603-10) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4J5H>
11. Identificador PDB: 2WYD. (Bokhove *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107** p.686-91)¹⁸⁰. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2WYD>
Identificador PDB: 2OP4. (Debler *et al.* *J Mol Biol* (2007) **368** p.1392-402)¹⁸¹. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2OP4>

que pueden inhibir, incluyendo procesos como la bioluminiscencia de *A. fischeri* y *V. harveyi*, la motilidad de tipo *swarming* de *Serratia liquefaciens* y *Proteus mirabilis*, la formación de biopelículas en *Escherichia coli*, la producción de factores de virulencia y antibióticos en *Pectobacterium carotovorum*, la producción de exoenzimas en *P.aeruginosa* o la biosíntesis de sideróforos en *Pseudomonas putida*^{157,182,183}. Sin embargo, las furanonas halogenadas son reactivas y potencialmente tóxicas en algunos eucariotas. Por esto resulta necesario identificar nuevos compuestos anti-QS no tóxicos^{2,157}.

Existe una amplia batería de compuestos naturales además de las furanonas, producidos a lo largo de filos variados, tanto procariotas como eucariotas^{2,160,184-187}. La abundancia en la naturaleza de antagonistas no es una sorpresa, dada la enorme importancia del QS en la regulación de los mecanismos de ataque y colonización, tanto en animales como vegetales (**Tabla 1 – Anexo 1**). Por esto, en la competencia armamentística entre distintas cepas bacterianas, así como entre bacterias y hospedadores, parece que la evolución de mecanismos de interrupción del *quorum* ha tenido un papel relevante. A pesar de que los compuestos inhibidores de QS son producidos por gran variedad de organismos y están presentes en ambientes diversos, el impacto real de los procesos de interferencia del QS a nivel de ecosistema y de las interacciones interespecíficas e inter-reino no se conoce al detalle^{160,184,188}.

Entre los compuestos inhibidores de QS de origen bacteriano se encuentran las feniletilamidas y la ciclo-L-prolín-L-tirosina. Curiosamente, en algunas especies, como *Chromobacterium violaceum*, la molécula señal cognada puede actuar como antagonista en otra cepa e incluso moléculas con estructuras análogas pueden interferir con el QS por medio de mecanismos diametralmente distintos.

Entre los inhibidores de origen fúngico destacan la patulina y el ácido penicílico. Sin embargo, la principal fuente de moléculas anti-QS son metabolitos secundarios de las plantas superiores¹⁸⁹⁻¹⁹⁷.

La mayor parte de los estudios publicados hasta la fecha en inhibición del QS a base de compuestos de origen vegetal se han centrado en la utilización de extractos vegetales, incluidas plantas de la medicina tradicional china e india, de los cuales las moléculas activas

han sido purificadas solamente en contadas ocasiones. La mayoría de los compuestos vegetales identificados son derivados fenólicos, como la vanillina, cinamaldehído, curcumina, ácido tánico, eugenol, naringenina o taxifolina. Especial interés han generado también los compuestos de tipo isotiocianato, como los derivados del ajo y el brócoli, que han demostrado una importante capacidad de inhibición del sistema LasI-R y la virulencia de *P. aeruginosa*^{160,161,198-201}.

De los compuestos inhibidores de origen animal, la mayoría proceden de organismos marinos, en su mayoría corales y esponjas, que producen sobre todo alcaloides brominados y terpenoides con actividad inhibidora de la formación y maduración de biopelículas.^{160,184}

Las primeras estrategias de QQ se basaron, por tanto, en compuestos naturales y se centraban casi exclusivamente en la aplicación de análogos estructurales de las señales que basaban su actividad en la inhibición competitiva por la unión al receptor cognado. A pesar de su probada efectividad para inhibir *in vitro* procesos como el *swarming* de *S. liquefaciens*¹⁷³, la producción de toxinas y luminiscencia en *V. harveyi*²⁰² o la patogenicidad y tolerancia a antibióticos en *P. aeruginosa*^{174,203}, no parece sin embargo que estas estrategias sean las más efectivas en la práctica. El uso de antagonistas naturales presenta una serie de limitaciones, como son su baja estabilidad y eficiencia a concentraciones nano- o micromolares fuera de las condiciones de laboratorio o, incluso, el riesgo de toxicidad en los organismos diana. La solución a este tipo de problemas pasa por el diseño y optimización de análogos sintéticos, así como compuestos no relacionados estructuralmente e inhibidores no competitivos^{2,160}. De esta forma, a partir del conocimiento de la estructura de los compuestos naturales, se han sintetizado nuevas clases de furanonas^{204,205}, así como análogos de AHLs²⁰⁶⁻²⁰⁸ con actividad QQ. Especial interés ha recibido la síntesis de compuestos dirigidos a inhibir el regulador LasR de *P. aeruginosa*²⁰⁶⁻²¹².

En la última década se han generado enormes librerías de antagonistas candidatos para aplicaciones biotecnológicas. Además, este tipo de moléculas de diseño tiene gran valor como sondas químicas que facilitan tanto la comprensión fundamental de los mecanismos de señalización por QS, como su manipulación para aplicaciones

concretas. Además permiten investigar la relación entre la estructura molecular y su efecto sobre QS, lo cual permite optimizar la efectividad o selectividad de las moléculas de nueva generación ². Sin embargo, el barrido exhaustivo de estas baterías de moléculas ha rendido hasta el momento únicamente unas decenas de antagonistas con perfiles anti-QS bien caracterizados ^{160,161,199}.

2.6.1.2. *Quorum quenching* mediado por hidrólisis enzimática de las señales:

Se han identificado enzimas con capacidad para hidrolizar las AHLs tanto en bacterias como en gran variedad de organismos eucariotas ^{2,188,213-215}. Existen dos familias principales de enzimas: el primer grupo son las lactonasas, descubiertas en *Bacillus sp.*, las cuales son capaces de romper el enlace éster del anillo lactona. Las segundas son las acilasas, identificadas inicialmente en *Variovorax paradoxus*, que hidrolizan el enlace amida de la molécula, separando el residuo homoserín lactona de la cadena acilada. Curiosamente, ninguna de las dos cepas mencionadas sintetizan sus propias AHLs, aunque se han identificado este tipo de enzimas en cepas productoras de AHLs, pertenecientes a los géneros *Agrobacterium* y *Pseudomonas* ^{2,58}. Por último, se ha descrito un tercer tipo de enzimas anti-AHL, de tipo oxidoreductasa, las cuales modifican, sin destruir, las AHLs. Las AHLs modificadas, pese a ser estructuralmente activas, no se pueden unir a su receptor, lo que provoca la interrupción del circuito de regulación de los genes de QS ²¹⁶.

La amplísima diversidad de filos bacterianos con presencia de enzimas degradadoras de AHLs, que van desde proteobacterias (*Agrobacterium*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*) a firmicutes (*Arthrobacter*, *Bacillus*), cianobacterias (*Anabaena*) y actinobacterias (*Rhodococcus*, *Streptomyces*), refleja la importancia que la degradación enzimática de AHLs ha podido tener a lo largo de la evolución como mecanismo para interferir con el QS ¹⁸⁸. Por otro lado, los eucariotas están continuamente expuestos a señales de QS, secretadas por la flora microbiana presente en sus propios organismos en el caso de animales, o en la rizosfera en el caso de plantas y hongos. No resulta por tanto sorprendente que numerosos organismos

eucariotas posean a su vez enzimas degradadoras de AHLs. De hecho se ha identificado actividad lactonasa en leguminosas y hongos asociados a la rizosfera, así como en el suero de mamíferos expuestos a AHLs¹⁸⁸. Se ha propuesto que el uso de enzimas anti-AHL en lugar de inhibidores del receptor puede reducir el riesgo de resistencias a los agentes de QQ. Sin embargo, dado la actividad de este tipo de enzimas frente a un amplio espectro de AHLs, existe riesgo de inactivación de la señalización mediada por AHLs en cepas comensales beneficiosas. Además, las enzimas presentan una desventaja en cuanto a su estabilidad en condiciones fisiológicas, lo cual limita su aplicación terapéutica¹⁵⁷. A pesar de que es necesaria una mayor investigación de los efectos fisiológicos que la administración de estas enzimas pueda desencadenar en cada caso concreto, abundan evidencias en la literatura de su efectividad para la inhibición de procesos de infección regulados por QS, con lo que gozan ya de una elevada reputación para su potencial aplicación terapéutica y agrícola^{2,58,188}.

2.6.1.3. Secuestro de señales de *quorum sensing*

Una serie de estudios recientes ha revelado que las AHLs pueden inducir efectos bioquímicos muy potentes en células de mamíferos, como apoptosis y alteración de los niveles de ciertos reguladores inmunitarios. En base a esta evidencia, se están dedicando enormes esfuerzos a la generación de haptenos basados en las señales de QS para la producción de anticuerpos monoclonales específicos con potencial aplicación profiláctica¹⁸⁸. En este sentido, se ha probado la capacidad de anticuerpos específicos para bloquear la señalización mediada por AHL en *P. aeruginosa* y por péptidos señal en *S. aureus*, y prevenir procesos de virulencia en modelos de infección^{161,170,188,217-219}.

Por su parte, los aptámeros constituyen otro enfoque elegante para el secuestro de AHLs. Los aptámeros son oligonucleótidos sintéticos con elevada especificidad y sensibilidad hacia moléculas diana. Poseen una serie de ventajas sobre el uso de anticuerpos, a destacar, su estabilidad térmica y su versatilidad para incorporar modificaciones químicas específicas²²⁰. Todas estas cualidades convierte a los aptámeros en excelentes candidatos para el desarrollo de biosensores

con aplicaciones médicas ²²⁰. En el campo del QQ, se han desarrollado aptámeros con elevada afinidad hacia las AHLs de *P. aeruginosa* ^{171,220}, demostrando su potencial como agentes inhibidores de la virulencia asociada al QS de bacterias patógenas Gram negativas.

La optimización de ciclodextrinas para el secuestro de señales de QS es también una estrategia potente de bloqueo a nivel de la percepción del autoinductor. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos capaces de formar cuerpos de inclusión con las AHLs y constituyen eficientes “trampas” o receptores artificiales de señal para la interferencia con el QS ^{221,222}. Por último, la técnica de impresión molecular se ha explorado recientemente como herramienta para generar polímeros con huellas moleculares para el reconocimiento y secuestro específico de señales de QS ^{223–225}.

2.6.1.4. Nanosistemas dirigidos a la interrupción del *quorum*

En los últimos años estamos viviendo un gran auge de la Nanobiotecnología y la Nanomedicina, con un espectro de aplicaciones que van desde la terapia celular y la liberación dirigida de fármacos y vacunas al desarrollo de materiales biocompatibles, la prevención de la contaminación de superficies e incluso tecnologías de diagnóstico y de imagen ^{226–232}. El enorme progreso en el campo de la Nanotecnología ha impulsado asimismo el desarrollo de nanosistemas con actividad antimicrobiana o para la interferencia con el QS. Las nanopartículas constituyen plataformas de gran interés para mejorar la eficacia de los agentes antimicrobianos, gracias a su elevada relación superficie-volumen y sus características fisicoquímicas particulares, las cuales pueden incluir propiedades coloidales o de respuesta a estímulos, entre otras. Estas propiedades confieren una gran versatilidad a los nanosistemas para lograr objetivos concretos, como pueden ser la liberación dirigida de moléculas activas o la mejora de sus perfiles de biocompatibilidad y toxicidad ^{227,233}. Por ejemplo, se ha demostrado que la transformación de penicilina G en nano- o micropartículas resulta en una formulación con mayor poder antimicrobiano y de inhibición de formación de biopelículas que el antibiótico en libre ²³⁴. Aún más, mientras la penicilina G solamente se había probado eficaz frente a bacterias Gram positivas, la nanopenicilina se demostró capaz de

inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas en varios órdenes de magnitud, presumiblemente gracias a su capacidad de atravesar la membrana y alcanzar las proteínas diana en el espacio periplasmático de las bacterias Gram negativas ²³⁴. Una limitación importante de los antibióticos clásicos es su dificultad para atravesar las biopelículas y erradicar las bacterias inmersas en la matriz de las mismas. Las biopelículas están asociadas con numerosas infecciones bacterianas de elevado impacto, entre las que destacan la periodontitis, la endocarditis, o las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con fibrosis quística ²³⁵. Una vez formada la biopelícula, las bacterias se hacen hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que cuando se encuentran en forma planctónica ²²⁷. Además, la naturaleza hidrofílica de los antibióticos naturales más comunes, como los betalactámicos y los aminoglucósidos, complica su capacidad de penetración a través de las membranas celulares. De este modo, se ven muy limitados a la hora de enfrentarse a infecciones intracelulares, nicho que numerosos patógenos — como los causantes de tuberculosis o listeriosis, entre otros — han explotado eficientemente para hacerse persistentes. Aproximadamente dos tercios de los antibióticos existentes son ineficaces frente a las infecciones intracelulares ²³⁵. Las nanopartículas ofrecen una solución a este respecto, ya que la versatilidad que muestran para modular sus propiedades físico-químicas y su superficie permite que puedan ser dirigidas e internalizadas en membranas de distinta naturaleza ²³⁵. Por ejemplo, la decoración superficial con fosfatidilcolina de nanopartículas de oro cargadas con gentamicina se ha revelado como una estrategia eficiente para mejorar su capacidad de erradicación de biopelículas y su internalización en macrófagos, aumentando la efectividad del antibiótico frente a los patógenos intracelulares ²³⁵. Además de mejorar la actividad de los antibióticos, se ha hipotetizado que las nanopartículas podrían limitar la emergencia de resistencias a los mismos. ^{236,237}. Por un lado, pueden atravesar de modo más eficaz las barreras (membranas y pared bacterianas, biopelículas) que comprometen la dosis efectiva del antibiótico una vez llega a su sitio diana. Por otro lado, los antibióticos convencionales normalmente se dirigen a un único, o pocos, sitios de acción y esta limitación es precisamente su talón de Aquiles, puesto que las bacterias

son capaces de desarrollar resistencias a través de unas pocas mutaciones en las proteínas diana ²²⁷. La multiplicidad de acciones simultáneas de las nanopartículas a nivel celular y molecular requeriría múltiples cambios genéticos a la vez por parte de las bacterias para poder hacerse resistentes a éstas ^{227,238}.

Aparte de su utilidad para la nanoformulación de antibióticos clásicos, se han descrito actividades antibacterianas intrínsecas para nanopartículas de naturaleza muy diversa y para un amplio espectro de especies bacterianas ²³⁶. Entre los mecanismos antimicrobianos más descritos destacan la inducción del estrés oxidativo, la alteración de la membrana celular y la interacción con el ADN y las proteínas²³⁶. Por ejemplo, las nanopartículas de naturaleza electrostática, como las de plata, oro o quitosano, pueden provocar la neutralización de la carga eléctrica superficial de la membrana de las bacterias, alterando su permeabilidad y, en última instancia, provocando la muerte celular ^{227,233,236,239-242}. Además, se ha demostrado que algunas de estas nanopartículas se unen a porinas de membrana, las cuales aseguran la integridad de la envoltura celular, provocando cambios sustanciales a nivel superficial, incluso a dosis sub-letales ^{236,241,243}. Por su parte, la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) promovida por diversos tipos de nanopartículas inhibe la defensa antioxidante de la célula y provoca a su vez daños en la membrana celular ²³⁶. Algunas nanopartículas pueden provocar además cambios en la expresión génica y los perfiles proteicos de las bacterias. La exposición de *E. coli* a nanopartículas de plata puede dar lugar a la sobre-regulación de cientos de genes, involucrados en procesos como el mantenimiento de la estructura de la membrana, la formación de biopelículas o el ciclo de Krebs, entre otros ^{233,244,245}. Llegar a elucidar la multitud de mecanismos simultáneos que se activan por exposición de las bacterias a las nanopartículas puede resultar, por tanto, una tarea inconmesurable. A pesar de ello, esta actividad múltiple es quizá la clave de la enorme efectividad antimicrobiana de nanopartículas de naturaleza tan dispar ²⁴⁵. Parece que las nanopartículas tienen un punto a su favor en la carrera armamentística contra las bacterias, al montar su poder antimicrobiano en la suma de varios procesos de ataque simultáneos, contra los cuales las bacterias se ven muy comprometidas a la hora de

montar mecanismos de defensa. Esta propiedad convierte a las nanopartículas en candidatos de especial interés para el tratamiento de bacterias multi-resistentes a fármacos tradicionales^{233,245}.

No solamente en el desarrollo de antimicrobianos de última generación, sino también en el campo de la interferencia con el QS, la aplicación de nanotecnologías está en crecimiento^{227,246,247}. La actividad QQ de numerosos compuestos se ve limitada *in vivo* debido a su baja estabilidad y biodisponibilidad en sus sitios de acción. Las aplicaciones de los nanomateriales al QQ no se limita al campo de la Medicina, sino que están experimentando también un auge importante en el área de la tecnología de los alimentos. En este campo se explota la versatilidad de los nanosistemas para fabricar películas y otros materiales de empaquetado y preservación de alimentos para evitar su contaminación microbiana²⁴⁸⁻²⁵⁰.

El uso de nanomateriales para la formulación de agentes de QQ puede ofrecer una serie de ventajas, como son una mayor capacidad de penetración en las biopelículas y mucosas, su liberación dirigida en el sitio de acción, así como una mayor estabilidad, solubilidad y biocompatibilidad, entre otras²²⁷. En numerosas ocasiones, se ha observado además un efecto sinérgico de actividad entre las nanopartículas y el compuesto activo o, incluso, la actividad QQ intrínseca de las propias nanopartículas^{233,237,245,251,252}. De forma general, se han propuesto los siguientes mecanismos de las nanopartículas para interrumpir el QS, a señalar: la degradación o eliminación de la molécula señal^{248,252-255}, la inhibición de la síntesis de señal²⁵⁶⁻²⁵⁸ o la inhibición de la formación de complejos receptor-sígnal²⁵⁹. Sin embargo, existe una miscelánea de efectos de las nanopartículas que complican la capacidad de analizar al detalle las interacciones que éstas tienen con la superficie de las bacterias y con la maquinaria intracelular, así como de discernir los potenciales efectos antibacterianos con los de QQ²²⁷. Una reciente y completa revisión sobre los últimos avances en el uso de nanotecnologías para QQ se puede encontrar en el capítulo de Qais, Khan y Ahmad (en Kalia V. (Ed.) *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*. Springer, Singapur, pp 227-244)²²⁷. La **Tabla 2 – Anexo 2** muestra un listado de los estudios más sobresalientes en el campo de la Nanotecnología dirigida al QQ.

Las nanopartículas metálicas son hasta el momento las más estudiadas para aplicaciones de QQ^{227,260}. Las nanopartículas de plata han demostrado capacidad para inhibir la producción de moléculas señal, factores de virulencia y biopelículas tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas^{227,233,248,252,256,261–263}, así como para inhibir la producción de violaceína en *C. violaceum* y de AHL en *P. aeruginosa*²⁵⁶. Las nanopartículas de oro también se han mostrado eficaces en la inhibición de formación de biopelículas y piocianina en *P. aeruginosa* o como soportes para enzimas degradadoras de moléculas señal^{233,255,264}. Por su parte, las nanopartículas de óxido de zinc se han señalado como potentes inhibidoras de procesos de QS de amplio espectro^{227,249,250}. En concreto se ha demostrado su capacidad para inhibir la producción de violaceína y exopolisacárido, así como la capacidad de “swarming” en *C. violaceum*, además de la formación de biopelículas y factores de virulencia en esta y otras especies, como *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*^{227,249,265}. Un estudio de García-Lara *et al.* ha probado recientemente la efectividad de las nanopartículas de óxido de zinc para inhibir la producción de AHLs, piocianina, elastasa y biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* aisladas directamente de muestras de pacientes con fibrosis quística, lo cual acentúa el interés del desarrollo de este tipo de nanopartículas con objetivos clínicos²⁴⁷. En concreto, el óxido de zinc posee la calificación GRAS (generalmente reconocido como seguro) por parte de la FDA, y su uso está ya establecido en los campos de la Odontología y de tratamiento de aguas, lo cual supone una gran ventaja para este material a la hora de desarrollar nanosistemas con interés en Tecnología Farmacéutica²³³. También las nanopartículas a base de metaloides están recibiendo un interés creciente para aplicaciones anti-QS^{227,254,266}. Un estudio reciente ha probado la eficacia de nanopartículas de dióxido de silicio funcionalizadas con β -ciclodextrina para secuestrar la 3-oxo-C6-HSL y reducir la transcripción de los genes *luxA* y *luxR* de control de la bioluminiscencia de *A. fischeri*²⁵⁴. A pesar del enorme interés que suscitan las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos por sus propiedades antimicrobianas y anti-QS, existe una importante preocupación acerca de su bioseguridad y sus riesgos ecológicos

potenciales. En el proceso de fabricación de diversos tipos de nanomateriales se suele hacer uso de agentes potencialmente tóxicos o contaminantes. En los últimos años, el desarrollo de nanotecnologías de síntesis “verde”, con utilización de intermediarios biodegradables o “biofábricas”, basadas reacciones naturales derivadas de plantas u hongos, se ha erigido como una alternativa respetuosa con el medio ambiente²⁴⁵. En este sentido, la presencia de compuestos reductores en extractos de plantas y en algunos hongos permite utilizarlos como intermediarios en la síntesis de nanopartículas de óxidos metálicos^{245,249,257,263–265,267–269}. Los mecanismos de acción de este tipo de materiales pueden ser tóxicos para las células humanas, dada la similitud entre las moléculas diana (lípidos, proteínas, ADN). A pesar de ello, las nanopartículas ofrecen una gran versatilidad para ser decoradas con ligandos con el fin de dirigirlas a receptores específicos de las bacterias y limitar su toxicidad en las células eucariotas²⁴⁵. Por su pequeño tamaño, normalmente ≤ 100 nm, se suele considerar a las nanopartículas metálicas altamente reactivas a nivel sub-celular²⁴⁵. De esta forma, bioactividad de las nanopartículas metálicas puede diferir sobremanera de la de otros nanosistemas con rangos de tamaño de partícula ≥ 100 nm, como pueden ser las nanopartículas de naturaleza polimérica.

Se han desarrollado diversos nanosistemas de naturaleza polimérica o lipídica para la inhibición de la formación de biopelículas y de otros procesos de QS, incluyendo liposomas y nanopartículas lipídicas^{237,251,258,270}, nanopartículas poliméricas de PLGA^{271,272}, quitosano^{241,273–278} o alginato²⁷⁹ y dendrímeros²⁸⁰ (**Tabla 2 – Anexo 2**). Las nanopartículas de tipo lipídico suelen incluir, al menos, una bicapa lipídica que rodea a un compartimento acuoso, lo cual permite incorporar moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Los liposomas, por ejemplo, están compuesto por fosfolípidos que forman vesículas mono- o multilamelares. Por su parte, las nanopartículas lipídicas sólidas forman estructuras micelares en el núcleo de la nanopartícula²³². Recientemente se ha reportado la capacidad de liposomas cargados con antibióticos y/o moléculas inhibidoras de QS para mejorar los perfiles antimicrobianos y de QQ de estos compuestos frente a cepas patógenas^{237,258,270} (**Tabla 2 – Anexo 2**). Por su parte,

las nanopartículas lipídicas sólidas se han propuesto como candidatos para la liberación pulmonar controlada de inhibidores de QS en el tratamiento de infecciones de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística ²⁵¹ (**Tabla 2 – Anexo 2**). Por la simplicidad de su fabricación, que incluye normalmente procesos de autoensamblaje, así como su elevada biocompatibilidad y biodisponibilidad, se encuentran entre los nanosistemas más comúnmente aceptados por las agencias reguladoras ²³². En contraposición, solo un pequeño número de nanomedicinas poliméricas están actualmente aprobadas por la FDA pero existen numerosos candidatos en ensayos clínicos ²³². Las nanopartículas poliméricas abren un amplio abanico de estructuras, que van desde las nanocápsulas (cavidades rodeadas por una cubierta polimérica), nanoesferas y nanogeles (formadas por matrices de polímero sólido o gelificado) a las micelas poliméricas (estructuras autoensambladas con núcleo hidrofílico y cubierta hidrofóbica) y dendrímeros (polímeros con elevado número de ramificaciones y crecimiento 3D controlado) ²³². Estas estructuras pueden ser formuladas con un control preciso de los parámetros físicoquímicos, otorgándoles cualidades coloidales específicas, de respuesta a estímulos y reconocimiento molecular o de liberación controlada de moléculas activas ^{223,281}. Los procedimientos de fabricación suelen ser sencillos e incluyen procesos como la emulsificación, con desplazamiento de solvente o difusión, la nanoprecipitación, la gelificación iónica, entre otros ²³². Las nanopartículas poliméricas se pueden fabricar a partir de polímeros naturales —alginate, quitosano, colágeno, etc ²⁸²— o sintéticos —ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), polietilimina (PEI), poliamidoamina (PAMAM), Poloxamer ²³², metacrilatos ²²³—. Normalmente se emplean polielectrolitos, los cuales confieren al polímero carga eléctrica, dependiente del pH, capacidad de respuesta a estímulos o capacidad de interacción con mucosas y membranas celulares, entre otras ²³². Las moléculas activas pueden ser encapsuladas en el núcleo de las nanopartículas, incorporadas a la matriz polimérica, o conjugadas químicamente al polímero o a la superficie de la nanopartícula ²³². En el contexto del QQ, las nanopartículas a base de PLGA se han propuesto como vehículos para la liberación controlada de compuestos antimicrobianos para la eliminación de biopelículas de

patógenos resistentes a fármacos convencionales ^{271,272} (**Tabla 2 – Anexo 2**). La técnica de la impresión molecular utilizado para sintetizar nanogeles a base de ácido metacrílico con capacidad de secuestrar e hidrolizar C6-HSL, de modo análogo a lactonasas artificiales ²²³ (**Tabla 2 – Anexo 2**). Por su parte, los dendrímeros han demostrado un elevado poder de inhibición de biopelículas y respuesta de QS en *P. aeruginosa* ²⁸⁰ y un estudio reciente ha revelado la capacidad del Poloxamer 407 para autoensamblarse espontáneamente en forma de micelas en cultivos de *S. marcescens*, a la vez que secuestra las AHLs del medio ²⁸³ (**Tabla 2 – Anexo 2**). Por su parte, las nanopartículas a base de polímeros naturales son candidatos ideales para aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades de biodegradabilidad, hidrosolubilidad, biocompatibilidad y biomimetismo. En concreto, las nanopartículas polisacarídicas a base de quitosano o alginato poseen gran potencial para convertirse en agentes de control microbiano de nueva generación en sinergia con agentes antimicrobianos convencionales o inhibidores de QS (**Tabla 2 – Anexo 2**) ^{273,275,276,278,279,284}. Las evidencias recientes de propiedades intrínsecas de polímeros y oligómeros tanto de quitosano como de alginato reafirma el elevado potencial de estos materiales para la interferencia con el *quorum* bacteriano ^{241,285–287}. El Epígrafe 2.9 de esta Introducción desarrolla en mayor profundidad los avances en el desarrollo de nanosistemas a base de quitosano para QQ, por ser objeto de estudio de esta tesis.

A pesar de la enorme versatilidad que ofrecen los nanosistemas como estrategias de QQ, la evaluación de sus problemas potenciales de seguridad y biocompatibilidad suponen un verdadero quebradero de cabeza. Un problema común de las nanopartículas es su agregación en el medio de cultivo o en condiciones fisiológicas. Incluso las nanopartículas con propiedades coloidales de estabilidad óptimas, pueden reaccionar con las proteínas extra e intracelulares y se han descrito mecanismos por los cuales las nanopartículas llegan a formar agregados con las propias bacterias ^{241,245}. La agregación en la superficie celular puede causar daños en la envoltura de las células, así como cambios de morfología, rugosidad y grosor de la pared o membranas celulares ^{241,245}. En general, la mayor preocupación en cuanto a la bioseguridad del uso de nanopartículas tiene que ver con su

mayor reactividad en comparación con los mismos materiales en rango de tamaño macro o micro y por su capacidad para alcanzar y distribuirse por gran variedad de órganos y tejidos, así como en el medio ambiente ^{227,233}. Por ello, la evaluación de la ecotoxicidad de los nanomateriales es de una urgencia equivalente a la de su seguridad sanitaria ²³³. El camino para la aprobación clínica y comercial del uso de nanotecnologías como agentes de control microbiano es, por tanto, largo y conlleva la evaluación pormenorizada de la multitud de interacciones celulares y moleculares en juego mediante el diseño de modelos *in vitro* e *in vivo* específicos ²²⁷.

2.6.1.5. Situación actual de la aplicación del *quorum quenching* en el desarrollo de fármacos:

La evidencia de la atenuación parcial de la virulencia de *P. aeruginosa* en modelos animales por medio de la inhibición de su mecanismo de QS se ha empleado como prueba de concepto del QQ para el desarrollo de sistemas antimicrobianos alternativos a los antibióticos tradicionales y ha marcado la línea de salida para la investigación y desarrollo de nuevas estrategias de control del *quorum*. Dentro de la problemática de la propagación de resistencias a antibióticos, las células persistentes representan la diana principal para el desarrollo de terapias efectivas. Estas células son altamente tolerantes a los antibióticos y son las principales responsables de las enfermedades infecciosas crónicas y de repetición. Algunos estudios han demostrado que la interferencia con el QS mediante tratamiento con furanonas brominadas puede ser efectivamente dirigida hacia las células persistentes y restaurar la sensibilidad a los tratamientos antibióticos en *P. aeruginosa* ^{174,288}. Esta evidencia abre la puerta a tratamientos similares para erradicar células persistentes en otras infecciones crónicas ¹⁶¹. Por otro lado, hoy se sabe que algunos antibióticos de uso habitual, como la azitromicina, son capaces de inhibir la señalización por QS en *P. aeruginosa*, lo cual podría implicar que muchos de los antibióticos que se utilizan en la actualidad ejerzan su actividad al menos parcialmente por medio de algún mecanismo de interferencia con el QS ¹⁶¹.

A pesar de la abultada evidencia de la efectividad de diversas estrategias de QQ *in vitro*^{2,157}, es importante tener en cuenta una serie de consideraciones a la hora de poner en práctica terapias de QQ efectivas. Por un lado, se podrían contemplar varios escenarios terapéuticos, bien la administración independiente de agentes de QQ como alternativa real a los antibióticos, bien como parte de terapias combinatorias con antibióticos tradicionales o como tratamiento meramente profiláctico^{157,161,165}. Por el momento, parece más realista la utilización combinada de agentes de QQ con antibióticos tradicionales. Esta sinergia podría promover la reducción de la virulencia por parte de los primeros, haciendo más susceptibles a los patógenos ante la respuesta inmune del hospedador y al efecto de los antibióticos. Por otro lado, es importante tener en cuenta una serie de eventualidades que se pueden dar en la administración *in vivo* de los agentes de QQ, como un potencial desencadenamiento de la respuesta inmune frente al propio inhibidor, o el efecto que este tipo de estrategias pueda tener sobre la flora comensal del organismo¹⁸⁸.

Uno de los principales obstáculos a la hora de hacer trasladar a la clínica candidatos de QQ es la falta de estandarización en los diferentes tipos de ensayos que aparecen publicados. Incluso entre aquellos estudios que se centran en una misma proteína diana, suele haber heterogeneidad en cuanto a las cepas bacterianas, medios de cultivo y tipos de ensayo empleados. En ocasiones, resulta complicado discernir si el efecto de QQ observado en los experimentos no enmascara incluye un efecto deletéreo sobre el crecimiento y el metabolismo celular^{2,289}. Por ello, resulta fundamental evaluar los efectos de la interferencia del QS sobre el crecimiento de bacterias en modelos de infección realistas y combinados con estudios metabolómicos y proteómicos y nuevas tecnologías basadas en microfluidos y órganos en chips¹⁶⁰. Además, un mismo agente de QQ puede tener efectos muy dispares en distintas cepas bacterianas, ya que factores como la estructura de la membrana celular, la regulación secundaria de la expresión génica o la presencia de ligandos competidores pueden afectar la actividad de un inhibidor concreto². Estos factores son importantes a la hora de identificar moduladores de QS tanto selectivos como de amplio espectro^{2,157,160}.

En los últimos años han surgido abundantes patentes y compañías biotecnológicas centradas en el desarrollo de estrategias de QQ^{157,290,291}. En cuanto a las aplicaciones clínicas del QQ, hasta la fecha, sólo se ha llevado a cabo un pequeño número de ensayos clínicos piloto con resultados prometedores, como es el caso de la aplicación de azitromicina como IQS en el tratamiento de neumonías asociadas a ventilación mecánica causadas por *P. aeruginosa*^{160,292}. Asimismo, la combinación del antibiótico tobramicina con compuestos IQS como furanona o ajoeno se ha revelado como una estrategia eficaz para mejorar la eliminación de infecciones causadas por *P. aeruginosa* en ratones^{160,293}. De forma similar, se ha probado que la aplicación de una lactonasa purificada junto con el antibiótico ciprofloxacina aumentaba de manera sinérgica la eficacia de cada uno de los dos agentes por separado en un modelo de infección de *P. aeruginosa* por quemaduras en ratas^{160,294}. A día de hoy parece más plausible que los agentes de QQ sean utilizados en la clínica dentro de tratamientos sinérgicos con antimicrobianos tradicionales, que en solitario^{160,161,164,165,216,295-298}. Sin embargo, algunos autores han propuesto la administración directa de enzimas de QQ a pacientes y ya se ha demostrado la eficacia *in vivo* de ciertas enzimas con buenos perfiles de estabilidad en condiciones fisiológicas de temperatura y pH. Ejemplo de ello es la preparación y estabilización de la acilasa PvdQ en forma de polvo seco inhalable para el tratamiento de infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa*²⁹⁹. De especial interés en la aplicación clínica de estrategias de QQ es el campo de la Odontología. El QS juega un papel fundamental en la regulación de la comunicación bacteriana, la competición interespecífica y la cooperación de la flora microbiana presente en la cavidad bucal y la convierte en una diana perfecta para la aplicación de agentes anti-QS, como las furanonas, para el control de patógenos periodontales y formación de biopelículas. De este tipo de enfoques han derivado ya las primeras patentes de uso de agentes de inhibidores de QS para aplicación odontológica clínica y en composiciones de cuidado oral¹⁶⁰.

En cuanto al desarrollo de vacunas anti-QS, un estudio pionero, se emplearon análogos 4-metoxifenil de AHLs capaces de inducir la producción de antibióticos específicos en ratones y éstos mostraron

capacidad de inhibir de forma específica la señalización mediada 3-oxo-dodecanoíl homoserín lactona (3-oxo-C12-HSL) y la producción de piocianina en cepas reporteras de *P. aeruginosa*²¹⁷. Esta estrategia de QQ basada en el uso de anticuerpos específicos de las AHLs de *P. aeruginosa* así como de señales de QS de otras cepas ha sido refinada y validada en estudios posteriores con modelos celulares y animales, demostrando una alta eficacia en la protección por inmunización contra los efectos tóxicos del proceso infeccioso, así como un aumento significativo de la tasa de supervivencia^{160,218,300}.

2.7. DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE BIOSENSORES DE QUORUM SENSING

Uno de los contribuyentes más importantes del auge de la investigación del QS y de las estrategias de QQ ha sido el desarrollo de cepas reporteras, que expresan fenotipos concretos en respuesta a señales de QS²⁸⁹. A medida que se fueron conociendo en mayor profundidad y en mayor cantidad las moléculas señal y los reguladores de QS empleados por diversos organismos, se fueron necesitando modelos donde testarlos. El desarrollo y puesta a punto de cepas reporteras de QS permitió estudiar las relaciones causa-efecto en circuitos de señalización mediados por AHLs y AI-2, las moléculas señal más estandarizadas en la filogenia bacteriana¹⁶⁸.

Existe gran variedad de sistemas biosensores, dependiendo de la naturaleza de las señales y/o de los reguladores de QS. Los biosensores más sencillos son los basados en tests colorimétricos, comúnmente aplicados directamente en agar semisólido en placas Petri. La especie más utilizada es *C. violaceum*, bien su cepa salvaje o cepas mutantes incapaces de producir la sintasa de AHL, las cuales permiten la identificación cualitativa de señales exógenas o competidoras por su capacidad de producir pigmento. La presencia de compuestos inhibidores se evidencia por la ausencia de pigmento en las proximidades de la zona de aplicación del compuesto y la inhibición del crecimiento en estas zonas de aplicación evidencia un posible efecto antibiótico del compuesto^{301,302}. También son habituales los biosensores basados en la expresión de β -galactosidasa, como la cepa recombinante de *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pZLR4);^{19,160,303,304}. Otro tipo de modelos se centran en evaluar el efecto de los compuestos

de interés (*i.e.*, señales o antagonistas) sobre fenotipos concretos de QS, como son los tests de motilidad de *Yersinia enterocolitica*, la producción de piocianina y pioverdina en *P. aeruginosa* o los modelos de formación de biopelículas ¹⁶⁰.

El desarrollo de biosensores recombinantes de circuitos de tipo LuxI-R ha resultado crucial para el estudio del QS mediado por AHLs. Éstos normalmente portan plásmidos reporteros de la actividad luciferasa o de fluorescencia ^{302,305-311}. En la mayoría de biosensores de AHLs, los genes codificantes de los homólogos de LuxR están fusionados a promotores *lux*, de *A. fischeri* o *Photobacterium luminescens*, o *lacZ*, de *E. coli*. Normalmente carecen de la sintasa de la señal y expresan únicamente la proteína reguladora que, a su vez controla la expresión de otro gen reportero. De esta manera, la actividad del promotor está inducida únicamente por señales exógenas y la expresión de los genes reporteros es proporcional a la concentración de señal. Los biosensores son así una versión simplificada del circuito natural de QS con fenotipos fácilmente identificables por inducción. La cepa reportera, normalmente apagada en ausencia de AHLs, se enciende cuando se pone en contacto con AHLs exógenas. Además, gracias a la disponibilidad de sistemas automatizados para la medida de bioluminiscencia, fluorescencia y densidad óptica, es posible llevar a cabo el monitoreo de la actividad de la respuesta de QS a tiempo real y durante todo el crecimiento del cultivo. La sensibilidad de los sensores de tipo *lux* para detectar AHLs en concentraciones en el rango nano- y picomolar es otra de sus ventajas fundamentales frente a otras técnicas analíticas, como HPLC aun cuando se acoplan a las formas más sensibles de detección como MS ^{13,48,301,304,305,308,312}.

Las variaciones estructurales en la cadena acilada de las AHLs afectan de forma drástica su unión a las proteínas LuxR. Por ejemplo, en *A. fischeri*, aunque otras AHLs distintas a la 3-oxo-C6-HSL puedan actuar como agonistas, el ligando natural es el más efectivo ^{307,313}. Las cepas biosensoras son, por tanto, sensibles a una serie concreta de moléculas señal y, en ocasiones, análogos de las mismas. La cepa de *C. violaceum* CV026 es sensible a AHLs de cadena corta (4-6 átomos de carbono), la de *E. coli* JM109 (pSB410) lo es a AHLs de entre 6-8 carbonos; y por su parte las cepas *E. coli* JM109 (pSB1075), *A.*

tumefaciens NT1 (traR, tra::lacZ749), *Sinorhizobium meliloti* Rm41 sinI::lacZ (pJNSinR) o *C. violaceum* VIR24 detectan AHLs de más de 10 átomos de carbono ¹⁶⁸.

Sin obviar su papel crucial en la comprensión de los fundamentos del QS, el rol por excelencia de las cepas biosensoras es la detección de nuevos agentes de interferencia. La literatura acerca de las propiedades anti-QS de diversos compuestos es tan abultada y es tal la variedad de fenotipos estudiados de cepas reporteras y condiciones experimentales, que resulta complicado trasladar los resultados obtenidos *in vitro* para muchos de estos agentes a las condiciones naturales ²⁰⁹.

En este sentido, el desarrollo de protocolos de cribado estandarizados cobra gran importancia. En un exhaustivo análisis comparativo, Moore *et al.* ²⁰⁹ han logrado contrastar la efectividad de una batería de antagonistas del QS de *P. aeruginosa* descritos en la bibliografía. Para ello, desarrollaron un protocolo estandarizado en tres fases: en la primera, comparaban las actividades de estos agentes en una cepa fluorescente de *P. aeruginosa* dependiente de LasR de *P. aeruginosa* pero incapaz de producir la sintasa de AHL; en la segunda fase, re-testaban estos mismos compuestos en una cepa recombinante de *E. coli* reportera de actividad β -galactosidasa controlada por LasR con el fin de demostrar su actividad directa sobre el regulador. En una última fase, analizaban los efectos de los compuestos sobre fenotipos concretos de QS en la cepa salvaje de *P. aeruginosa*. Este tipo de protocolos permiten así evaluar los efectos de los agentes de interés sobre los distintos mecanismos que influyen en la actividad de los reguladores de tipo LuxR, tanto en cepas recombinantes como salvajes, incluyendo la posible existencia de bombas activas de expulsión, la sobreexpresión del receptor en cepas recombinantes, las interacciones competitivas o no competitivas entre señales y antagonistas, entre otros factores ²⁰⁹. Por otro lado, una limitación importante para la validación y optimización de los biosensores es el poder discernir si los fenotipos de QS son independientes de la propia actividad metabólica de la célula. Por ejemplo, muchas de estas cepas reporteras están basadas en la producción de bioluminiscencia en respuesta a las señales de QS. Sin embargo, la bioluminiscencia es co-dependiente de la actividad metabólica de la célula ya que la reacción de la luciferasa precisa de

gran aporte de energía. Esta situación se plantea asimismo con otros biosensores basados en fenotipos como la actividad β -galactosidasa o producción de proteína fluorescente verde (GFP; por sus siglas en inglés). Además, es posible que en la evaluación de compuestos candidatos para la interferencia con QS, éstos interactúen a nivel del propio fenotipo (*e. g.* con el plegamiento de la proteína reportera, secuestro de la fluorescencia, etc), en lugar de hacerlo con el circuito de regulación del mismo²⁸⁹. Estos controles pasarían por identificar las actividades de los compuestos de interés a concentraciones sub-inhedoras, sus efectos agudos y prolongados sobre las cinéticas de crecimiento del biosensor, análisis proteómicos o transcriptómicos del efecto de estos compuestos o la evaluación de los mismos sobre cepas control, donde el fenotipo reportero se expresa de forma constitutiva y es independiente del QS²⁸⁹. Una solución elegante para solventar esta problemática ha sido planteada en forma de biosensores que permiten identificar compuestos inhibidores del QS y descartar sus efectos perjudiciales sobre el crecimiento de las células. Estos biosensores, denominados sistemas selectores de inhibidores de QS (QSI; por sus siglas en inglés), portan un gen codificante de una proteína letal unido a un promotor de QS y/o un gen de resistencia a un antibiótico controlado por un represor a su vez regulado por el promotor de QS. En estos sistemas, el QS da lugar a la detención del crecimiento y muerte celular. Además, en presencia de AHL, la expresión del gen de resistencia al antibiótico estará bloqueada por la producción del represor, lo cual da lugar a inhibición del crecimiento en presencia del antibiótico. Cuando se aplica una molécula inhibidora del QS no tóxica, el biosensor será capaz de crecer, ya que inhibirá la producción de la proteína letal y/o el represor. De este modo, las células pueden crecer en presencia de AHL únicamente si también están presentes moléculas con actividad QQ y no tóxicas^{160,199,289}.

La optimización genética de los biosensores ha permitido desarrollar nuevas herramientas de monitoreo de señales y agentes de QQ con alto rendimiento y sensibilidad. En este aspecto, la Biología Sintética ha permitido optimizar y estandarizar, por medio de ingeniería genética y compuertas lógicas moleculares, numerosos módulos de QS^{199,211,314-316}. Las aplicaciones de estos módulos sintéticos van desde una

mayor comprensión de los aspectos moleculares fundamentales de los circuitos de QS, a la creación de relojes y osciladores moleculares o biosensores de QS estandarizados; que pueden ser empleados para la detección de biomarcadores de importancia clínica, ambiental o industrial^{22,314,316,317}. Por otro lado, el desarrollo de chasis sintéticos de transcripción y traducción libres de células ha ganado popularidad en los últimos años. Éstos consisten en una suspensión tampón de un lisado celular que contiene la maquinaria celular, energía y recursos necesarios para permitir la transcripción y traducción de un patrón de ADN codificante para una proteína de QS de interés. Este tipo de sensores sintéticos se han utilizado como herramientas de cribado de señales y antagonistas de QS, así como para el análisis de señales de QS en muestras clínicas^{316,318}.

2.8. EL QUITOSANO COMO AGENTE DE CONTROL ANTIMICROBIANO Y SUS APLICACIONES EN LA INTERFERENCIA CON EL *QUORUM SENSING*

El quitosano (CS, del inglés; chitosan) es un aminopolisacárido lineal derivado de la desacetilación parcial de la quitina. La quitina es ubicua, toda vez que es el polisacárido estructural del exoesqueleto de artrópodos y la pared celular de los hongos, además se encuentra en el gladius (pluma) de cefalópodos, microalgas y en otros organismos. Junto con la celulosa y otros polisacáridos, la quitina es uno de los biopolímeros de mayor abundancia y tasa de recambio en la biosfera.

El término quitosano engloba en realidad a una familia de copolímeros de unidades 2-acetilamino-2-desoxi-D-glucosa y 2-amino-2-desoxi-D-glucosa, unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4) (en la **Lámina 8** representadas como unidades x e y , respectivamente) el contenido relativo de las unidades acetiladas, x , frente al total ($x+y$), se conoce como grado de acetilación. El grado y patrón de acetilación, así como el grado de polimerización del CS son parámetros determinantes de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del CS^{319,320}. El grado de polimerización puede variar entre ~ 20 y >1000 kDa, el grado de acetilación entre 0 y $\sim 70\%$ y el patrón de acetilación desde completamente aleatorio hasta organizarse en bloques de unidades

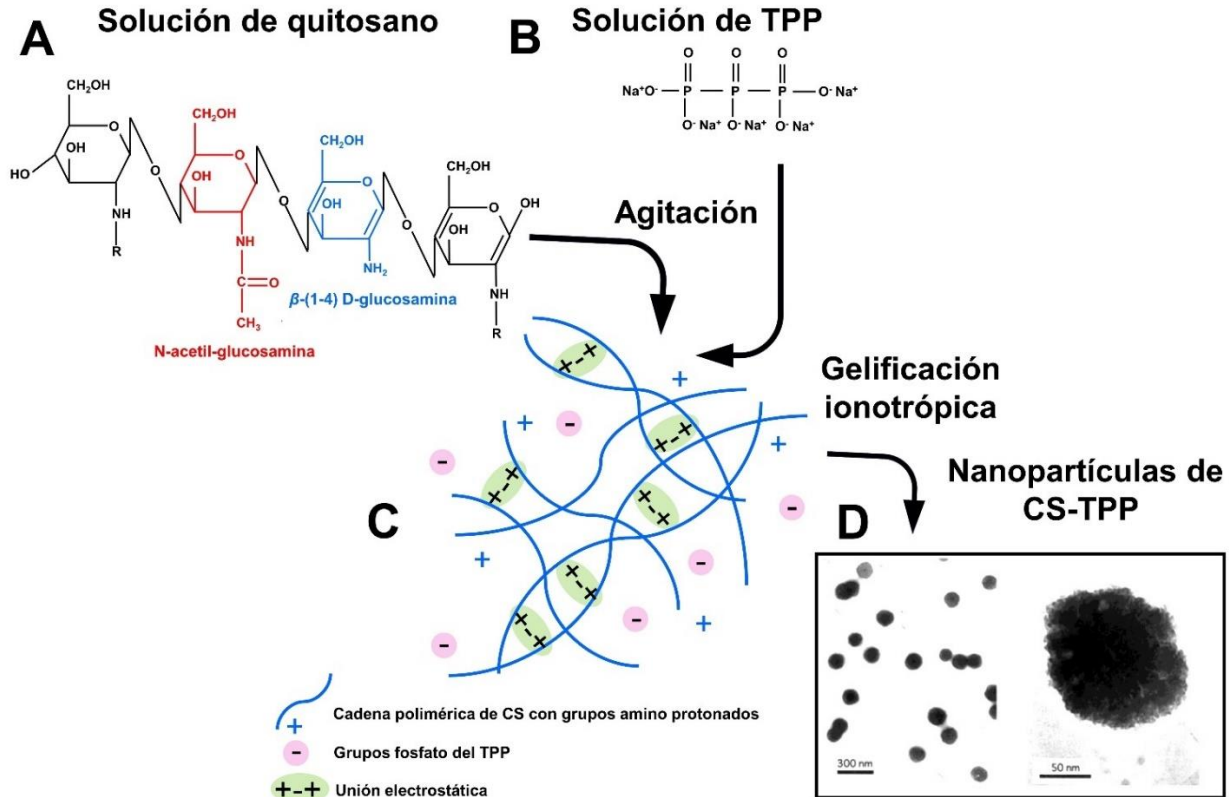


Lámina 8. Preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica con tripolifosfato de sodio

Leyenda Lámina 8: Preparación de nanopartículas de quitosano por gelificación ionotrópica con tripolifosfato de sodio. A. Estructura química del quitosano (CS). La abundancia relativa de residuos N-acetil-glucosamina y β-(1-4) D-glucosamina determina que el CS sea estructuralmente más o menos próximo a la quitina, de la cual deriva por desacetilación parcial ³⁴⁸. B. Estructura química del tripolifosfato de sodio (TPP). C-D. La mezcla física del CS y el TPP en solución acuosa y bajo agitación da lugar a la reticulación iónica de las cadenas protonadas del CS con los aniones fosfato del TPP y la formación espontánea de nanopartículas mediante el proceso conocido como gelificación ionotrópica ³⁴⁹. La figura es una adaptación de Ostrowska-Czubenko *et al.* (*J Polym Res* **22**, 153 (2015)). Con licencia Creative Commons ³⁵⁰. El panel D muestra una micrografía TEM característica de nanopartículas de CS:TPP de nuestro Grupo de Investigación, cedida por Francisco M. Goycoolea.

repetidas ^{285,321,322}. A diferencia de la quitina, el CS es soluble en solventes acuosos acidificados, donde posee carga positiva por protonación de sus grupos amino, lo cual le confiere la capacidad de interactuar electrostáticamente con moléculas aniónicas, así como propiedades gelificantes y de formación de películas. Las propiedades físico-químicas del CS dependen sobre todo de su peso molecular, grado y patrón de acetilación ^{323,324 321,325}.

El CS es uno de los biopolímeros funcionales más versátiles tanto en aplicaciones establecidas como investigación en curso en áreas tan diversas como la ciencia de materiales, industria alimentaria, agricultura, biomedicina o tecnología farmacéutica y ha sido objeto de miles de artículos de investigación en los últimos años ^{319,324,326–328}. Además, el CS se obtiene principalmente de desechos de exoesqueletos de crustáceos; los cuales se generan en decenas de miles de toneladas diarias en todo el mundo a partir del procesado industrial de mariscos (*e. g.*, cabeza y caparazón de langostino, gamba, caparazón de cangrejo, etc.), y es por tanto un material enormemente interesante desde el punto de vista del reciclaje y la explotación sostenible de recursos naturales ^{328,329}. En el campo del desarrollo de fármacos, el CS resulta especialmente interesante gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad ^{330,331}, capacidades de mucoadhesión y actividad promotora de la absorción de fármacos e interacción con membranas celulares ^{323,332–335}. Además, posee capacidades antimicrobiana y moduladora de procesos inflamatorios, cicatrizantes e inmunológicos ^{336–343}. Estos atributos combinados con su elevada versatilidad para

formar macro-, micro- o nanoestructuras (geles, *films*, fibras, micro- y nanopartículas, entre otras) le confieren gran efectividad para el soporte y protección de fármacos y moléculas activas, así como para optimizar el tiempo de liberación, circulación en sangre y absorción, mejorando los perfiles de biodisponibilidad y efectividad de las mismas ^{319,323,324,329,344-347}. Por otro lado, la modificación química y funcionalización, así como la conjugación con otros polímeros bioactivos, (*e. g.*, ácido hialurónico); puede conferir al CS propiedades añadidas, como la sensibilidad al pH y a la temperatura y su capacidad de vectorización a dianas específicas, optimizando la liberación y los efectos terapéuticos del fármaco y reduciendo los efectos secundarios y la toxicidad del mismo ^{319,323,324,330}.

En particular, las nanopartículas de CS han recibido una enorme atención en las últimas dos décadas. Éstas ofrecen una serie de ventajas que las hacen excelentes soportes para la protección, vehiculización y liberación controlada de fármacos y otras moléculas activas; incluyendo proteínas, material genético, fármacos antitumorales, antibióticos o vacunas ^{319,323,351,352}. Además, las nanopartículas de CS ofrecen gran versatilidad para ser administradas por diversas vías, como la oral, nasal, intravenosa, ocular o pulmonar, entre otras ^{319,323,324,329,353}. Además, por su alta relación superficie/volumen, las nanopartículas suelen presentar una mayor capacidad para escapar del reconocimiento por las proteínas del plasma y macrófagos, incrementando su tiempo de circulación *in vivo*. Por otro lado, son susceptibles de funcionalización química superficial, lo cual favorece su vectorización e interacción con las células diana ^{323,324,329,351,353-355}. Los mecanismos de preparación de nanopartículas de CS suelen tener lugar en condiciones suaves e incluyen procesos como la microemulsión, coacervación, nanoprecipitación o la gelificación iónica ^{319,323,329}. Este tipo de procesos de tipo ascendente (en inglés, *bottom-up*) tienen lugar como resultado de las interacciones inter- o intramoleculares de las cadenas poliméricas, las cuales se ensamblan en estructuras nanoscópicas ³¹⁹. El método de la gelificación iónica es uno de los más extendidos en la práctica, gracias a su simplicidad y a sus condiciones suaves de preparación, evitando altas temperaturas, solventes abrasivos o procesos mecánicos que pueden dañar las moléculas activas o

complicar la fabricación de nanopartículas a escala industrial^{319,329}. La gelificación iónica -o ionotrópica- del CS se basa en las interacciones electrostáticas entre los productos de disociación del TPP (fosfatos $P_3O_{10}^{-5}$ y $HP_3O_{10}^{-4}$) y los grupos amino del CS (NH_3^+), en medio acuoso y bajo agitación suave^{319,329 356355}. (**Lámina 8**). El ensamblaje de las nanoestructuras tiene lugar de forma espontánea tras la mezcla física del CS y el TPP, pero la evolución del tamaño y su estabilidad coloidal dependen enormemente del pH y la fuerza iónica del medio, así como de las características intrínsecas del CS (grado de acetilación y peso molecular) y la proporción relativa de CS frente a TPP^{319,329,357-362 356355}. En general, en poblaciones estables de nanopartículas, el diámetro medio (promedio-Z) de partícula suele oscilar entre 100 y 350 nm y su potencial ζ entre +20 y +50 mV³¹⁹³⁵⁷. Además de la reticulación iónica, se pueden utilizar entrecruzantes covalentes en la preparación de nanopartículas de CS tales como el glutaraldehído, o la genipina, entre otros. Dicho entrecruzamiento les confiere propiedades añadidas de estabilidad, capacidad de liberación controlada del cargo o respuesta a pH^{319,353,363,364}.

El CS está catalogado por la la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU), como compuesto *GRAS* (del inglés; *generally recognized as safe*) y, por tanto, potencialmente seguro^{330,365}. Su uso está aprobado en numerosos países de la UE, en EEUU y Japón, entre otros, como suplemento dietético, ingrediente básico para uso agrícola, y como componente de dispositivos médicos tales como vendajes y apósitos para cicatrización de heridas, hilo quirúrgico, entre otros; así como para el procesado y preservación de alimentos y para uso en cosmética^{328,365-368}. La aprobación por parte de las agencias reguladoras del CS como excipiente y sistema de administración de fármacos se encuentra en una situación compleja. Esto se debe a que las propiedades físicoquímicas (peso molecular, grado y patrón de acetilación, pureza, cristalinidad, etc) de los quitosanos varían enormemente según su origen o la forma en la que han sido modificados. Además, la estructura macro-, micro- o nanoscópica en la que estén preparados los sistemas a base de CS influye dramáticamente en su mecanismo de acción, toxicidad, biodistribución o interacción a nivel de los tejidos^{328,330}. A pesar de estas limitaciones, existe gran

expectación por el salto al mercado de formulaciones a base de CS para liberación de fármacos. En este sentido, las plataformas a base de quitosano ChiSys[®] y Rylomine[®], para administración nasal de vacunas y morfina, respectivamente, se encuentran en fase de ensayos clínicos^{323,328}. Recientemente, en respuesta al brote del virus SARS-COV-2 y la pandemia COVID-19, han surgido empresas avocadas a la comercialización de nanopartículas de quitosano cargadas con fármacos antiinflamatorios con actividad para bloquear receptores ACE2 (p.ej. Losartan[®]) para la administración pulmonar en forma de aerosol (Novochizol[®], www.novochizol.ch).

Dentro del área de la Microbiología, el CS es ampliamente reconocido por sus propiedades antimicrobiana y bacteriostática. Estas capacidades parecen estar influenciadas por el peso molecular, grado y patrón de acetilación del CS^{285,341}. La capacidad antimicrobiana del CS ha sido explotada en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética y textil, así como en aplicaciones agrícolas o el tratamiento de aguas^{285,339,369}. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual el CS ejerce su acción antimicrobiana no ha sido completamente esclarecido^{243,339,352,370-377}. La enorme heterogeneidad entre distintas muestras de CS hace muy complicado estandarizar las conclusiones derivadas de distintos estudios^{243,285,339,369,376}. Además de las características intrínsecas del CS, su actividad antimicrobiana depende de numerosos factores bióticos y abióticos, entre ellos las características de la cubierta celular de los microorganismos, el pH o la temperatura^{285,369}. La capacidad antibacteriana del CS ha sido relacionada tradicionalmente con la habilidad de los grupos NH_3^+ para unirse a las membranas celulares, aniónicas, y promover la rotura de éstas y la pérdida de contenidos celulares^{243,374}. Algunos autores han propuesto además que el CS podría actuar como agente quelante de elementos traza o incluso interferir directamente con el ADN celular, dando lugar a efectos metabólicos nocivos y/o arresto del crecimiento de la célula³³⁹. Recientemente, un estudio de Jeon *et al.*²⁴³ ha revelado algunos de los mecanismos moleculares que definen la actividad antibacteriana del CS. Este estudio ha demostrado que el CS interactúa directamente con proteínas de la membrana externa en bacterias Gram negativas, específicamente con la proteína OmpA, que juega un papel muy

importante en la manutención de la integridad de la membrana celular. Sus evidencias son consistentes con un estudio previo de Helander *et al.*³⁷⁶, donde mostraban la interacción del CS con la membrana externa de bacterias Gram negativas. Además, se ha demostrado que el CS induce la agregación celular en bacterias^{241,285,378}.

A pesar de las cualidades arriba enumeradas, la aplicación de nanopartículas a base de CS como estrategia de interferencia con el QS todavía se encuentra en su infancia. Diversos autores han demostrado una actividad de QQ incrementada para compuestos antagonistas conocidos, como el cinnamaldehído, la capsaicina, kaempferol, quercetina; ácido ferúlico o baicaleína, cuando éstos son incorporados en nanopartículas, nanocápsulas o films a base de CS^{273,275,276,278,284,379,380} (ver también **Tabla 2-Anexo 2**). Asimismo, Piras *et al.*³⁸¹ han desarrollado recientemente nanopartículas de CS reticuladas covalentemente con genipina, un entrecruzante de origen natural, optimizadas y diseñadas para dirigirse a receptores específicos de la membrana externa de *Helicobacter pylori* y liberar amoxicilina de manera controlada y dependiente del pH, de manera significativamente más eficaz que la administración tradicional del antibiótico. Sin embargo, únicamente un par de referencias recientes han investigado la influencia directa que las nanopartículas de CS pueden ejercer sobre el QS. Uno de estos estudios ha demostrado el efecto inhibitor de nanopartículas preparadas a base de CS sobre la formación de biopelículas, regulada por QS, en ciertos patógenos periodontales³⁷⁷. Dos estudios más recientes llevadas a cabo en nuestro grupo de investigación por Qin *et al.*^{241,285} demuestran la capacidad de nanocápsulas y nanopartículas de CS para unirse a células bacterianas, promover la agregación celular y atenuar la respuesta de QS en una cepa biosensora de *E. coli*.

2.9. REFERENCIAS

- (1) Otero Casal, A. M., Muñoz Crego, A., Bernárdez Hermida, M.I., Fábregas Casal, J. (2004). "Quorum Sensing": El Lenguaje de Las Bacterias. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- (2) Galloway, W. R. J. D.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Welch, M.; Spring, D. R. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 28–67.
- (3) Urbanczyk, H.; Ast, J. C.; Higgins, M. J.; Carson, J.; Dunlap, P. V. Reclassification of *Vibrio Fischeri*, *Vibrio Logei*, *Vibrio Salmonicida* and *Vibrio Wodanis* as *Aliivibrio Fischeri* Gen. Nov., Comb. Nov., *Aliivibrio Logei* Comb. Nov., *Aliivibrio Salmonicida* Comb. Nov. and *Aliivibrio Wodanis* Comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57* (Pt 12), 2823–2829.
- (4) Nealon, K. H. Autoinduction of Bacterial Luciferase. *Arch. Microbiol.* **1977**, *112* (1), 73–79.
- (5) Engebrecht, J.; Nealon, K.; Silverman, M. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio Fischeri*. *Cell* **1983**, *32*, 773–781.
- (6) Eberhard, A.; Burlingame, A. L.; Eberhard, C.; Kenyon, G. L.; Nealon, K. H.; Oppenheimer, N. J. Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium Fischeri* Luciferase. *Biochemistry* **1981**, *20* (9), 2444–2449.
- (7) Nealon, K. H.; Platt, T.; Hastings, J. W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **1970**, *104* (1), 313–322.
- (8) Engebrecht, J.; Silverman, M. Identification of Genes and Gene Products Necessary for Bacterial Bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (13), 4154–4158.
- (9) Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (2), 269–275.
- (10) Pearson, J. P.; Van Delden, C.; Iglewski, B. H. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas Aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (4), 1203–1210.
- (11) Gambello, M. J.; Iglewski, B. H. Cloning and Characterization of the *Pseudomonas Aeruginosa* LasR Gene, a Transcriptional Activator of Elastase Expression. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (9), 3000–3009.
- (12) Latifi, A.; Foglino, M.; Tanaka, K.; Williams, P.; Lazdunski, A. A Hierarchical Quorum-Sensing Cascade in *Pseudomonas Aeruginosa* Links the Transcriptional Activators LasR and RhlR (VsmR) to Expression of the Stationary-Phase Sigma Factor RpoS. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21* (6), 1137–1146.
- (13) Bainton, N. J.; Bycroft, B. W.; Chhabra, S. R.; Stead, P.; Gledhill, L.; Hill, P. J.; Rees, C. E. D.; Winson, M. K.; Salmond, G. P. C.; Stewart, G. S. A. B.; Williams, P. A General Role for the Lux Autoinducer in Bacterial Cell Signalling: Control of Antibiotic Biosynthesis in *Erwinia*. *Gene* **1992**, *116* (1), 87–91.
- (14) Beck von Bodman, S.; Farrand, S. K. Capsular Polysaccharide Biosynthesis and Pathogenicity in *Erwinia Stewartii* Require Induction by an N-Acylhomoserine Lactone Autoinducer. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (17), 5000–5008.
- (15) Byers, J. T.; Lucas, C.; Salmond, G. P. C.; Welch, M. Nonenzymatic Turnover of an *Erwinia Carotovora* Quorum-Sensing Signaling Molecule. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (4), 1163–1171.

- (16) Piper, K. R.; von Bodman, S. B.; Farrand, S. K. Conjugation Factor of *Agrobacterium Tumefaciens* Regulates Ti Plasmid Transfer by Autoinduction. *Nature* **1993**, *362* (6419), 448–450.
- (17) Eberl, L.; Winson, M. K.; Sternberg, C.; Stewart, G. S.; Christiansen, G.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B.; Williams, P.; Molin, S.; Givskov, M. Involvement of N-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers in Controlling the Multicellular Behaviour of *Serratia Liquefaciens*. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20* (1), 127–136.
- (18) Lithgow, J. K.; Wilkinson, A.; Hardman, A.; Rodelas, B.; Wisniewski-Dye, F.; Williams, P.; Downie, J. A. The Regulatory Locus *CinRI* in *Rhizobium Leguminosarum* Controls a Network of Quorum-Sensing Loci. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37* (1), 81–97.
- (19) Fuqua, C.; Winans, S. C. Localization of *OccR*-Activated and *TraR*-Activated Promoters That Express Two ABC-Type Permeases and the *TraR* Gene of Ti Plasmid PTiR10. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20* (6), 1199–1210.
- (20) Whitehead, N. A.; Barnard, A. M.; Slater, H.; Simpson, N. J.; Salmond, G. P. Quorum-Sensing in Gram-Negative Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25* (4), 365–404.
- (21) Hastings, J. W.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing: The Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (9), 2667–2668.
- (22) McDaniel, R.; Weiss, R. Advances in Synthetic Biology : On the Path from Prototypes to Applications. **2005**, 476–483.
- (23) Goryachev, A. B.; Toh, D. J.; Lee, T. Systems Analysis of a Quorum Sensing Network: Design Constraints Imposed by the Functional Requirements, Network Topology and Kinetic Constants. *Biosystems* **2006**, *83* (2–3), 178–187.
- (24) Gorochowski, T. E.; Matyjaszkiewicz, A.; Todd, T.; Oak, N.; Kowalska, K.; Reid, S.; Tsaneva-Atanasova, K.; Savery, N. J.; Grierson, C. S.; di Bernardo, M. BSim: An Agent-Based Tool for Modeling Bacterial Populations in Systems and Synthetic Biology. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42790.
- (25) Cugini, C.; Kolter, R.; Hogan, D. A. Interdomain Cross Talk. In *Chemical Communication among Bacteria*; American Society of Microbiology, 2008; pp 419–429.
- (26) Hartmann, A.; Schikora, A. Quorum Sensing of Bacteria and Trans-Kingdom Interactions of N-Acyl Homoserine Lactones with Eukaryotes. *J. Chem. Ecol.* **2012**, *38* (6), 704–713.
- (27) Cohen, O.; Keselman, A.; Moses, E.; Martinez, M. R.; Soriano, J.; Tlusty, T. Quorum Percolation in Living Neural Networks. *Epl* **2010**, *89* (1), 18008.
- (28) Prindle, A.; Liu, J.; Asally, M.; Ly, S.; Garcia-Ojalvo, J.; Suel, G. M. Ion Channels Enable Electrical Communication in Bacterial Communities. *Nature* **2015**, *527* (7576), 59–63.
- (29) Hickson, J.; Diane Yamada, S.; Berger, J.; Alverdy, J.; O’Keefe, J.; Bassler, B.; Rinker-Schaeffer, C. Societal Interactions in Ovarian Cancer Metastasis: A Quorum-Sensing Hypothesis. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *26* (1), 67–76.
- (30) Agur, Z.; Kirnasovsky, O. U.; Vasserman, G.; Tencer-Hershkovicz, L.; Kogan, Y.; Harrison, H.; Lamb, R.; Clarke, R. B. *Dickkopf1* Regulates Fate Decision and Drives Breast Cancer Stem Cells to Differentiation: An Experimentally Supported Mathematical Model. *PLoS One* **2011**, *6* (9), e24225–e24225.
- (31) Turovskiy, Y.; Kashtanov, D.; Paskhover, B.; Chikindas, M. L. Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, *62*, 191–234.
- (32) Darch, S. E.; West, S. A.; Winzer, K.; Diggle, S. P. Density-Dependent Fitness

- Benefits in Quorum-Sensing Bacterial Populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (21), 8259–8263.
- (33) Hense, B. A.; Kuttler, C.; Müller, J.; Rothballer, M.; Hartmann, A.; Kreft, J. Opinion-Does Efficiency Sensing Unify Diffusion and Quorum Sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (3), 230–239.
- (34) Platt, T. G.; Fuqua, C. What's in a Name? The Semantics of Quorum Sensing. *Trends Microbiol.* **2010**, *18* (9), 383–387.
- (35) Redfield, R. J. Is Quorum Sensing a Side Effect of Diffusion Sensing? *Trends Microbiol.* **2002**, *10* (8), 365–370.
- (36) West, S. A.; Winzer, K.; Gardner, A.; Diggle, S. P. Quorum Sensing and the Confusion about Diffusion. *Trends Microbiol.* **2012**, *20* (12), 586–594.
- (37) Xavier, K. B.; Bassler, B. L. LuxS Quorum Sensing: More than Just a Numbers Game. *Curr Opin Microbiol.* **2003**, *6*.
- (38) Kempner, E. S.; Hanson, F. E. Aspects of Light Production by Photobacterium Fischeri. *J. Bacteriol.* **1968**, *95* (3), 975–979.
- (39) Stone, M. Small Talk: The Evolution of Bacterial Languages. *Bioscience* **2015**.
- (40) Trosko, J. E. Evolution of Microbial Quorum Sensing to Human Global Quorum Sensing: An Insight into How Gap Junctional Intercellular Communication Might Be Linked to the Global Metabolic Disease Crisis. *Biology (Basel)*. **2016**, *5* (2), 29.
- (41) Stacy, A. R.; Diggle, S. P.; Whiteley, M. Rules of Engagement: Defining Bacterial Communication. *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, *15* (2), 155–161.
- (42) Joshi, P.; Wadhvani, T.; Bahale, P.; Kothari, V. Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing. *IUP J. Life Sci.* **2010**, *4* (1).
- (43) Czárán, T.; Hoekstra, R. F. Microbial Communication, Cooperation and Cheating: Quorum Sensing Drives the Evolution of Cooperation in Bacteria. *PLoS One* **2009**, *4* (8), e6655.
- (44) Bassler, B. L. How Bacteria Talk to Each Other: Regulation of Gene Expression by Quorum Sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 582–587.
- (45) Taga, M. E.; Bassler, B. L. Chemical Communication among Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (2), 14549–14554.
- (46) von Bodman, S. B.; Willey, J. M.; Diggle, S. P. Cell-Cell Communication in Bacteria: United We Stand. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (13), 4377–4391.
- (47) Bassler, B. L.; Losick, R. Bacterially Speaking. *Cell* **2006**, *125* (2), 237–246.
- (48) Atkinson, S.; Sockett, R. E.; Cámara, M.; Williams, P. Quorum Sensing and the Lifestyle of Yersinia. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2006**, *8* (1), 1–10.
- (49) Henke, J. M.; Bassler, B. L. Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in Vibrio Harveyi. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*.
- (50) Winans, S. C.; Bassler, B. L. Mob Psychology. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (4), 873–883.
- (51) Atkinson, S.; Chang, C.-Y.; Sockett, R. E.; Cámara, M.; Williams, P. Quorum Sensing in Yersinia Enterocolitica Controls Swimming and Swarming Motility. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (4), 1451–1461.
- (52) Cámara, M.; Williams, P.; Hardman, A. Controlling Infection by Tuning in and Turning down the Volume of Bacterial Small-Talk. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *2* (11), 667–676.
- (53) Ng, W. L.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Ann Rev Genet* **2009**, *43*, 197–222.
- (54) Stevens, A. M.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in Vibrio Fischeri: Essential Elements for Activation of the Luminescence Genes. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (2), 557–562.

- (55) Whitaker, R. D.; Pember, S.; Wallace, B. C.; Brodley, C. E.; Walt, D. R. Single Cell Time-Resolved Quorum Responses Reveal Dependence on Cell Density and Configuration. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (24), 21623–21632.
- (56) Melke, P.; Sahlin, P.; Levchenko, A.; Jönsson, H. A Cell-Based Model for Quorum Sensing in Heterogeneous Bacterial Colonies. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (6), e1000819.
- (57) Hense, B. A.; Kuttler, C.; Müller, J.; Rothballer, M.; Hartmann, A.; Kreft, J.-U. Opinion - Does Efficiency Sensing Unify Diffusion and Quorum Sensing? *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (3), 230–239.
- (58) Boyer, M.; Wisniewski-Dyé, F. Cell-Cell Signalling in Bacteria: Not Simply a Matter of Quorum. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *70* (1), 1–19.
- (59) Dunlap, P. V.; Ray, J. M. Requirement for Autoinducer in Transcriptional Negative Autoregulation of the *Vibrio Fischeri* LuxR Gene in *Escherichia Coli*. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (6), 3549–3552.
- (60) Dunlap, P. V.; Greenberg, E. P. Control of *Vibrio Fischeri* Luminescence Gene Expression in *Escherichia Coli* by Cyclic AMP and Cyclic AMP Receptor Protein. *J. Bacteriol.* **1985**, *164* (1), 45–50.
- (61) Ball, A. S.; Chaparian, R. R.; Kessel, J. C. van. Quorum Sensing Gene Regulation by LuxR/HapR Master Regulators in Vibrios. *J. Bacteriol.* **2017**, *199* (19), e00105-17.
- (62) Dilanji, G. E.; Langebrake, J. B.; De Leenheer, P.; Hagen, S. J. Quorum Activation at a Distance: Spatiotemporal Patterns of Gene Regulation from Diffusion of an Autoinducer Signal. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (12), 5618–5626.
- (63) Atkinson, S.; Williams, P. Quorum Sensing and Social Networking in the Microbial World. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6* (40), 959–978.
- (64) Rémy, B.; Mion, S.; Plener, L.; Elias, M.; Chabrière, E.; Daudé, D. Interference in Bacterial Quorum Sensing: A Biopharmaceutical Perspective. *Frontiers in Pharmacology*. 2018.
- (65) Lupp, C.; Urbanowski, M.; Greenberg, E. P.; Ruby, E. G. The *Vibrio Fischeri* Quorum-Sensing Systems Ain and Lux Sequentially Induce Luminescence Gene Expression and Are Important for Persistence in the Squid Host. *Mol Microbiol* **2003**, *50* (1), 319–331.
- (66) Swift, S.; Throup, J.; Bycroft, B.; Williams, P.; Stewart, G. Quorum Sensing: Bacterial Cell-Cell Signalling from Bioluminescence to Pathogenicity. In *Molecular Microbiology*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1998; pp 185–207.
- (67) Schuster, M.; Joseph Sexton, D.; Diggle, S. P.; Peter Greenberg, E. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. *Annu. Rev. Microbiol.* **2013**, *67* (1), 43–63.
- (68) Heeb, S.; Fletcher, M. P.; Chhabra, S. R.; Diggle, S. P.; Williams, P.; Cámara, M. Quinolones: From Antibiotics to Autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35* (2), 247–274.
- (69) B. Flavier, A.; Clough, S.; Schell, M.; Denny, T. *Identification of 3-OH-Hydroxypalmitic Acid Methyl Ester as a Novel Autoregulator Controlling Virulence in Ralstonia Solanacearum*; 1997; Vol. 26.
- (70) Zhou, L.; Zhang, L.-H.; Cámara, M.; He, Y.-W. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover. *Trends Microbiol.* **2017**, *25* (4), 293–303.
- (71) Parker, C. T.; Sperandio, V. Microreview Cell-to-Cell Signalling during Pathogenesis. *Cell. Microbiol.* **2009**, *11* (3), 363–369.
- (72) Sturme, M. H. J.; Kleerebezem, M.; Nakayama, J.; Akkermans, A. D. L.; Vaughta, E.

- E.; de Vos, W. M. Cell to Cell Communication by Autoinducing Peptides in Gram-Positive Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2002**, *81* (1–4), 233–243.
- (73) Pereira, C. S.; Thompson, J. A.; Xavier, K. B. AI-2-Mediated Signalling in Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2013.
- (74) Xavier, K. B.; Bassler, B. L. LuxS Quorum Sensing: More than Just a Numbers Game. *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, *6* (2), 191–197.
- (75) Sun, J.; Daniel, R.; Wagner-Döbler, I.; Zeng, A.-P. 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*, 36.
- (76) Qin, Y.; Luo, Z.-Q.; Smyth, A. J.; Gao, P.; Beck von Bodman, S.; Farrand, S. K. Quorum-Sensing Signal Binding Results in Dimerization of TraR and Its Release from Membranes into the Cytoplasm. *EMBO J.* **2000**, *19* (19), 5212–5221.
- (77) Urbanowski, M. L.; Lostroh, C. P.; Greenberg, E. P. Reversible Acyl-Homoserine Lactone Binding to Purified *Vibrio Fischeri* LuxR Protein. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (3), 631–637.
- (78) Kim, K.; Kim, K. P.; Choi, J.; Lim, J. A.; Lee, J.; Hwang, S.; Ryu, S. Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter Sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (15), 5188–5198.
- (79) Choi, S. H.; Greenberg, E. P. The C-Terminal Region of the *Vibrio Fischeri* LuxR Protein Contains an Inducer-Independent Lux Gene Activating Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (24), 11115–11119.
- (80) Poellinger, K.; Lee, J.; Parales Jr, J.; Greenberg, E. Intragenic Suppression of a Mutation: Characterization of an Autoinducer-Independent LuxR. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *129* (1), 97–101.
- (81) Sitnikov, D. M.; Shadel, G. S.; Baldwin, T. O. Autoinducer-Independent Mutants of the LuxR Transcriptional Activator Exhibit Differential Effects on the Two lux Promoters of *Vibrio Fischeri*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1996**, *252* (5), 622–625.
- (82) Shadel, G. S.; Devine, J. H.; Baldwin, T. O. Control of the Lux Regulon of *Vibrio Fischeri*. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1990**, *5* (2), 99–106. <https://doi.org/10.1002/bio.1170050205>.
- (83) Devine, J. H.; Shadel, G. S.; Baldwin, T. O. Identification of the Operator of the Lux Regulon from the *Vibrio Fischeri* Strain ATCC7744. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (15), 5688–5692.
- (84) Eglund, K. A.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*: Elements of the LuxI Promoter. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31* (4), 1197–1204.
- (85) Shadel, G. S.; Baldwin, T. O. Positive Autoregulation of the *Vibrio Fischeri* LuxR Gene: LuxR and Autoinducer Activate CAMP-Catabolite Gene Activator Protein Complex-Independent LuxR Transcription. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (11), 7696–7702.
- (86) Shadel, G. S.; Baldwin, T. O. The *Vibrio Fischeri* LuxR Protein Is Capable of Bidirectional Stimulation of Transcription and Both Positive and Negative Regulation of the LuxR Gene. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (2), 568–574.
- (87) Qin, N.; Callahan, S. M.; Dunlap, P. V.; Stevens, A. M. Analysis of LuxR Regulon Gene Expression during Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (11), 4127–4134.
- (88) Papenfort, K.; Bassler, B. L. Quorum Sensing Signal-Response Systems in Gram-Negative Bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (9), 576–588.
- (89) Hawver, L. A.; Jung, S. A.; Ng, W.-L. Specificity and Complexity in Bacterial Quorum-Sensing Systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40* (5), 738–752.

- (90) Swift, S.; Downie, J. A.; Whitehead, N. A.; Barnard, A. M.; Salmond, G. P.; Williams, P. Quorum Sensing as a Population-Density-Dependent Determinant of Bacterial Physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **2001**, *45*, 199–270.
- (91) Churchill, M. E. A.; Chen, L. Structural Basis of Acyl-Homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 68–85.
- (92) Kaplan, H. B.; Greenberg, E. P. Diffusion of Autoinducer Is Involved in Regulation of the *Vibrio Fischeri* Luminescence System. *J. Bacteriol.* **1985**, *163* (3), 1210–1214.
- (93) Van Houdt, R.; Givskov, M.; Michiels, C. W. Quorum Sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31* (4), 407–424.
- (94) Moré, M. I.; Finger, L. D.; Stryker, J. L.; Fuqua, C.; Eberhard, A.; Winans, S. C. Enzymatic Synthesis of a Quorum-Sensing Autoinducer through Use of Defined Substrates. *Science* **1996**, *272* (5268), 1655–1658.
- (95) Val, D. L.; Cronan, J. E., Jr. In Vivo Evidence That S-Adenosylmethionine and Fatty Acid Synthesis Intermediates Are the Substrates for the LuxI Family of Autoinducer Synthases. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (10), 2644–2651.
- (96) Parsek, M. R.; Val, D. L.; Hanzelka, B. L.; Cronan, J. E.; Greenberg, E. P. Acyl Homoserine-Lactone Quorum-Sensing Signal Generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (8), 4360–4365.
- (97) Watson, W. T.; Minogue, T. D.; Val, D. L.; von Bodman, S. B.; Churchill, M. E. A. Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Signal Production in Bacterial Quorum Sensing. *Mol. Cell* **2002**, *9* (3), 685–694.
- (98) Shadel, G. S.; Young, R.; Baldwin, T. O. Use of Regulated Cell Lysis in a Lethal Genetic Selection in *Escherichia Coli*: Identification of the Autoinducer-Binding Region of the LuxR Protein from *Vibrio Fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (7), 3980–3987.
- (99) Slock, J.; VanRiet, D.; Kolibachuk, D.; Greenberg, E. P. Critical Regions of the *Vibrio Fischeri* LuxR Protein Defined by Mutational Analysis. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (7), 3974–3979.
- (100) Hanzelka, B. L.; Greenberg, E. P. Evidence That the N-Terminal Region of the *Vibrio Fischeri* LuxR Protein Constitutes an Autoinducer-Binding Domain. *J. Bacteriol.* **1995**, *177* (3), 815–817.
- (101) Zhu, J.; Winans, S. C. The Quorum-Sensing Transcriptional Regulator TraR Requires Its Cognate Signaling Ligand for Protein Folding, Protease Resistance, and Dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (4), 1507–1512.
- (102) Welch, M.; Todd, D. E.; Whitehead, N. A.; McGowan, S. J.; Bycroft, B. W.; Salmond, G. P. N-Acyl Homoserine Lactone Binding to the CarR Receptor Determines Quorum-Sensing Specificity in *Erwinia*. *EMBO J.* **2000**, *19* (4), 631–641.
- (103) Choi, S. H.; Greenberg, E. P. Genetic Dissection of DNA Binding and Luminescence Gene Activation by the *Vibrio Fischeri* LuxR Protein. *J. Bacteriol.* **1992**, *174* (12), 4064–4069.
- (104) Eglund, K. A.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*: Analysis of the LuxR DNA Binding Region by Alanine-Scanning Mutagenesis. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (1), 382–386.
- (105) Trott, A. E.; Stevens, A. M. Amino Acid Residues in LuxR Critical for Its Mechanism of Transcriptional Activation during Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (1), 387–392.
- (106) Gelencsér, Z.; Choudhary, K. S.; Coutinho, B. G.; Hudaiberdiev, S.; Galbáts, B.; Venturi, V.; Pongor, S. Classifying the Topology of AHL-Driven Quorum Sensing Circuits in Proteobacterial Genomes. *Sensors (Basel)*. **2012**, *12* (5), 5432–5444.

- (107) Bassler, B. L.; Greenberg, E. P.; Stevens, A. M. Cross-Species Induction of Luminescence in the Quorum-Sensing Bacterium *Vibrio Harveyi*. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (12), 4043–4045.
- (108) Whiteley, M.; Greenberg, E. P. Promoter Specificity Elements in *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum-Sensing-Controlled Genes. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (19), 5529–5534.
- (109) Vannini, A.; Volpari, C.; Gargioli, C.; Muraglia, E.; Cortese, R.; De Francesco, R.; Neddermann, P.; Di Marco, S. The Crystal Structure of the Quorum Sensing Protein TraR Bound to Its Autoinducer and Target DNA. *EMBO J.* **2002**, *21* (17), 4393–4401.
- (110) Zhang, R.; Pappas, T.; Brace, J. L.; Miller, P. C.; Oulmassov, T.; Molyneaux, J. M.; Anderson, J. C.; Bashkin, J. K.; Winans, S. C.; Joachimiak, A. Structure of a Bacterial Quorum-Sensing Transcription Factor Complexed with Pheromone and DNA. *Nature* **2002**, *417* (6892), 971–974.
- (111) Yao, Y.; Martinez-Yamout, M. A.; Dickerson, T. J.; Brogan, A. P.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. Structure of the *Escherichia Coli* Quorum Sensing Protein SdiA: Activation of the Folding Switch by Acyl Homoserine Lactones. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355* (2), 262–273.
- (112) Zou, Y.; Nair, S. K. Molecular Basis for the Recognition of Structurally Distinct Autoinducer Mimics by the *Pseudomonas Aeruginosa* LasR Quorum-Sensing Signaling Receptor. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (9), 961–970.
- (113) Bottomley, M. J.; Muraglia, E.; Bazzo, R.; Carfi, A. Molecular Insights into Quorum Sensing in the Human Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* from the Structure of the Virulence Regulator LasR Bound to Its Autoinducer. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (18), 13592–13600.
- (114) Gray, K. M.; Garey, J. R. The Evolution of Bacterial LuxI and LuxR Quorum Sensing Regulators. *Microbiology* **2001**, *147* (8), 2379–2387.
- (115) Parsek, M. R.; Greenberg, E. P. Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: A Signaling Mechanism Involved in Associations with Higher Organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (16), 8789–8793.
- (116) Case, R. J.; Labbate, M.; Kjelleberg, S. AHL-Driven Quorum-Sensing Circuits: Their Frequency and Function among the Proteobacteria. *ISME J.* **2008**, *2* (4), 345–349.
- (117) Lerat, E.; Moran, N. A. The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21* (5), 903–913.
- (118) Tsai, C.-S.; Winans, S. C. LuxR-Type Quorum-Sensing Regulators That Are Detached from Common Scents. *Mol. Microbiol.* **2010**, *77* (5), 1072–1082.
- (119) NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/.
- (120) Le Conte, Y.; Huang, Z.; Robinson, G. E. “Quorum Sensing” in Honeybees: Pheromone Regulation of Division of Labor. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; Washington DC: ASM Press, 2008; pp 463–468.
- (121) Chen, C.-C.; Wang, L.; Plikus, M. V.; Jiang, T. X.; Murray, P. J.; Ramos, R.; Guerrero-Juarez, C. F.; Hughes, M. W.; Lee, O. K.; Shi, S.; WidELITZ, R. B.; Lander, A. D.; Chuong, C. M. Organ-Level Quorum Sensing Directs Regeneration in Hair Stem Cell Populations. *Cell* **2015**, *161* (2), 277–290.
- (122) Hudaiberdiev, S.; Choudhary, K. S.; Vera Alvarez, R.; Gelencsér, Z.; Ligeti, B.; Lamba, D.; Pongor, S. Census of Solo LuxR Genes in Prokaryotic Genomes. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2015**, *5* (20), 1–6.
- (123) Cicirelli, E. M.; Fuqua, C.; Tait, K.; Williamson, H. Acylated Homoserine Lactone

- Signaling in Marine Bacterial Systems. In *Chemical Communication among Bacteria*; American Society of Microbiology, 2008; pp 251–272.
- (124) Pompeani, A. J.; Irgon, J. J.; Berger, M. F.; Bulyk, M. L.; Wingreen, N. S.; Bassler, B. L. The *Vibrio Harveyi* Master Quorum-Sensing Regulator, LuxR, a TetR-Type Protein Is Both an Activator and a Repressor: DNA Recognition and Binding Specificity at Target Promoters. *Mol. Microbiol.* **2008**, *70* (1), 76–88.
- (125) Waters, C. M.; Bassler, B. L. The *Vibrio Harveyi* Quorum-Sensing System Uses Shared Regulatory Components to Discriminate between Multiple Autoinducers. *Genes Dev.* **2006**, *20* (19), 2754–2767.
- (126) Swaminath Srinivas, H. L.; Guoli Gong, X. H. Quorum Sensing in *Vibrio* and Its Relevance to Bacterial Virulence. *J. Bacteriol. Parasitol.* **2013**, *04* (03).
- (127) Fidopiastis, P. M.; Miyamoto, C. M.; Jobling, M. G.; Meighen, E. a.; Ruby, E. G. LitR, a New Transcriptional Activator in *Vibrio Fischeri*, Regulates Luminescence and Symbiotic Light Organ Colonization. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45* (1), 131–143.
- (128) Greenberg, E. P.; Schuster, M. LuxR-Type Proteins in *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing: Distinct Mechanisms with Global Implications. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, 2008; pp 133–144.
- (129) Schuster, M.; Lostroh, C. P.; Ogi, T.; Greenberg, E. P. Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: A Transcriptome Analysis. *J. Bacteriol.* **2003**, *185* (7), 2066–2079.
- (130) Lee, J.; Zhang, L. The Hierarchy Quorum Sensing Network in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6* (1), 26–41.
- (131) Schuster, M.; Greenberg, E. P. Early Activation of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* Reveals the Architecture of a Complex Regulon. *BMC Genomics* **2007**, *8* (1), 287.
- (132) Sabag-Daigle, A.; Soares, J. A.; Smith, J. N.; Elmasry, M. E.; Ahmer, B. M. M. The Acyl Homoserine Lactone (AHL) Receptor, SdiA, of *E. Coli* and *Salmonella* Does Not Respond to Indole, but at High Concentrations Indole Can Interfere with AHL Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**.
- (133) Michael, B.; Smith, J. N.; Swift, S.; Heffron, F.; Ahmer, B. M. M. SdiA of *Salmonella Enterica* Is a LuxR Homolog That Detects Mixed Microbial Communities. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (19), 5733–5742.
- (134) Wu, C.; Lokanath, N. K.; Kim, D. Y.; Nguyen, L. D. N.; Kim, K. K. Crystallization and Preliminary X-Ray Studies of SdiA from *Escherichia Coli*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *64*, 19–21.
- (135) Yamamoto, K.; Yata, K.; Fujita, N.; Ishihama, A. Novel Mode of Transcription Regulation by SdiA, an *Escherichia Coli* Homologue of the Quorum-Sensing Regulator. *Mol. Microbiol.* **2008**, *41* (5), 1187–1198.
- (136) Yang, S.; Lopez, C. R.; Zechiedrich, E. L. Quorum Sensing and Multidrug Transporters in *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (7), 2386–2391.
- (137) Venturi, V.; Ahmer, B. M. M. Editorial: LuxR Solos Are Becoming Major Players in Cell–Cell Communication in Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015, p 89.
- (138) Subramoni, S.; Venturi, V. LuxR-Family “Solos”: Bachelor Sensors/Regulators of Signalling Molecules. *Microbiology* **2009**, *155* (5), 1377–1385. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026849-0>.
- (139) Fuqua, C. The QscR Quorum-Sensing Regulon of *Pseudomonas Aeruginosa*: An

- Orphan Claims Its Identity. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (9), 3169–3171.
- (140) González, J. F.; Venturi, V. A Novel Widespread Interkingdom Signaling Circuit. *Trends Plant Sci.* **2013**, *18* (3), 167–174.
- (141) Patel, H. K.; Suárez-Moreno, Z. R.; Degrossi, G.; Subramoni, S.; González, J. F.; Venturi, V. Bacterial LuxR Solos Have Evolved to Respond to Different Molecules Including Signals from Plants. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 447.
- (142) Schaefer, A. L.; Val, D. L.; Hanzelka, B. L.; Cronan, J. E.; Greenberg, E. P.; Greenberg, E. P. Generation of Cell-to-Cell Signals in Quorum Sensing: Acyl Homoserine Lactone Synthase Activity of a Purified *Vibrio Fischeri* LuxI Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93* (18), 9505–9509.
- (143) Kolibachuk, D.; Greenberg, E. P. The *Vibrio Fischeri* Luminescence Gene Activator LuxR Is a Membrane-Associated Protein. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (22), 7307–7312.
- (144) Antunes, L. C. M.; Ferreira, R. B. R.; Lostroh, C. P.; Greenberg, E. P. A Mutational Analysis Defines *Vibrio Fischeri* LuxR Binding Sites. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (13), 4392–4397.
- (145) Roberts, M. F.; Kruchten, A. E. The Origins of Chemical Thinking. In *Receptor Biology*; Roberts, M. F., Kruchten, A. E., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2016; pp 9–13.
- (146) Surette, M. G.; Davies, J. A New Look at Secondary Metabolites. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; American Society for Microbiology: Washington DC: ASM Press, 2008; pp 307–322.
- (147) Weber, M.; Buceta, J. Dynamics of the Quorum Sensing Switch: Stochastic and Non-Stationary Effects. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7* (1), 6.
- (148) Weber, M.; Buceta, J. The Cellular Ising Model: A Framework for Phase Transitions in Multicellular Environments. *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13* (119).
- (149) Pérez, P. D.; Hagen, S. J. Heterogeneous Response to a Quorum-Sensing Signal in the Luminescence of Individual *Vibrio Fischeri*. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15473.
- (150) Goryachev, A. B. Design Principles of the Bacterial Quorum Sensing Gene Networks. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2009**, *1* (1), 45–60.
- (151) Goryachev, A. B. Understanding Bacterial Cell-Cell Communication with Computational Modeling. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 238–250.
- (152) Oyarzún, D. A.; Chaves, M. Design of a Bistable Switch to Control Cellular Uptake. *J. R. Soc. Interface* **2015**, *12* (113).
- (153) Casadesús, J.; Low, D. A. Programmed Heterogeneity: Epigenetic Mechanisms in Bacteria. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (20), 13929–13935.
- (154) To, T.-L.; Maheshri, N. Noise Can Induce Bimodality in Positive Transcriptional Feedback Loops without Bistability. *Science* (80-.). **2010**, *327* (5969), 1142–1145.
- (155) Hong, D.; Sidel, W. M.; Man, S.; Martin, J. V. Extracellular Noise-Induced Stochastic Synchronization in Heterogeneous Quorum Sensing Network. *J. Theor. Biol.* **2007**, *245* (4), 726–736.
- (156) Zhang, W.; Li, C. Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. *Front. Microbiol.* **2016**, *6* (JAN).
- (157) Hentzer, M.; Givskov, M. Pharmacological Inhibition of Quorum Sensing for the Treatment of Chronic Bacterial Infections. *J Clin Invest* **2003**, *112* (9), 1300–1307.
- (158) Hong, K.-W.; Koh, C.-L.; Sam, C.-K.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Quorum Quenching Revisited-From Signal Decays to Signalling Confusion. *Sensors* **2012**, *12* (4), 4661–4696.
- (159) WHO | *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*; World Health

- Organization, 2016.
- (160) Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015.
- (161) Zhu, J.; Kaufmann, G. F. Quo Vadis Quorum Quenching? *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, *13* (5).
- (162) Carmen Fariñas, M.; Martínez-Martínez, L. Infecciones Causadas Por Bacterias Gramnegativas Multirresistentes: Enterobacterias, Pseudomonas Aeruginosa, Acinetobacter Baumannii y Otros Bacilos Gramnegativos No Fermentadores. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2013**, *31* (6), 402–409.
- (163) Mellbye, B.; Schuster, M. The Sociomicrobiology of Antivirulence Drug Resistance: A Proof of Concept. *MBio* **2011**, *2* (5), e00131-11.
- (164) García-Contreras, R.; Maeda, T.; Wood, T. K. Resistance to Quorum-Quenching Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79* (22), 6840–6846.
- (165) García-Contreras, R.; Maeda, T.; Wood, T. K. Can Resistance against Quorum-Sensing Interference Be Selected? *ISME J.* **2016**, *10* (1).
- (166) Guo, M.; Gamby, S.; Zheng, Y.; Sintim, H. O. Small Molecule Inhibitors of AI-2 Signaling in Bacteria: State-of-the-Art and Future Perspectives for Anti-Quorum Sensing Agents. *Int. J. Mol. Sci. Int. J. Mol. Sci* **2013**, *14*, 17694–17728.
- (167) Chang, C.-Y.; Krishnan, T.; Wang, H.; Chen, Y.; Yin, W.-F.; Chong, Y.-M.; Tan, L. Y.; Chong, T. M.; Chan, K.-G. Non-Antibiotic Quorum Sensing Inhibitors Acting against N-Acyl Homoserine Lactone Synthase as Druggable Target. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7245.
- (168) Kalia, V. C. Quorum Sensing Inhibitors: An Overview. *Biotechnology Advances*. 2013.
- (169) Fetzner, S. Quorum Quenching Enzymes. *J. Biotechnol.* **2015**, *201*, 2–14.
- (170) Kaufmann, G. F.; Park, J.; Mayorov, A. V.; Kubitz, D. M.; Janda, K. D. Generation of Quorum Quenching Antibodies. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2011; Vol. 692, pp 299–311.
- (171) Zhao, Z. G.; Yu, Y. M.; Xu, B. Y.; Yan, S. S.; Xu, J. F.; Liu, F.; Li, G. M.; Ding, Y. L.; Wu, S. Q. Screening and Anti-Virulent Study of N-Acyl Homoserine Lactones DNA Aptamers against Pseudomonas Aeruginosa Quorum Sensing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18* (2), 406–412.
- (172) Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol.* **2018**, *26* (4), 313–328.
- (173) Givskov, M.; de Nys, R.; Manefield, M.; Gram, L.; Maximilien, R.; Eberl, L.; Molin, S.; Steinberg, P. D.; Kjelleberg, S. Eukaryotic Interference with Homoserine Lactone-Mediated Prokaryotic Signalling. *J. Bacteriol.* **1996**, *178* (22), 6618–6622.
- (174) Hentzer, M.; Wu, H.; Andersen, J. B.; Riedel, K.; Rasmussen, T. B.; Bagge, N. Attenuation of Pseudomonas Aeruginosa Virulence by Quorum-Sensing Inhibitors. *Embo J.* **2003**, *22* (15), 3803.
- (175) Ren, D.; Sims, J. J.; Wood, T. K. Inhibition of Biofilm Formation and Swarming of Escherichia Coli by (5Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2-(5H)-Furanone. *Env. Microbiol* **2001**, *3* (11), 731–736.
- (176) Zang, T.; Lee, B. W. K.; Cannon, L. M.; Ritter, K. A.; Dai, S.; Ren, D.; Wood, T. K.; Zhou, Z. S. A Naturally Occurring Brominated Furanone Covalently Modifies and Inactivates LuxS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (21), 6200–6204.
- (177) Manefield, M.; Rasmussen, T. B.; Hentzer, M.; Andersen, J. B.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. Halogenated Furanones Inhibit Quorum Sensing through

- Accelerated LuxR Turnover. *Microbiology* **2002**, *148* (Pt 4), 1119–1127.
- (178) Defoirdt, T.; Miyamoto, C. M.; Wood, T. K.; Meighen, E. A.; Sorgeloos, P.; Verstraete, W.; Bossier, P. The Natural Furanone (5Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2(5H)-Furanone Disrupts Quorum Sensing-Regulated Gene Expression in *Vibrio Harveyi* by Decreasing the DNA-Binding Activity of the Transcriptional Regulator Protein LuxR. *Env. Microbiol* **2007**, *9* (10), 2486–2495.
- (179) Liu, C. F.; Liu, D.; Momb, J.; Thomas, P. W.; Lajoie, A.; Petsko, G. A.; Fast, W.; Ringe, D. A Phenylalanine Clamp Controls Substrate Specificity in the Quorum-Quenching Metallo- γ -Lactonase from *Bacillus Thuringiensis*. *Biochemistry* **2013**, *52* (9), 1603–1610.
- (180) Bokhove, M.; Jimenez, P. N.; Quax, W. J.; Dijkstra, B. W. The Quorum-Quenching N-Acyl Homoserine Lactone Acylase PvdQ Is an Ntn-Hydrolase with an Unusual Substrate-Binding Pocket. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (2), 686–691.
- (181) Debler, E. W.; Kaufmann, G. F.; Kirchdoerfer, R. N.; Mee, J. M.; Janda, K. D.; Wilson, I. A. Crystal Structures of a Quorum-Quenching Antibody. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368* (5), 1392–1402.
- (182) Manefield, M.; Welch, M.; Givskov, M.; Salmond, G. P. C.; Kjelleberg, S. Halogenated Furanones from the Red Alga, *Delisea Pulchra*, Inhibit Carbapenem Antibiotic Synthesis and Exoenzyme Virulence Factor Production in the Phytopathogen *Erwinia Carotovora*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *205* (1), 131–138.
- (183) Andersen, J. B.; Eberl, L.; Anthoni, U.; Christophersen, C.; Givskov, M.; Rasmussen, T. B.; Steinberg, P.; Manefield, M.; Kjelleberg, S. How *Delisea Pulchra* Furanones Affect Quorum Sensing and Swarming Motility in *Serratia Liquefaciens* MG1. *Microbiology* **2000**, *146* (12), 3237–3244.
- (184) Skindersoe, M. E.; Ettinger-Epstein, P.; Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; de Nys, R.; Givskov, M. Quorum Sensing Antagonism from Marine Organisms. *Mar. Biotechnol.* **2008**, *10* (1), 56–63.
- (185) Pejic, B.; Talevska, A.; Ciric, A.; Glamoclija, J.; Nikolic, M.; Talevski, T.; Sokovic, M. Anti-Quorum Sensing Activity of Selected Sponge Extracts: A Case Study of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28* (24), 2330–2333.
- (186) Rasmussen, T. B.; Skindersoe, M. E.; Bjarnsholt, T.; Phipps, R. K.; Christensen, K. B.; Jensen, P. O.; Andersen, J. B.; Koch, B.; Larsen, T. O.; Hentzer, M.; Eberl, L.; Hoiby, N.; Givskov, M. Identity and Effects of Quorum-Sensing Inhibitors Produced by *Penicillium* Species. *Microbiology* **2005**, *151* (5), 1325–1340.
- (187) Teplitski, M.; Robinson, J. B.; Bauer, W. D. Plants Secrete Substances That Mimic Bacterial N -Acyl Homoserine Lactone Signal Activities and Affect Population Density-Dependent Behaviors in Associated Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2000**, *13* (6), 637–648.
- (188) Amara, N.; Krom, B. P.; Kaufmann, G. F.; Meijler, M. M. Macromolecular Inhibition of Quorum Sensing: Enzymes, Antibodies, and Beyond. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 195–208.
- (189) Chenia, H. Y. Anti-Quorum Sensing Potential of Crude *Kigelia Africana* Fruit Extracts. *Sensors (Switzerland)* **2013**, *13* (3), 2802–2817.
- (190) Vattem, D. A.; Mihalik, K.; Crixell, S. H.; McLean, R. J. C. Dietary Phytochemicals as Quorum Sensing Inhibitors. *Fitoterapia* **2007**, *78* (4), 302–310.
- (191) Koh, K. H.; Tham, F. Y. Screening of Traditional Chinese Medicinal Plants for Quorum-Sensing Inhibitors Activity. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2011**, *44* (2), 144–148.
- (192) Priya, K.; Yin, W. F.; Chan, K. G. Anti-Quorum Sensing Activity of the Traditional

- Chinese Herb, *Phyllanthus Amarus*. *Sensors (Switzerland)* **2013**, *13* (11), 14558–14569.
- (193) Chu, W.; Zhou, S.; Jiang, Y.; Zhu, W.; Zhuang, X.; Fu, J. Effect of Traditional Chinese Herbal Medicine with Antiquorum Sensing Activity on *Pseudomonas Aeruginosa*. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013* (Article ID 648257).
- (194) Yeo, S. S. .; Tham, F. Y. Anti-Quorum Sensing and Antimicrobial Activities of Some Traditional Chinese Medicinal Plants Commonly Used in South-East Asia – Directory of Open Access Journals (DOAJ). *Malays. J. Microbiol.* **2012**, *8* (1), 11–20.
- (195) Quave, C. L.; Plano, L. R. W.; Bennett, B. C. Quorum Sensing Inhibitors of *Staphylococcus Aureus* from Italian Medicinal Plants. *Planta Med.* **2011**, *77* (2), 188–195.
- (196) Zahin, M.; Hasan, S.; Aqil, F.; MS, K.; FM, H.; I, A. Screening of Certain Medicinal Plants from India for Their Anti-Quorum Sensing Activity. *Indian J Exp Biol* **2010**, *48* (12), 1219–1224.
- (197) Song, Z.; Kong, K. F.; Wu, H.; Maricic, N.; Ramalingam, B.; Priestap, H.; Schneper, L.; Quirke, J. M. E.; Højby, N.; Mathee, K. *Panax Ginseng* Has Anti-Infective Activity against Opportunistic Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa* by Inhibiting Quorum Sensing, a Bacterial Communication Process Critical for Establishing Infection. *Phytomedicine* **2010**, *17* (13), 1040–1046.
- (198) Ganin, H.; Rayo, J.; Amara, N.; Levy, N.; Krief, P.; Meijler, M. M. Sulforaphane and Erucin, Natural Isothiocyanates from Broccoli, Inhibit Bacterial Quorum Sensing. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4* (1), 175–179.
- (199) Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; Skindersoe, M. E.; Hentzer, M.; Kristoffersen, P.; Kôte, M.; Nielsen, J.; Eberl, L.; Givskov, M. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System, the QSI Selector. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (5), 1799–1814.
- (200) Smyth, A. R.; Cifelli, P. M.; Ortori, C. A.; Righetti, K.; Lewis, S.; Erskine, P.; Holland, E. D.; Givskov, M.; Williams, P.; Cámara, M.; Barrett, D. A.; Knox, A. Garlic as an Inhibitor of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing in Cystic Fibrosis—a Pilot Randomized Controlled Trial. *Pediatr. Pulmonol.* **2010**, *45* (4), 356–362.
- (201) Harjai, K.; Kumar, R.; Singh, S. Garlic Blocks Quorum Sensing and Attenuates the Virulence of *Pseudomonas Aeruginosa*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, *58* (2), 161–168.
- (202) Manefield, M.; Harris, L.; Rice, S. A.; de Nys, R.; Kjelleberg, S. Inhibition of Luminescence and Virulence in the Black Tiger Prawn (*Penaeus Monodon*) Pathogen *Vibrio Harveyi* by Intercellular Signal Antagonists. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66* (5), 2079–2084.
- (203) Hentzer, M.; Riedel, K.; Rasmussen, T. B.; Heydorn, A.; Andersen, J. B.; Parsek, M. R.; Rice, S. A.; Eberl, L.; Molin, S.; Højby, N.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. Inhibition of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Bacteria by a Halogenated Furanone Compound. *Microbiology* **2002**, *148* (Pt 1), 87–102.
- (204) Hjelmgaard, T.; Persson, T.; Rasmussen, T. B.; Givskov, M.; Nielsen, J. Synthesis of Furanone-Based Natural Product Analogues with Quorum Sensing Antagonist Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (15), 3261–3271.
- (205) Martinelli, D.; Grossmann, G.; Séquin, U.; Brandl, H.; Bachofen, R. Effects of Natural and Chemically Synthesized Furanones on Quorum Sensing in *Chromobacterium Violaceum*. *BMC Microbiol.* **2004**, *4*, 25.
- (206) Olsen, J. A.; Severinsen, R.; Rasmussen, T. B.; Hentzer, M.; Givskov, M.; Nielsen, J. Synthesis of New 3- and 4-Substituted Analogues of Acyl Homoserine Lactone

- Quorum Sensing Autoinducers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (3), 325–328.
- (207) Castang, S.; Chantegrel, B.; Deshayes, C.; Dolmazon, R.; Gouet, P.; Haser, R.; Reverchon, S.; Nasser, W.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Doutheau, A. N-Sulfonyl Homoserine Lactones as Antagonists of Bacterial Quorum Sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (20), 5145–5149.
- (208) Persson, T.; Hansen, T. H.; Rasmussen, T. B.; Skindersø, M. E.; Givskov, M.; Nielsen, J. Rational Design and Synthesis of New Quorum-Sensing Inhibitors Derived from Acylated Homoserine Lactones and Natural Products from Garlic. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (2), 253–262.
- (209) Moore, J. D.; Rossi, F. M.; Welsh, M. A.; Nyffeler, K. E.; Blackwell, H. E. A Comparative Analysis of Synthetic Quorum Sensing Modulators in *Pseudomonas Aeruginosa*: New Insights into Mechanism, Active Efflux Susceptibility, Phenotypic Response, and Next-Generation Ligand Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (46), 14626–14639.
- (210) de Lima Pimenta, A.; Chiaradia Delatorre, L.; Mascarello, A.; de Oliveira, K.; Leal, P.; Yunes, R.; de Aguiar, C.; Tasca, C.; Nunes, R.; Smânia, A. J. Synthetic Organic Compounds with Potential for Bacterial Biofilm Inhibition, a Path for the Identification of Compounds Interfering with Quorum Sensing. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2013**, *42* (6), 519–523.
- (211) Borlee, B. R.; Geske, G. D.; Blackwell, H. E.; Handelsman, J. Identification of Synthetic Inducers and Inhibitors of the Quorum-Sensing Regulator LasR in *Pseudomonas Aeruginosa* by High-Throughput Screening. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (24), 8255–8258.
- (212) Smith, K. M.; Bu, Y.; Suga, H. Induction and Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (1), 81–89.
- (213) Dong, Y. H.; Wang, L. H.; Xu, J. L.; Zhang, H. B.; Zhang, X. F.; Zhang, L. H. Quenching Quorum-Sensing-Dependent Bacterial Infection by an N-Acyl Homoserine Lactonase. *Nature* **2001**, *411*.
- (214) Reimann, C.; Ginot, N.; Michel, L.; Keel, C.; Michaux, P.; Krishnapillai, V.; Zala, M.; Heurlier, K.; Triandafillu, K.; Harms, H.; Défago, G.; Haas, D. Genetically Programmed Autoinducer Destruction Reduces Virulence Gene Expression and Swarming Motility in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **2002**, *148*.
- (215) Lin, Y. H.; Xu, J. L.; Hu, J.; Wang, L. H.; Ong, S. L.; Leadbetter, J. R.; Zhang, L. H. Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Ralstonia* Strain XJ12B Represents a Novel and Potent Class of Quorum-Quenching Enzymes. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47* (3), 849–860.
- (216) Hong, K.-W.; Koh, C.-L.; Sam, C.-K.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Quorum Quenching Revisited—From Signal Decays to Signalling Confusion. *Sensors* **2012**, *12* (4), 4661–4696.
- (217) Kaufmann, G. F.; Sartorio, R.; Lee, S.-H.; Mee, J. M.; Altobelli, L. J.; Kujawa, D. P.; Jeffries, E.; Clapham, B.; Meijler, M. M.; Janda, K. D. Antibody Interference with N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Bacterial Quorum Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (9), 2802–2803.
- (218) Miyairi, S.; Tateda, K.; Fuse, E. T.; Ueda, C.; Saito, H.; Takabatake, T.; Ishii, Y.; Horikawa, M.; Ishiguro, M.; Standiford, T. J.; Yamaguchi, K. Immunization with 3-Oxododecanoyl-L-Homoserine Lactone-Protein Conjugate Protects Mice from Lethal *Pseudomonas Aeruginosa* Lung Infection. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55* (10), 1381–1387.
- (219) Park, J.; Jagasia, R.; Kaufmann, G. F.; Mathison, J. C.; Ruiz, D. I.; Moss, J. A.; Meijler,

- M. M.; Ulevitch, R. J.; Janda, K. D. Infection Control by Antibody Disruption of Bacterial Quorum Sensing Signaling. *Chem. Biol.* **2007**, *14* (10), 1119–1127.
- (220) Zhao, M.; Li, W.; Liu, K.; Li, H.; Lan, X. C4-HSL Aptamers for Blocking Quorum Sensing and Inhibiting Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Structure Prediction and Analysis. *PLoS One* **2019**, *14* (2).
- (221) Kato, N.; Tanaka, T.; Nakagawa, S.; Morohoshi, T.; Hiratani, K.; Ikeda, T. Control of Virulence Factor Expression in Opportunistic Pathogens Using Cyclodextrin Immobilized Gel. In *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*; 2007; Vol. 57, pp 419–423.
- (222) Morohoshi, T.; Shiono, T.; Takidouchi, K.; Kato, M.; Kato, N.; Kato, J.; Ikeda, T. Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia Marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (20), 6339–6340,6341,6342,6343,6344.
- (223) Garcia Lopez, J.; Piletska, E. V.; Whitcombe, M. J.; Czulak, J.; Piletsky, S. A. Application of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Degradation of the Bacterial Autoinducer: N-Hexanoyl Homoserine Lactone. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (18), 2664–2667.
- (224) Motib, A.; Guerreiro, A.; Al-Bayati, F.; Piletska, E.; Manzoor, I.; Shafeeq, S.; Kadam, A.; Kuipers, O.; Hiller, L.; Cowen, T.; Piletsky, S.; Andrew, P. W.; Yesilkaya, H. Modulation of Quorum Sensing in a Gram-Positive Pathogen by Linear Molecularly Imprinted Polymers with Anti-Infective Properties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56* (52), 16555–16558.
- (225) Ma, L.; Feng, S.; Fuente-Núñez, C. D. La; Hancock, R. E. W.; Lu, X. Development of Molecularly Imprinted Polymers to Block Quorum Sensing and Inhibit Bacterial Biofilm Formation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (22), 18450–18457.
- (226) Bogart, L. K.; Pourroy, G.; Murphy, C. J.; Puentes, V.; Pellegrino, T.; Rosenblum, D.; Peer, D.; Lévy, R. Nanoparticles for Imaging, Sensing, and Therapeutic Intervention. *ACS Nano* **2014**, *8* (4), 3107–3122.
- (227) Qais, F. A.; Khan, M. S.; Ahmad, I. Nanoparticles as Quorum Sensing Inhibitor: Prospects and Limitations. In *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*; Kalia V., Ed.; Singapore, 2018; pp 227–244.
- (228) Tran, H. M.; Tran, H.; Booth, M. A.; Fox, K. E.; Nguyen, T. H.; Tran, N.; Tran, P. A. Nanomaterials for Treating Bacterial Biofilms on Implantable Medical Devices. *Nanomaterials*. 2020.
- (229) Velu, R.; Calais, T.; Jayakumar, A.; Raspall, F. A Comprehensive Review on Bio-Nanomaterials for Medical Implants and Feasibility Studies on Fabrication of Such Implants by Additive Manufacturing Technique. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2019**, *13* (1), 92.
- (230) Chen, J.; Guo, Z.; Tian, H.; Chen, X. Production and Clinical Development of Nanoparticles for Gene Delivery. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **2016**, *3*.
- (231) Sun, Y.; Lu, Y.; Yin, L.; Liu, Z. The Roles of Nanoparticles in Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020, p 947.
- (232) Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**.
- (233) Hayat, S.; Muzammil, S.; Shabana; Aslam, B.; Siddique, M. H.; Saqalein, M.; Nisar, M. A. Quorum Quenching: Role of Nanoparticles as Signal Jammers in Gram-Negative Bacteria. *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd. January 1, 2019, pp

- 61–72.
- (234) Fernandes, M. M.; Ivanova, K.; Francesko, A.; Rivera, D.; Torrent-Burgués, J.; Gedanken, A.; Mendonza, E.; Tzanov, T. Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa Eradication by Nano-Penicillin G. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12* (7), 2061–2069.
- (235) Mu, H.; Tang, J.; Liu, Q.; Sun, C.; Wang, T.; Duan, J. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–9.
- (236) Wang, L.; Hu, C.; Shao, L. The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for the Future. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 1227–1249.
- (237) Bandara, H. M. H. N.; Herpin, M. J.; Kolacny, D.; Harb, A.; Romanovicz, D.; Smyth, H. D. C. Incorporation of Farnesol Significantly Increases the Efficacy of Liposomal Ciprofloxacin against Pseudomonas Aeruginosa Biofilms in Vitro. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (8), 2760–2770.
- (238) Zaidi, S.; Misba, L.; Khan, A. U. Nano-Therapeutics: A Revolution in Infection Control in Post Antibiotic Era. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2017**, *13* (7), 2281–2301.
- (239) Jung, W. K.; Koo, H. C.; Kim, K. W.; Shin, S.; Kim, S. H.; Park, Y. H. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (7), 2171 LP – 2178.
- (240) Mei, L.; Xu, Z.; Shi, Y.; Lin, C.; Jiao, S.; Zhang, L.; Li, P. Multivalent and Synergistic Chitosan Oligosaccharide-Ag Nanocomposites for Therapy of Bacterial Infection. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 10011.
- (241) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*.
- (242) Pajerski, W.; Ochonska, D.; Brzywczy-Wloch, M.; Indyka, P.; Jarosz, M.; Golda-Cepa, M.; Sojka, Z.; Kotarba, A. Attachment Efficiency of Gold Nanoparticles by Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Strains Governed by Surface Charges. *J. Nanoparticle Res.* **2019**, *21* (8), 1–12.
- (243) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (244) McQuillan, J. S.; Shaw, A. M. Differential Gene Regulation in the Ag Nanoparticle and Ag(+)-Induced Silver Stress Response in Escherichia Coli: A Full Transcriptomic Profile. *Nanotoxicology* **2014**, *8 Suppl 1*, 177–184.
- (245) Slavina, Y. N.; Asnis, J.; Häfeli, U. O.; Bach, H. Metal Nanoparticles: Understanding the Mechanisms behind Antibacterial Activity. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017, p 65.
- (246) Radzig, M. A.; Nadochenko, V. A.; Koksharova, O. A.; Kiwi, J.; Lipasova, V. A.; Khmel, I. A. Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles on Gram-Negative Bacteria: Influence on the Growth and Biofilms Formation, Mechanisms of Action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *102*, 300–306.
- (247) García-Lara, B.; Saucedo-Mora, M. Á.; Roldán-Sánchez, J. A.; Pérez-Eretza, B.; Ramasamy, M.; Lee, J.; Coria-Jimenez, R.; Tapia, M.; Varela-Guerrero, V.; García-Contreras, R. Inhibition of Quorum-Sensing-Dependent Virulence Factors and Biofilm Formation of Clinical and Environmental Pseudomonas Aeruginosa Strains by ZnO Nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61* (3), 299–305.
- (248) Naik, K.; Kowshik, M. Anti-Quorum Sensing Activity of AgCl-TiO₂ Nanoparticles with Potential Use as Active Food Packaging Material. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*

- (4), 972–983.
- (249) Al-Shabib, N. A.; Husain, F. M.; Ahmed, F.; Khan, R. A.; Ahmad, I.; Alsharaeh, E.; Khan, M. S.; Hussain, A.; Rehman, M. T.; Yusuf, M.; Hassan, I.; Khan, J. M.; Ashraf, G. M.; Alsalmeh, A. M.; Al-Ajmi, M. F.; Tarasov, V. V.; Aliev, G. Biogenic Synthesis of Zinc Oxide Nanostructures from *Nigella Sativa* Seed: Prospective Role as Food Packaging Material Inhibiting Broad-Spectrum Quorum Sensing and Biofilm. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–16.
- (250) Al-Shabib, N. A.; Husain, F. M.; Ahmad, N.; Qais, F. A.; Khan, A.; Khan, A.; Khan, M. S.; Khan, J. M.; Shahzad, S. A.; Ahmad, I. Facile Synthesis of Tin Oxide Hollow Nanoflowers Interfering with Quorum Sensing-Regulated Functions and Bacterial Biofilms. *J. Nanomater.* **2018**, 2018.
- (251) Nafee, N.; Husari, A.; Maurer, C. K.; Lu, C.; De Rossi, C.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W.; Lehr, C. M.; Schneider, M. Antibiotic-Free Nanotherapeutics: Ultra-Small, Mucus-Penetrating Solid Lipid Nanoparticles Enhance the Pulmonary Delivery and Anti-Virulence Efficacy of Novel Quorum Sensing Inhibitors. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 131–140.
- (252) Ivanova, A.; Ivanova, K.; Tied, A.; Heinze, T.; Tzanov, T. Layer-By-Layer Coating of Aminocellulose and Quorum Quenching Acylase on Silver Nanoparticles Synergistically Eradicate Bacteria and Their Biofilms. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (24), 2001284.
- (253) Mohanty, A.; Tan, C. H.; Cao, B. Impacts of Nanomaterials on Bacterial Quorum Sensing: Differential Effects on Different Signals. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (2), 351–356.
- (254) Miller, K. P.; Wang, L.; Chen, Y.-P.; Pellechia, P. J.; Benicewicz, B. C.; Decho, A. W. Engineering Nanoparticles to Silence Bacterial Communication. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (189), 1–7.
- (255) Vinoj, G.; Pati, R.; Sonawane, A.; Vaseeharan, B. In Vitro Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles Coated with Functional Acyl Homoserine Lactone Lactonase Protein from *Bacillus Licheniformis* and Their Antibiofilm Activity against *Proteus* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (2), 763–771.
- (256) Singh, B. R.; Singh, B. N.; Singh, A.; Khan, W.; Naqvi, A. H.; Singh, H. B. Mycofabricated Biosilver Nanoparticles Interrupt *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing Systems. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 1–14.
- (257) Ali, S. G.; Ansari, M. A.; Sajid Jamal, Q. M.; Khan, H. M.; Jalal, M.; Ahmad, H.; Mahdi, A. A. Antiquorum Sensing Activity of Silver Nanoparticles in *P. Aeruginosa*: An in Silico Study. *silico Pharmacol.* **2017**, *5*, 12.
- (258) Ding, T.; Li, T.; Wang, Z.; Li, J. Curcumin Liposomes Interfere with Quorum Sensing System of *Aeromonas Sobria* and in Silico Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–16.
- (259) Prateeksha; Singh, B. R.; Shoeb, M.; Sharma, S.; Naqvi, A. H.; Gupta, V. K.; Singh, B. N. Scaffold of Selenium Nanovectors and Honey Phytochemicals for Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 93.
- (260) Raghunath, A.; Perumal, E. Metal Oxide Nanoparticles as Antimicrobial Agents: A Promise for the Future. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49* (2), 137–152.
- (261) Wagh, M. S.; Patil, R. H.; Thombre, D. K.; Kulkarni, M. V.; Gade, W. N.; Kale, B. B. Evaluation of Anti-Quorum Sensing Activity of Silver Nanowires. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (8), 3593–3601.
- (262) Monteiro, D. R.; Gorup, L. F.; Takamiya, A. S.; Ruvollo-Filho, A. C.; Camargo, E. R. de; Barbosa, D. B. The Growing Importance of Materials That Prevent Microbial

- Adhesion: Antimicrobial Effect of Medical Devices Containing Silver. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *34* (2), 103–110.
- (263) Ravindran, D.; Ramanathan, S.; Arunachalam, K.; Jeyaraj, G. P.; Shunmugiah, K. P.; Arumugam, V. R. Phytosynthesized Silver Nanoparticles as Antiquorum Sensing and Antibiofilm Agent against the Nosocomial Pathogen *Serratia Marcescens*: An in Vitro Study. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124* (6), 1425–1440.
- (264) Samanta, S.; Singh, B. R.; Adholeya, A. Intracellular Synthesis of Gold Nanoparticles Using an Ectomycorrhizal Strain EM-1083 of *Laccaria Fraterna* and Its Nanoantiquorum Sensing Potential Against *Pseudomonas Aeruginosa*. *Indian J. Microbiol.* **2017**, *57* (4), 448–460.
- (265) Al-Shabib, N. A.; Husain, F. M.; Hassan, I.; Khan, M. S.; Ahmed, F.; Qais, F. A.; Oves, M.; Rahman, M.; Khan, R. A.; Khan, A.; Hussain, A.; Alhazza, I. M.; Aman, S.; Noor, S.; Ebaid, H.; Al-Tamimi, J.; Khan, J. M.; Al-Ghadeer, A. R. M.; Khan, M. K. A.; Ahmad, I. Biofabrication of Zinc Oxide Nanoparticle from *Ochradenus Baccatus* Leaves: Broad-Spectrum Antibiofilm Activity, Protein Binding Studies, and In Vivo Toxicity and Stress Studies. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*, 8612158.
- (266) Gómez-Gómez, B.; Arregui, L.; Serrano, S.; Santos, A.; Pérez-Corona, T.; Madrid, Y. Selenium and Tellurium-Based Nanoparticles as Interfering Factors in Quorum Sensing-Regulated Processes: Violacein Production and Bacterial Biofilm Formation. *Metallomics* **2019**, *11* (6), 1104–1114.
- (267) Ali, S. G.; Ansari, M. A.; Alzohairy, M. A.; Alomary, M. N.; Jalal, M.; Alyahya, S.; Asiri, S. M. M.; Khan, H. M. Effect of Biosynthesized ZnO Nanoparticles on Multi-Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antibiotics* **2020**, *9* (5).
- (268) Shah, S.; Gaikwad, S.; Nagar, S.; Kulshrestha, S.; Vaidya, V.; Nawani, N.; Pawar, S. Biofilm Inhibition and Anti-Quorum Sensing Activity of Phytosynthesized Silver Nanoparticles against the Nosocomial Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biofouling* **2019**, *35* (1), 34–49.
- (269) Masurkar, S. A.; Chaudhari, P. R.; Shidore, V. B.; Kamble, S. P. Effect of Biologically Synthesised Silver Nanoparticles on *Staphylococcus Aureus* Biofilm Quenching and Prevention of Biofilm Formation. *IET Nanobiotechnology* **2012**, *6* (3), 110–114.
- (270) Alhariri, M.; Omri, A. Efficacy of Liposomal Bismuth-Ethanedithiol-Loaded Tobramycin after Intratracheal Administration in Rats with Pulmonary *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (1), 569 LP – 578.
- (271) Anjum, A.; Chung, P.-Y.; Ng, S.-F. PLGA/Xylitol Nanoparticles Enhance Antibiofilm Activity via Penetration into Biofilm Extracellular Polymeric Substances. *RSC Adv.* **2019**, *9* (25), 14198–14208.
- (272) Deepika, M. S.; Thangam, R.; Sundarraj, S.; Sheena, T. S.; Sivasubramanian, S.; Kulandaivel, J.; Thirumurugan, R. Co-Delivery of Diverse Therapeutic Compounds Using PEG-PLGA Nanoparticle Cargo against Drug-Resistant Bacteria: An Improved Anti-Biofilm Strategy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (1), 385–399.
- (273) Pattnaik, S.; Barik, S.; Muralitharan, G.; Busi, S. Ferulic Acid Encapsulated Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Attenuate Quorum Sensing Regulated Virulence and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *IET Nanobiotechnology* **2018**, *12* (8), 1056–1061.
- (274) Pattnaik, S.; Barik, S.; Macha, C.; Chiranjeevi, P. V.; Siddhardha, B. Anti Quorum Sensing and Anti Biofilm Efficacy of Cinnamaldehyde Encapsulated Chitosan Nanoparticles against *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *LWT* **2018**, *97*, 752–759.
- (275) Ilk, S.; Sağlam, N.; Özgen, M.; Korkusuz, F. Chitosan Nanoparticles Enhances the Anti-Quorum Sensing Activity of Kaempferol. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 653–

- 662.
- (276) Qin, X.; Kräft, T.; Goycoolea, F. M. Chitosan Encapsulation Modulates the Effect of Trans-Cinnamaldehyde on AHL-Regulated Quorum Sensing Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *169*, 453–461.
- (277) Nguyen, T. V.; Nguyen, T. T. H.; Wang, S. L.; Vo, T. P. K.; Nguyen, A. D. Preparation of Chitosan Nanoparticles by TPP Ionic Gelation Combined with Spray Drying, and the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles and a Chitosan Nanoparticle–Amoxicillin Complex. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43* (6).
- (278) Omwenga, E. O.; Hensel, A.; Shitandi, A.; Goycoolea, F. M. Chitosan Nanoencapsulation of Flavonoids Enhances Their Quorum Sensing and Biofilm Formation Inhibitory Activities against an E.Coli Top 10 Biosensor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *164*, 125–133.
- (279) Singh, N.; Romero, M.; Travanut, A.; Monteiro, P. F.; Jordana-Lluch, E.; Hardie, K. R.; Williams, P.; Alexander, M. R.; Alexander, C. Dual Bioresponsive Antibiotic and Quorum Sensing Inhibitor Combination Nanoparticles for Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Biofilms in Vitro and Ex Vivo. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4099–4111.
- (280) Issa, R.; Meikle, S. T.; James, S.; Cooper, I. R. Poly(ϵ -Lysine) Dendrons as Modulators of Quorum Sensing in Pseudomonas Aeruginosa. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26* (5).
- (281) Karlsson, J.; Vaughan, H. J.; Green, J. J. Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic Cancer Treatments. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2018**, *9* (1), 105–127.
- (282) Joye, I. J.; McClements, D. J. Biopolymer-Based Nanoparticles and Microparticles: Fabrication, Characterization, and Application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2014, pp 417–427.
- (283) Okano, C.; Kato, N. Inhibition and Induction of Quorum Sensing Using Complexes between N -Acylhomoserine Lactone and Self-Assembled Polymer Micelles. *Chem. Lett.* **2015**, *44* (11), 1544–1546.
- (284) Thanh Nguyen, H.; Goycoolea, F. Chitosan/Cyclodextrin/TPP Nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* **2017**, *22* (11), 1975.
- (285) Qin, X.; Emich, J.; Goycoolea, F. Assessment of the Quorum Sensing Inhibition Activity of a Non-Toxic Chitosan in an N-Acyl Homoserine Lactone (AHL)-Based Escherichia Coli Biosensor. *Biomolecules* **2018**, *8* (3), 87.
- (286) Jack, A. A.; Khan, S.; Powell, L. C.; Pritchard, M. F.; Beck, K.; Sath, H.; Sutton, L.; Cavaliere, A.; Florance, H.; Rye, P. D.; Thomas, D. W.; Hill, K. E. Alginate Oligosaccharide-Induced Modification of the LasI-LasR and RhlI-RhlR Quorum-Sensing Systems in Pseudomonas Aeruginosa. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (5).
- (287) Rubini, D.; Banu, S. F.; Subramani, P.; Hari, B. N. V.; Gowrishankar, S.; Pandian, S. K.; Wilson, A.; Nithyanand, P. Extracted Chitosan Disrupts Quorum Sensing Mediated Virulence Factors in Urinary Tract Infection Causing Pathogens. *Pathog. Dis.* **2019**, *77* (1), ftz009.
- (288) Pan, J.; Bahar, A. A.; Syed, H.; Ren, D. Reverting Antibiotic Tolerance of Pseudomonas Aeruginosa PAO1 Persister Cells by (Z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Methylfuran-2(5H)-One. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e45778.
- (289) Defoirdt, T.; Brackman, G.; Coenye, T. Quorum Sensing Inhibitors: How Strong Is the Evidence? *Trends Microbiol.* **2013**, *21* (12), 619–624.
- (290) Romero, M.; Acuña, L.; Otero, A. Patents on Quorum Quenching: Interfering with Bacterial Communication as a Strategy to Fight Infections. *Recent Pat. Biotechnol.*

- 2012**, 6 (1), 2–12.
- (291) Scutera, S.; Zucca, M.; Savoia, D. Novel Approaches for the Design and Discovery of Quorum-Sensing Inhibitors. *Expert Opin. Drug Discov.* **2014**, 9 (4).
- (292) van Delden, C.; Köhler, T.; Brunner-Ferber, F.; François, B.; Carlet, J.; Pechère, J.-C. Azithromycin to Prevent *Pseudomonas Aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia by Inhibition of Quorum Sensing: A Randomized Controlled Trial. *Intensive Care Med.* **2012**, 38 (7), 1118–1125.
- (293) Christensen, L. D.; van Gennip, M.; Jakobsen, T. H.; Alhede, M.; Hougen, H. P.; Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M. Synergistic Antibacterial Efficacy of Early Combination Treatment with Tobramycin and Quorum-Sensing Inhibitors against *Pseudomonas Aeruginosa* in an Intraperitoneal Foreign-Body Infection Mouse Model. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, 67 (5), 1198–1206.
- (294) Gupta, P.; Chhibber, S.; Harjai, K. Efficacy of Purified Lactonase and Ciprofloxacin in Preventing Systemic Spread of *Pseudomonas Aeruginosa* in Murine Burn Wound Model. *Burns* **2015**, 41 (1), 153–162.
- (295) Diggle, S. P.; Griffin, A. S.; Campbell, G. S.; West, S. A. Cooperation and Conflict in Quorum-Sensing Bacterial Populations. *Nature* **2007**, 450 (7168), 411–414.
- (296) García-Contreras, R. Is Quorum Sensing Interference a Viable Alternative to Treat *Pseudomonas Aeruginosa* Infections? *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 1454.
- (297) Beckmann, B. E.; Knoester, D. B.; Connelly, B. D.; Waters, C. M.; McKinley, P. K. Evolution of Resistance to Quorum Quenching in Digital Organisms. *Artif. Life* **2012**, 18 (3), 291–310.
- (298) Defoirdt, T.; Boon, N.; Bossier, P. Can Bacteria Evolve Resistance to Quorum Sensing Disruption? *PLoS Pathog.* **2010**, 6 (7), e1000989.
- (299) Wahjudi, M.; Murugappan, S.; van Merkerk, R.; Eissens, A. C.; Visser, M. R.; Hinrichs, W. L. J.; Quax, W. J. Development of a Dry, Stable and Inhalable Acyl-Homoserine-Lactone-Acylase Powder Formulation for the Treatment of Pulmonary *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 48 (4–5), 637–643.
- (300) Kaufmann, G. F.; Park, J.; Mee, J. M.; Ulevitch, R. J.; Janda, K. D. The Quorum Quenching Antibody RS2-1G9 Protects Macrophages from the Cytotoxic Effects of the *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing Signalling Molecule N-3-Oxo-Dodecanoyl-Homoserine Lactone. *Mol. Immunol.* **2008**, 45 (9), 2710–2714.
- (301) McLean, R. J. ; Pierson, L. S.; Fuqua, C. A Simple Screening Protocol for the Identification of Quorum Signal Antagonists. *J. Microbiol. Methods* **2004**, 58 (3), 351–360.
- (302) McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J. H.; Swift, S.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S. A. B.; Williams, P. Quorum Sensing and Chromobacterium Violaceum: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of N-Acylhomoserine Lactones. *Microbiology* **1997**, 143 (12), 3703–3711.
- (303) Steindler, L.; Venturi, V. Detection of Quorum-Sensing Acyl Homoserine Lactone Signal Molecules by Bacterial Biosensors. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, 266 (1), 1–9.
- (304) Shaw, P. D.; Ping, G.; Daly, S. L.; Cha, C.; Cronan, J. E.; Rinehart, K. L. J. r.; Farrand, S. K. Detecting and Characterizing N-Acyl-Homoserine Lactone Signal Molecules by Thin-Layer Chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* **1997**, 94.
- (305) Winson, M. K.; Swift, S.; Hill, P. J.; Sims, C. M.; Griesmayr, G.; Bycroft, B. W.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B. Engineering the LuxCDABE Genes from *Photobacterium Luminescens* to Provide a Bioluminescent Reporter for Constitutive and Promoter Probe Plasmids and Mini-Tn5 Constructs. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 163

- (2), 193–202.
- (306) Winson, M. K.; Camarat, M.; Latifi, A.; Foglino, M.; Chhabrat, S. R. A. M.; Daykint, M.; Ballyt, M.; Chapont, V.; Salmond, G. P. C.; Bycroft, B. W.; Lazdunskit, A.; Stewart, G. S. A. B.; Williamst, P. Production of Virulence Determinants and Secondary. **1995**, 92 (September), 9427–9431.
- (307) Latifi, A.; Winson, M. K.; Foglino, M.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S. A. B.; Lazdunski, A.; Williams, P. Multiple Homologues of LuxR and LuxI Control Expression of Virulence Determinants and Secondary Metabolites through Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **1995**, 17 (2), 333–343.
- (308) Winson, M. K.; Swift, S.; Fish, L.; Throup, J. P.; J rgensen, F.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B. W.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. . Construction and Analysis of LuxCDABE -Based Plasmid Sensors for Investigating N -Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 163 (2), 185–192.
- (309) Swift, S.; Winson, M. K.; Chan, P. F.; Bainton, N. J.; Birdsall, M.; Reeves, P. J.; Rees, C. E. D.; Chhabra, S. R.; Hill, P. J.; Throup, J. P.; Bycroft, B. W.; Salmond, G. P. C.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B. A Novel Strategy for the Isolation of LuxI Homologues: Evidence for the Widespread Distribution of a LuxR:LuxI Superfamily in Enteric Bacteria. *Mol. Microbiol.* **1993**, 10 (3), 511–520.
- (310) Steidle, A.; Sigl, K.; Schu egger, R.; Ihring, A.; Schmid, M.; Gantner, S.; Stoffels, M.; Riedel, K.; Givskov, M.; Hartmann, A.; Langebartels, C.; Eberl, L. Visualization of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. *Appl. Env. Microbiol* **2001**, 67.
- (311) Bassler, B. L.; Wright, M.; Showalter, R. E.; Silverman, M. R. Intercellular Signalling in *Vibrio Harveyi*: Sequence and Function of Genes Regulating Expression of Luminescence. *Mol. Microbiol* **1993**, 9.
- (312) Throup, W.; Bainton, B.; Williams, S. Signalling in Bacteria beyond Bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*; Campbell, A. K., Kricka, L. J., Stanley, P. E., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1994; pp 89–92.
- (313) Winson, M. K.; Camara, M.; Latifi, A.; Foglino, M.; Chhabra, S. R.; Daykin, M.; Bally, M.; Chapon, V.; Salmond, G. P.; Bycroft, B. W. Multiple N-Acyl-L-Homoserine Lactone Signal Molecules Regulate Production of Virulence Determinants and Secondary Metabolites in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92 (20), 9427–9431.
- (314) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26 (7), 787–793.
- (315) Pasotti, L.; Quattrocelli, M.; Galli, D.; de Angelis, M. G. C.; Magni, P. Multiplexing and Demultiplexing Logic Functions for Computing Signal Processing Tasks in Synthetic Biology. *Biotechnol. J.* **2011**, 6 (7), 784–795.
- (316) Wen, K. Y.; Cameron, L.; Chappell, J.; Jensen, K.; Bell, D. J.; Kelwick, R.; Kopniczky, M.; Davies, J. C.; Filloux, A.; Freemont, P. S. A Cell-Free Biosensor for Detecting Quorum Sensing Molecules in *P. Aeruginosa*-Infected Respiratory Samples. *ACS Synth. Biol.* **2017**, 6 (12), 2293–2301.
- (317) Danino, T.; Mondragon-Palomino, O.; Tsimring, L.; Hasty, J. A Synchronized Quorum of Genetic Clocks. *Nature* **2010**, 463 (7279), 326–330.
- (318) Lentini, R.; Martín, N. Y.; Forlin, M.; Belmonte, L.; Fontana, J.; Cornella, M.; Martini, L.; Tamburini, S.; Bentley, W. E.; Jousson, O.; Mansy, S. S. Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3 (2), 117–123.

- (319) Goycoolea, F. M.; Remuñán-López, C.; Alonso, M. J. Nanopartículas a Base de Polisacáridos: Quitosano. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XXVIII*; Real Academia Nacional de Farmacia: Madrid, 2010; pp 103–131.
- (320) Hamer, S. N.; Cord-Landwehr, S.; Biarnés, X.; Planas, A.; Waegeman, H.; Moerschbacher, B. M.; Kolkenbrock, S. Enzymatic Production of Defined Chitosan Oligomers with a Specific Pattern of Acetylation Using a Combination of Chitin Oligosaccharide Deacetylases. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 8716.
- (321) Wattjes, J.; Sreekumar, S.; Richter, C.; Cord-Landwehr, S.; Singh, R.; El Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M. Patterns Matter Part 1: Chitosan Polymers with Non-Random Patterns of Acetylation. *React. Funct. Polym.* **2020**, *151*, 104583.
- (322) Wattjes, J.; Niehues, A.; Moerschbacher, B. M. Robust Enzymatic-Mass Spectrometric Fingerprinting Analysis of the Fraction of Acetylation of Chitosans. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *231*, 115684.
- (323) Mohammed, M. A.; Syeda, J. T. M.; Wasan, K. M.; Wasan, E. K. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4).
- (324) Salomon, C.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. Recent Trends in the Development of Chitosan-Based Drug Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (4), 933–935.
- (325) Cord-Landwehr, C.; Richter, C.; Wattjes, J.; Sreekumar, S.; Singh, R.; Basa, S.; Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M. Patterns Matter (Part 2): Chitosan Oligomers with Defined Patterns of Acetylation. *React. Funct. Polym.* **2020**, *151*, 104577.
- (326) Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.* **2015**, *2* (3), 204–226.
- (327) Kumar, M. N. V. R. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1–27.
- (328) Bellich, B.; D'Agostino, I.; Semeraro, S.; Gamini, A.; Cesàro, A. “The Good, the Bad and the Ugly” of Chitosans. *Mar. Drugs* **2016**, *14* (5), 99.
- (329) Divya, K.; Jisha, M. S. Chitosan Nanoparticles Preparation and Applications. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16* (1), 101–112.
- (330) Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (1), 3–11.
- (331) Rodrigues, S.; Dionísio, M.; López, C. R.; Grenha, A. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3* (3), 615–641.
- (332) Chopra, S.; Mahdi, S.; Kaur, J.; Iqbal, Z.; Talegaonkar, S.; Ahmad, F. J. Advances and Potential Applications of Chitosan Derivatives as Mucoadhesive Biomaterials in Modern Drug Delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58* (8), 1021–1032.
- (333) Islam, M. A.; Park, T.-E.; Reesor, E.; Cherukula, K.; Hasan, A.; Firdous, J.; Singh, B.; Kang, S.-K.; Choi, Y.-J.; Park, I.-K.; Cho, C.-S. Mucoadhesive Chitosan Derivatives as Novel Drug Carriers. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21* (29), 4285–4309.
- (334) Menchicchi, B.; Fuenzalida, J. P.; Bobbili, K. B.; Hensel, A.; Swamy, M. J.; Goycoolea, F. M. Structure of Chitosan Determines Its Interactions with Mucin. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (10), 3550–3558.
- (335) Sogias, I. A.; Williams, A. C.; Khutoryanskiy, V. V. Why Is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules* **2008**, *9* (7), 1837–1842.
- (336) Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. Antimicrobial Properties of Chitosan and Mode of Action: A State of the Art Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *144* (1), 51–

- 63.
- (337) Moran, H. B. T.; Turley, J. L.; Andersson, M.; Lavelle, E. C. Immunomodulatory Properties of Chitosan Polymers. *Biomaterials* **2018**, *184*, 1–9.
- (338) Fong, D.; Hoemann, C. D. Chitosan Immunomodulatory Properties: Perspectives on the Impact of Structural Properties and Dosage. *Futur. Sci. OA* **2018**, *4* (1), FSO225.
- (339) Rabea, E. I.; Badawy, M. E. T.; Stevens, C. V.; Smagghe, G.; Steurbaut, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1457–1465.
- (340) Engwer, C.; Loy, R.; Chronakis, I. S.; Mendes, C.; Francisco, M. Mesoscopic Gelation of Chitosan and Genipin at below Critical Concentrations. *ChemRxiv* **2017**, 1–10.
- (341) No, H. K.; Young Park, N.; Ho Lee, S.; Meyers, S. P. Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74* (1–2), 65–72.
- (342) Nagamoto, T.; Hattori, Y.; Takayama, K.; Maitani, Y. Novel Chitosan Particles and Chitosan-Coated Emulsions Inducing Immune Response via Intranasal Vaccine Delivery. *Pharm. Res.* **2004**, *21* (4), 671–674.
- (343) Azuma, K.; Osaki, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6* (1), 33–49.
- (344) Mengatto, L. N.; Helbling, I. M.; Luna, J. A. Recent Advances in Chitosan Films for Controlled Release of Drugs. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6* (2), 156–170.
- (345) Ahmadi, F.; Oveisi, Z.; Samani, S. M.; Amoozgar, Z. Chitosan Based Hydrogels: Characteristics and Pharmaceutical Applications. *Res. Pharm. Sci.* **2015**, *10* (1), 1–16.
- (346) Albanna, M. Z.; Bou-Akl, T. H.; Blowytsky, O.; Walters, H. L.; Matthew, H. W. T. Chitosan Fibers with Improved Biological and Mechanical Properties for Tissue Engineering Applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2013**, *20*, 217–226.
- (347) Chua, B. Y.; Al Kobaisi, M.; Zeng, W.; Mainwaring, D.; Jackson, D. C. Chitosan Microparticles and Nanoparticles as Biocompatible Delivery Vehicles for Peptide and Protein-Based Immunocontraceptive Vaccines. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (1), 81–90.
- (348) Vida, Z.; Morteza, A.; Amir, D. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Rev.* **2015**, *2* (3), 204–226.
- (349) Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. .; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 125–132.
- (350) Ostrowska-Czubenko, J.; Gierszewska, M.; Pieróg, M. PH-Responsive Hydrogel Membranes Based on Modified Chitosan: Water Transport and Kinetics of Swelling. *J. Polym. Res.* **2015**, *22* (8), 1–12.
- (351) Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Chitosan-Based Drug Nanocarriers: Where Do We Stand? *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 496–504.
- (352) Piras, A. M.; Maisetta, G.; Sandreschi, S.; Gazzarri, M.; Bartoli, C.; Grassi, L.; Esin, S.; Chiellini, F.; Batoni, G. Chitosan Nanoparticles Loaded with the Antimicrobial Peptide Temporin B Exert a Long-Term Antibacterial Activity in Vitro against Clinical Isolates of Staphylococcus Epidermidis. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 372.
- (353) Jie Wang, J.; Wu Zeng, Z.; Zhong Xiao, R.; Xie, T.; Lin Zhou, G.; Ri Zhan, X.; Ling Wang, S. Recent Advances of Chitosan Nanoparticles as Drug Carriers. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 765–774.
- (354) Jayakumar, R.; Menon, D.; Manzoor, K.; Nair, S. V.; Tamura, H. Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Based Nanomaterials—A Short Review.

- Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (2), 227–232.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>.
- (355) Goycoolea, F. M.; Brunel, F.; Gueddari, N. E. El; Coggiola, A.; Lollo, G.; Moerschbacher, B. M.; Remuñán-López, C.; Delair, T.; Domard, A.; Alonso, M. J. Physical Properties and Stability of Soft Gelled Chitosan-Based Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2016**, *16* (12), 1873–1882.
- (356) Kleine-Brueggeney, H.; Zorzi, G. K.; Fecker, T.; El Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M.; Goycoolea, F. M. A Rational Approach towards the Design of Chitosan-Based Nanoparticles Obtained by Iontropic Gelation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *135*, 99–108.
- (357) Sreekumar, S.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Rivera-Rodriguez, G. R. Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano- and Microparticles. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 4695.
- (358) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Monovalent Salt Enhances Colloidal Stability during the Formation of Chitosan/Tripolyphosphate Microgels. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10392–10399.
- (359) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Salt-Assisted Mechanistic Analysis of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Formation. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (11), 3868–3876.
- (360) Sawtarie, N.; Cai, Y.; Lapitsky, Y. Preparation of Chitosan/Tripolyphosphate Nanoparticles with Highly Tunable Size and Low Polydispersity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *157*, 110–117.
- (361) Huang, Y.; Cai, Y.; Lapitsky, Y. Factors Affecting the Stability of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogels: Resolving the Opposing Findings. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (29), 5957–5970.
- (362) Huang, Y.; Lapitsky, Y. On the Kinetics of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Aggregation and Their Effects on Particle Polydispersity. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *486*, 27–37.
- (363) Dmour, I.; Taha, M. O. Novel Nanoparticles Based on Chitosan-Dicarboxylate Conjugates via Tandem Iontropic/Covalent Crosslinking with Tripolyphosphate and Subsequent Evaluation as Drug Delivery Vehicles. *Int. J. Pharm.* **2017**, *529* (1–2), 15–31.
- (364) Chen, K.-Y.; Zeng, S.-Y. Fabrication of Quaternized Chitosan Nanoparticles Using Tripolyphosphate/Genipin Dual Cross-Linkers as a Protein Delivery System. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10* (11), 1226.
- (365) Romanazzi, G.; Feliziani, E.; Baños, S. B.; Sivakumar, D. Shelf Life Extension of Fresh Fruit and Vegetables by Chitosan Treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *57* (3), 579–601.
- (366) Marchand, P. A. Basic and Low-Risk Substances under European Union Pesticide Regulations: A New Choice for Biorational Portfolios of Small and Medium-Sized Enterprises. *J. Plant Prot. Res.* **2017**, *57* (4), 433–440.
- (367) Pavan Kumar, N. B. Chitosan in Medicine-A Mini Review. *J. Mol. Pharm. Org. Process Res.* **2017**, *5* (1), 134.
- (368) Aranaz, I.; Acosta, N.; Civera, C.; Elorza, B.; Mingo, J.; Castro, C.; Gandía, M.; Heras Caballero, A.; Aranaz, I.; Acosta, N.; Civera, C.; Elorza, B.; Mingo, J.; Castro, C.; Gandía, M. D. los L.; Heras Caballero, A. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers (Basel)*. **2018**, *10* (2), 213.
- (369) Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C. V. Recent Developments in Antibacterial and Antifungal Chitosan and Its Derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 268–283.

- (370) Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C.; Zou, X. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (16), 2693–2700.
- (371) Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 6017–6084.
- (372) Ouattara, B.; Simard, R. E.; Piette, G.; Begin, A.; Holley, R. A. Inhibition of Surface Spoilage Bacteria in Processed Meats by Application of Antimicrobial Films Prepared with Chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *62* (1–2), 139–148.
- (373) Wang, B.; Wang, J.; Li, D.; Ren, K.; Ji, J. Chitosan/Poly (Vinyl Pyrrolidone) Coatings Improve the Antibacterial Properties of Poly(Ethylene Terephthalate). *Appl. Surf. Sci.* **2012**, *258* (20), 7801–7808.
- (374) Sudarshan, N. R.; Hoover, D. G.; Knorr, D. Antibacterial Action of Chitosan. *Food Biotechnol.* **1992**, *6* (3), 257–272.
- (375) Liu, X. F.; Guan, Y. L.; Yang, D. Z.; Li, Z.; Yao, K. D. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *79*, 1324–1335.
- (376) Helander, I. ; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71* (2–3), 235–244.
- (377) Costa, E. M.; Silva, S.; Pina, C.; Tavaría, F. K.; Pintado, M. Antimicrobial Effect of Chitosan against Periodontal Pathogens Biofilms. *SOJ Microbiol Infect Dis* **2014**, *2* (1), 1–6.
- (378) Mansilla, A. Y.; Albertengo, L.; Rodríguez, M. S.; Debbaudt, A.; Zúñiga, A.; Casalengué, C. A. Evidence on Antimicrobial Properties and Mode of Action of a Chitosan Obtained from Crustacean Exoskeletons on *Pseudomonas Syringae* Pv. Tomato DC3000. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (15), 6957–6966.
- (379) Akyuz, L.; Kaya, M.; Mujtaba, M.; Ilk, S.; Sargin, I.; Salaberria, A. M.; Labidi, J.; Cakmak, Y. S.; Islek, C. Supplementing Capsaicin with Chitosan-Based Films Enhanced the Anti-Quorum Sensing, Antimicrobial, Antioxidant, Transparency, Elasticity and Hydrophobicity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *115*, 438–446.
- (380) Zhang, A.; Mu, H.; Zhang, W.; Cui, G.; Zhu, J.; Duan, J. Chitosan Coupling Makes Microbial Biofilms Susceptible to Antibiotics. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 3364.
- (381) Lin, Y.-H.; Tsai, S.-C.; Lai, C.-H.; Lee, C.-H.; He, Z. S.; Tseng, G.-C. Genipin-Cross-Linked Fucose-Chitosan/Heparin Nanoparticles for the Eradication of *Helicobacter Pylori*. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4466–4479.



3. Antecedentes, hipótesis y objetivos /
Background, hypotheses and objectives

**3. ANTECEDENTES,
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

/

**BACKGROUND,
HYPOTHESES
AND OBJECTIVES**



ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De la Introducción anterior podemos destacar que los mecanismos moleculares y las fluctuaciones que gobiernan la interacción entre los efectores transcripcionales y los autoinductores son clave en el control de la precisión de los comportamientos coordinados de QS bacteriano. La comprensión fundamental de estos procesos sigue siendo objeto de intensa investigación y debate entre los expertos en QS. En este sentido, el diseño y optimización de mecanismos de regulación y coordinación celular, tanto en cepas biosensoras recombinantes como *in silico*, en especial los basados en circuitos LuxI-R, constituyen herramientas muy potentes para aplicaciones en la interferencia con el QS. Una vez conocidos los efectos que las fluctuaciones moleculares a nivel de LuxR y AHL ejercen sobre el fenotipo de QS, se puede extrapolar este conocimiento para caracterizar otro tipo de perturbaciones. En el contexto de esta tesis, dicha extrapolación se ha utilizado para caracterizar interferencias sobre estos sistemas, entre ellas las ejercidas por inhibidores de QS o nanopartículas de quitosano.

En un escenario de emergencia frente a la creciente expansión de resistencias a antibióticos y de búsqueda de nuevos agentes de control antimicrobiano, el quitosano (CS) ha ganado terreno en la última década, dada su bioactividad a nivel de las membranas bacterianas ^{1,2}. Las micro- y nanopartículas (NPs) a base de CS, en concreto, ofrecen un gran potencial como agentes de control microbiano de nueva generación, no solo por sus propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas, sino también por su capacidad para incorporar ligandos específicos o actuar como vehículos de liberación de fármacos ^{3,4}. Además, presentan una serie de cualidades que las hacen especialmente interesantes en aplicaciones biomédicas, a destacar, su biocompatibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad y carga

superficial positiva, que les confiere capacidad promotora de la absorción y de interacción con superficies celulares y mucosas ^{5,6}. Sin embargo, las propiedades intrínsecas del CS y las NPs de CS como agentes de *quorum quenching* (QQ) apenas se han comenzado a explorar en profundidad ⁷⁻¹⁰. Teniendo esto en cuenta, nos planteamos la **hipótesis principal** de que *las características estructurales de las NPs de CS pueden afectar drásticamente su comportamiento en la interfase NP-bacteria, determinando la bioactividad desplegada por las mismas, concretamente en el contexto de la interferencia con el QS*. En base a esto, planteamos el desarrollo de distintos tipos de NPs de CS sintetizadas bajo estrategias de entrecruzamiento iónico y co-entrecruzamiento iónico/covalente, para explorar la influencia de la estructura de los distintos tipos de NPs sobre su estabilidad coloidal y actividad QQ.

Para caracterizar la bioactividad de las NPs de CS decidimos utilizar un biosensor de QS de alta sensibilidad. El biosensor sintético basado en *Escherichia coli* descrito por Canton *et al.* ¹¹ porta una versión truncada del regulón lux de *Aliivibrio fischeri*. Además, contiene un reportero fluorescente que permite la cuantificación precisa de la respuesta de QS mediada por AHL exógena a concentraciones sub-nanomolares, constituyendo así una herramienta ideal para estudiar la actividad QQ. La predictibilidad de la respuesta del biosensor nos hace plantearnos una segunda hipótesis enunciada así: *la aplicación de interferencias específicas sobre el biosensor se puede traducir en mecanismos concretos de inhibición de la respuesta regulada por LuxR*. Esta segunda hipótesis tiene amplia relevancia sobre la posibilidad de testar el potencial QQ de nuestras NPs y, por lo tanto, su capacidad de utilización como agentes antimicrobianos de nueva generación.

En base a estas dos hipótesis, los **objetivos** de esta tesis se plantean como sigue:

Objetivo I. Capítulo 1: Puesta a punto del funcionamiento del biosensor *E. coli* fluorescente. Esto conlleva el análisis y comprensión de las posibles interferencias sobre su mecanismo de QS a partir de

ensayos en cultivos in vivo y de simulaciones in silico en los que se modelan diferentes escenarios de inhibición del QS.

Objetivo II. Capítulos 2 y 3: Desarrollo de NPs de CS con elevada estabilidad en medio microbiológico y características fisicoquímicas óptimas para la interacción con bacterias. Para ello se explorará la modificación de la ultraestructura de las NPs y su caracterización por métodos de dispersión de alta resolución (sincrotrón SAXS y dispersión de luz dinámica). Una vez seleccionados los prototipos de NPs con características coloidales óptimas, se evaluará su bioactividad sobre el crecimiento del biosensor y su efecto QQ.

3.1. REFERENCIAS

- (1) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (2) Gomes, L. P.; Anjo, S. I.; Manadas, B.; Coelho, A. V.; Paschoalin, V. M. F. Proteomic Analyses Reveal New Insights on the Antimicrobial Mechanisms of Chitosan Biopolymers and Their Nanosized Particles against *Escherichia Coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21* (1), 225.
- (3) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (4) Ma, Z.; Kim, D.; Adesogan, A. T.; Ko, S.; Galvao, K.; Jeong, K. C. Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-Organisms without Increasing Resistance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (17), 10700–10709.
- (5) Sandri, G.; Rossi, S.; Bonferoni, M. C.; Ferrari, F.; Mori, M.; Caramella, C. The Role of Chitosan as a Mucoadhesive Agent in Mucosal Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2012, pp 275–284.
- (6) Gzyra-Jagiela, K.; Pęczek, B.; Wiśniewska-Wrona, M.; Gutowska, N. Physicochemical Properties of Chitosan and Its Degradation Products. In *Chitin and Chitosan*; Wiley, 2019; pp 61–80.
- (7) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an *E. Coli* Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*.
- (8) Muslim, S. N.; Kadmy, I. M. S. A.; Ali, A. N. M.; Salman, B. K.; Ahmad, M.; Khazaal, S. S.; Hussein, N. H.; Muslim, S. N. Chitosan Extracted from *Aspergillus Flavus* Shows Synergistic Effect, Eases Quorum Sensing Mediated Virulence Factors and Biofilm against Nosocomial Pathogen *Pseudomonas Aeruginosa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107* (PartA), 52–58.
- (9) Rubini, D.; Banu, S. F.; Subramani, P.; Hari, B. N. V.; Gowrishankar, S.; Pandian, S. K.; Wilson, A.; Nithyanand, P. Extracted Chitosan Disrupts Quorum Sensing Mediated Virulence Factors in Urinary Tract Infection Causing Pathogens. *Pathog.*

3. Antecedentes, hipótesis y objetivos / Background, hypotheses and objectives

- Dis.* **2019**, 77 (1), ftz009.
- (10) Engwer, C. Understanding the Principles of Bacterial Communication and Particle Formation, and the Interaction between Them (PhD Thesis), University of Münster, 2019.
 - (11) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26 (7), 787–793.



BACKGROUND, HYPOTHESES AND OBJECTIVES

Given the background in the preceding Introduction, we can highlight that the molecular mechanisms and the fluctuations that govern the interaction between the transcriptional effectors and the autoinducers are key in controlling the coordinated QS behaviour's precision. The fundamental understanding of these processes is still a subject of intense research and debate among the QS community. In this sense, the design and optimization of regulatory pathways for multicellular, coordinated mechanisms, both in recombinant biosensor strains and *in silico*, especially those based on LuxI-R circuits, constitute very powerful tools for *quorum quenching* (QQ) research and applications. Detailed knowledge of the underpinning effects of molecular fluctuations at the LuxR and AHL level on the QS phenotype can be readily extrapolated to characterize other types of disturbances. In the context of this thesis, this extrapolation has been used to characterize interferences on a LuxR-based biosensor, specifically, those exerted by QS inhibitors or chitosan nanoparticles. In a current scenario of emergent antibiotic resistance, and urgent search for new antimicrobial control agents, chitosan (CS) has gained traction in the last decade, due to its capacity to interact with bacterial surfaces and exert bioactivity both at the cellular and molecular levels^{1,2}. CS-based micro- and nanoparticles (NPs), in particular, offer great potential as next-generation antimicrobials, not only because of their physicochemical and antimicrobial properties, but also due to their ability to incorporate specific ligands or deliver therapeutic antimicrobial payloads^{3,4}. In addition, CS NPs possess a series of attributes that translate into diverse biomedical applications, including their biocompatibility, low toxicity, biodegradability, mucoadhesion and positive surface charge, which confers them the ability to interact with cells and mucosal surfaces and

promote drug absorption^{5,6}. However, the intrinsic properties of CS and CS NPs as QQ agents have only started to be explored in depth⁷⁻¹⁰. Taking this into account, here we propose a **main hypothesis** that *the ultrastructural characteristics of CS NPs can drastically affect their behavior at the NP-bacteria interface, determining their bioactivity, specifically in the context of interference with QS*. Based on this, we propose the development of different types of CS NPs, synthesized by means of ionic and ionic/covalent co-crosslinking, to explore their colloidal stability, structure and QQ activity.

To characterize the activity of the CS NPs we used a high-sensitive QS biosensor. The synthetic *Escherichia coli*-based biosensor described by Canton *et al.*¹¹ carries a truncated version of the *Aliivibrio fischeri lux* regulon. In addition, it contains a fluorescent reporter that allows the precise quantification of the QS response mediated by exogenous AHL at sub-nanomolar concentrations, thus constituting an ideal tool to evaluate QQ activity. The high predictability of the biosensor's response leads us to propose a **second hypothesis** stated as follows: *the application of specific perturbations on the biosensor may translate into defined mechanisms of inhibition of the LuxR-regulated response*. This second hypothesis is highly relevant to test the QQ potential of our CS NPs and, therefore, their potential to be used as new generation antimicrobials.

Based on these two hypotheses, the **objectives** of this thesis are proposed as follows:

Objective I. Chapter 1: To test and prepare the experimental conditions necessary to understand possible perturbations on the LuxR-regulated fluorescence response of the *E. coli* biosensor both in vivo and in silico. This objective includes modelling different quorum quenching (QQ) scenarios to be compared to CS-NP-induced QQ.

Objective II. Chapters 2 and 3: To test the bioactivity of chitosan nanoparticles (CS NPs) on the growth and quorum sensing (QS) response of the biosensor. This entails the development CS NPs with high stability in microbiological medium and optimal physicochemical

characteristics intended to NP-bacterium interactions. To this end, we will explore ultrastructural modifications of CS NPs and characterization by means of high-resolution scattering methods (SAXS synchrotron and dynamic light scattering). Once selecting NP prototypes with optimal colloidal characteristics, we will evaluate their effects on the growth and QS response of the biosensor.

3.1. REFERENCES

- (1) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (2) Gomes, L. P.; Anjo, S. I.; Manadas, B.; Coelho, A. V.; Paschoalin, V. M. F. Proteomic Analyses Reveal New Insights on the Antimicrobial Mechanisms of Chitosan Biopolymers and Their Nanosized Particles against Escherichia Coli. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21* (1), 225.
- (3) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (4) Ma, Z.; Kim, D.; Adesogan, A. T.; Ko, S.; Galvao, K.; Jeong, K. C. Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-Organisms without Increasing Resistance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (17), 10700–10709.
- (5) Sandri, G.; Rossi, S.; Bonferoni, M. C.; Ferrari, F.; Mori, M.; Caramella, C. The Role of Chitosan as a Mucoadhesive Agent in Mucosal Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2012, pp 275–284.
- (6) Gzyra-Jagiela, K.; Pęczek, B.; Wiśniewska-Wrona, M.; Gutowska, N. Physicochemical Properties of Chitosan and Its Degradation Products. In *Chitin and Chitosan*; Wiley, 2019; pp 61–80.
- (7) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*.
- (8) Muslim, S. N.; Kadmy, I. M. S. A.; Ali, A. N. M.; Salman, B. K.; Ahmad, M.; Khazaal, S. S.; Hussein, N. H.; Muslim, S. N. Chitosan Extracted from Aspergillus Flavus Shows Synergistic Effect, Eases Quorum Sensing Mediated Virulence Factors and Biofilm against Nosocomial Pathogen Pseudomonas Aeruginosa. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107* (PartA), 52–58.
- (9) Rubini, D.; Banu, S. F.; Subramani, P.; Hari, B. N. V.; Gowrishankar, S.; Pandian, S. K.; Wilson, A.; Nithyanand, P. Extracted Chitosan Disrupts Quorum Sensing Mediated Virulence Factors in Urinary Tract Infection Causing Pathogens. *Pathog. Dis.* **2019**, *77* (1), f1z009.
- (10) Engwer, C. Understanding the Principles of Bacterial Communication and Particle Formation, and the Interaction between Them (PhD Thesis), University of Münster, 2019.
- (11) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.



**4. CHAPTER 1.
PERCOLATION THEORY
CAN BE USED TO DESCRIBE
THE QUORUM- INDUCED
RESPONSE OF A SYNTHETIC
E. COLI BIOSENSOR***

* Part of the results from this Chapter have already been pre-published as a preprint on the open server for biology bioRxiv as: Vila-Sanjurjo, C.^{1,2}, Engwer, C.¹, Qin, X.¹, Hembach, L.¹, Verdía-Cotelo³, T., Remuñán-López, C.², Vila-Sanjurjo, A.³ and F.M. Goycoolea¹. bioRxiv 074369; doi: <https://doi.org/10.1101/074369>

¹ Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Schlossgarten 3, 48149 Münster, Germany.

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Vida, s/n, 15782 Santiago de Compostela Spain.

³ Grupo GIBE. Departamento de Bioloxía Celular e Molecular, Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA). Universidade da Coruña. Campus Zapateira, s/n, 15071 A Coruña, Spain.



4.1. ABSTRACT

Quorum sensing (QS) explains a type of bacterial cell-cell communication mediated by exocellular compounds that act as autoinducers (AIs). Synthetic bacterial QS biosensors constitute effective and convenient systems to test the potential antibacterial action of anti-QS compounds. Here, we used agent-based modeling to computationally simulate the QS response of an engineered *Escherichia coli* biosensor carrying a fluorescent version of the *Aliivibrio fischeri* luxR/luxI QS device, which responds to externally added *N*-acyl-homoserine lactone (AHL). Key to our ability to model the biosensor's behavior, was the discovery that percolation theory (PT) can be used to describe its response mathematically, both *in vivo* and *in silico*. The similarity between the biosensor's response and physical percolation-driven processes provides new mathematical tools that can be used to interpret better and model QS inhibitors' action. As a result, we show both *in vivo* and *in silico* evidence that the known QS inhibitor cinnamaldehyde (CA) acts by increasing the apparent percolation critical time. Agent-based modeling allowed us to test a hypothesis in which CA's inhibitory action is exerted by covalently inactivating LuxR in its AHL-bound form. A wave of AHL release, likely following LuxR degradation, was responsible for the emergence of a delayed response similar to the one observed *in vivo*.

4.2. INTRODUCTION

Quorum sensing (QS) explains a type of bacterial cell-to-cell communication mediated by exocellular chemical compounds that act as autoinducers (AIs). The LuxR/I system of *Aliivibrio fischeri* was the first QS regulatory network to be discovered. In many Gram negatives, freely diffusible AIs are acyl-homoserine lactones (AHLs) synthesized by LuxI-type enzymes. These AHLs can bind intracellularly to LuxR-type regulators of gene expression, thus becoming competent to bind to DNA and drive a QS response^{1,2}. Conceptually, the QS response can be split into its “listening” and “speaking” components, i.e. the power to sense AI levels by AI receptors vs. the ability to synthesize and release AIs, respectively. The “speaking” component of AHL-mediated QS is actively built by the community via the accumulation of AHLs. In turn,

the “listening” component is intracellular, and it is composed of the complexes between QS regulators and AHLs.

Given that cell-to-cell communication by QS has profound implications in the control of many important bacterial traits (e.g. biofilm formation, secretion of virulence factors, etc.), QS is a target for multidisciplinary research, attracting the attention not only of the microbiology community but also of researchers in the fields of systems and synthetic biology^{3,4}. As a result, a variety of mathematical models and/or computer simulation algorithms describing QS responses have been recently reported. A recurrent feature revealed by many of these models is the importance of gene expression noise in shaping QS responses^{3,5-14}. Despite all these advances, we still do not fully understand how individual cellular responses translate into the cell-density-dependent synchronicity and critical transition observed at the population level that characterize QS. Understanding this aspect of QS is key to develop an accurate model of bacterial cell-to-cell communication.

Since the cell-density-dependent behavior of the whole system arises from the complex interplay of a myriad of biochemical rules (e.g., species concentrations, reaction rates, binding constants, gene expression rates, and so on), simulating *in silico* the population behavior ultimately requires knowledge of all these parameters. Not surprisingly, approaches that simplify the complex mechanistic, microscopic variables at play in QS have been proposed¹². Percolation theory (PT) is a general mathematical formalism that describes connectivity and transport in geometrically complex systems. Specifically, PT describes the behavior of a system in the vicinity of a critical threshold above which, an infinite cluster of interconnected objects spans a given network system. Notably, the mathematical simplicity of PT makes it highly convenient to explain a diversity of complex physical and biological processes that occur as a result of critical phenomena¹⁵⁻¹⁸. Here, we show, for the first time, that PT can be used to conveniently describe the “listening” component of QS. Moreover, the percolation-like behavior of the cell population can be used to validate the results of computer simulations connecting microscopic events in single, virtual cells to the population's phenotypic

behavior. We took advantage of this to simulate, by agent-based modeling, a simplified QS system¹¹. This approach allowed us to simulate the “listening” end of QS without previous precise knowledge of the microscopic rules governing the QS system *in vivo*, arriving at an *in silico* model of QS that remarkably resembled its *in vivo* counterpart.

4.3. MATERIALS AND METHODS

4.3.1. *E. coli* biosensor assays

All the biosensor experiments presented in this Chapter were carried out and interpreted by Celina Vila-Sanjurjo and preliminarily published as part of a bioRxiv preprint, co-authored by Celina Vila-Sanjurjo and C. Engwer in 2016¹⁹.

The *E. coli* strain Top10 was transformed with plasmid pSB1A3 - BBa_T9002, carrying the BBa_T9002 genetic device (Registry of Standard Biological Parts: http://parts.igem.org/Part:BBa_T9002; <http://parts.igem.org/Part:pSB1A3>), kindly donated by Prof. Anderson Lab (UC Berkeley, USA). The transformed strain is a biosensor that can respond to the N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (named AHL hereafter).

To minimize experimental variability, we strictly adhered to the following seeding protocol. A flask with 10 mL of Luria Bertani (LB) broth, supplemented with 200 µg/mL ampicillin, was inoculated with a single colony from a freshly streaked plate of strain Top10 pSB1A3 - BBa_T9002. After incubation for 18 h at 37°C with vigorous shaking, 0.5 mL aliquots of the overnight culture were mixed with 0.5 mL of 30% glycerol and stored at -80°C until further usage. Prior to each experiment, a glycerol stock from the single colony-culture was diluted by a factor of 10⁻³ into 20 mL of M9 minimal medium supplemented with 0.5% casamino acids, 1 mM thiamine hydrochloride and ampicillin (200 µg/mL) and grown to an OD₆₀₀ of 0.04 ± 7.76x10⁻³ (~4 h). AHL (Sigma-Aldrich) was dissolved in acetonitrile to a stock concentration of 1x10⁻¹ M and stored at -20°C until further usage. Prior to each experiment, AHL stock was serially diluted in water to yield working solutions ranging from 1x10⁻² to 1x10⁻⁹ M. 20 µL of the AHL working solutions were transferred to the wells of a flat-bottomed 96-well plate (Greiner Bio-One, cat. # M3061). After the addition of 180

μL aliquots of the bacterial cultures, the final AHL concentration in the plates ranged from 1×10^{-10} to 1×10^{-6} M. Three blank wells with 200 μL of medium were used to measure the absorbance background. Additionally, three control wells were prepared to measure the fluorescence background. The plate was incubated in a Safire Tecan-F129013 Microplate Reader (Tecan, Crailsheim, Germany) at 37°C and with vigorous orbital shaking during the five seconds prior to each measurement. Absorbance and fluorescence were measured every six minutes with the following parameters: (fluorescence $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, fluorescence $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, integration time = 40 μs , number of flashes = 10, gain = 100, measurement mode = top). To avoid complications due to excessive evaporation during the determinations, only 294 min of growth were recorded (measured evaporation = 6.7 ± 0.27 %; $n=3$). For each experiment, the fluorescence intensity (FI) and OD_{600} data were corrected by subtracting the values of absorbance and fluorescence backgrounds and expressed as the average for each condition ($n=3$). To estimate K_{Hill} , the rate of evolution of FI/ OD_{600} during the first 100 min of incubation was estimated from the slope of a linear fit of the FI/ OD_{600} -vs-time plots. The dependence of the FI/ OD_{600} rate as a function of AHL concentration was fitted to a non-linear growth sigmoidal Hill function by a minimization iteration process (OriginLab, Northampton, MA) and the best-fit parameters were determined. All measurements consisted in a minimum of three biological replicates.

4.3.2. Microscopy

Fluorescent imaging of the *E. coli* biosensor was performed as follows. Cultures of the *E. coli* biosensor induced with various concentrations of AHL were prepared as described above. After incubation at 37°C with shaking for 300 minutes in the microplate reader, as described above, 200- μL aliquots were transferred to CytoCapture imaging dishes with 20- μm hexagonal cavities (Zell-Kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Germany), followed by 30-min incubation at 37°C, to allow individual cells to settle within the cavities. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed using a Leica TCS SP2 spectral confocal scanner mounted on a Leica DM IRES

inverted microscope. All confocal images were acquired with the following settings: an HCX PL APO 63.0x 1.20 W CORR UV water-immersion objective, an argon excitation laser (488 nm), a 134.1 μm pinhole (1.0 Airy unit), standard Leica settings for GFP beam path, an emission bandwidth set to 500-600 nm, and a voxel width and height of 51.0 nm. Images were acquired from single scans with a line average of 4.0, scan speed of 400 Hz, and 8-bit resolution. Image processing was performed with Leica LAS AF Lite software. For time-lapse induction assays, induced cultures, prepared as described above, were immediately transferred after AHL inoculation to a CytoCapture imaging dish, incubated for thirty minutes at 37°C, and time-lapse imaged for one hour.

GFP fluorescence intensity was quantified with ImageJ. Each image was split into its RGB channels and fluorescence intensity was measured by selecting ROIs within individual cells in the overlaid micrographs. Background was measured from identical ROIs in the bright-field micrographs, and subtracted from the fluorescence intensity. Average autofluorescence was measured from no-AHL micrographs obtained exactly under the same conditions. For end-point fluorescence determination, 28-69 ROIs were measured from two independent images per condition, all belonging to a single experiment. For time-lapse fluorescence determination, 4-15 ROIs were measured from 39 images, all belonging to a single experiment and corresponding to times comprising 10.5 to 100.5 min after AHL induction.

4.3.3. Inhibition assays with trans-cinnamaldehyde

All the *in vivo* inhibition assays presented in this Chapter were carried out and interpreted by Celina Vila-Sanjurjo and preliminarily published as part of a bioRxiv preprint, co-authored by Celina Vila-Sanjurjo and C. Engwer in 2016¹⁹.

Pure grade *trans*-cinnamaldehyde (CA, Sigma-Aldrich) was dissolved in absolute ethanol to a concentration of 5×10^{-2} M and further sub-diluted in water to concentrations ranging from 2×10^{-2} to 2×10^{-3} M. A flask with 10 mL of LB, supplemented with 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin, was inoculated with a single colony from a freshly streaked plate of the *E. coli* biosensor strain. After incubation for 18 h at 37°C with vigorous

shaking, the culture was diluted by a factor of 10^{-3} into 20 mL of supplemented M9 minimal medium and grown to an OD_{600} of 0.05 – 0.1 (~4-5 h). 10 μ L of the CA solutions were mixed with 10 μ L of 1×10^{-8} M AHL and transferred to the wells of a flat-bottomed 96-well plate. 180- μ L aliquots of the bacterial culture were added to each well, thus yielding an AHL final concentration of 5×10^{-10} M and CA concentrations ranging from 1×10^{-4} to 1×10^{-3} M. Preparation of blank and control wells, as well as incubation and assay conditions, have been described above. Growth rates were estimated from the slopes of linearly fitted OD_{600} -vs-time plots during the first 100 min of growth.

4.3.4. Percolation function fitting

The fitting of the *in vivo* results to a percolation function was carried out by Celina Vila-Sanjurjo and preliminarily published as part of a bioRxiv preprint, co-authored by Celina Vila-Sanjurjo and C. Engwer in 2016¹⁹.

In its classical conception, PT describes the size of the cluster which is formed around the critical percolation threshold. To test if the formation of the QS response in the biosensor could be explained by percolation kinetics, we fitted the initial part of FI/ OD_{600} -vs.-time plots, the region before the plateau, to the percolation scaling law function (Eq. 1):

$$P_{\infty} = K \times (p - p_c)^{\beta} \quad (1)$$

This equation is equivalent to the three-parameter power Belehradek function (OriginLab, Northampton, MA). The use of the Belehradek function to approximate percolation phenomena has been described^{20,21}. In our case P_{∞} is the measured QS response, K is a proportionality constant, p_c is the critical concentration of the “percolation enabling agent” (the agent whose accumulation enables percolation) and β is the critical percolation exponent²². The exponent β characterizes the abrupt rising of the order parameter in a phase transition system²³. The value of the critical exponent solely depends on the dimensionality d of the lattice, thus making it universal.

By assuming that the “percolation enabling agent” accumulates in linear fashion with time (38), Eq. 1 can be written as:

$$P_{\infty} = K \times (t - t_c)^{\beta} \quad (2)$$

where t is time and t_c is the percolation critical time at which the critical concentration of the percolating intracellular molecule is reached.

4.3.5. Discrete-step simulations

To better constrain the parameters driving the model, we estimated the number of free and AHL-bound LuxR molecules in an experiment similar to that of **Figure 1A (Table S2)**. First, we calculated the number of cells per ml ($OD_{600} = 0.05$) by using the OD conversion factor of Volkmer & Heinemann²⁴. To simplify the calculations we imagined single bacterial cells as non-dividing, elongating rods whose volume increased according to the following equation²⁵:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (4)$$

where X is the combined volume of all the cells, t is time, and μ is the specific growth rate constant, which can be calculated as $\mu = \ln(2)/t_{doubl}$, where t_{doubl} is the doubling time (70.72 min, as determined from the curves shown in **Figure 1A**)²⁶. The initial cell volume was 3.2 fL, as estimated from Volkmer & Heinemann²⁴.

According to Kelly et al.²⁷, the *TetR* promoter used for the expression of LuxR in our biosensor, is expected to yield 132.86 GFP molecules $\text{cell}^{-1} \text{sec}^{-1}$ from a medium copy plasmid (~40 copies $\times \text{cell}^{-1}$, **Table S2**). Given the similar molecular weights of LuxR and GFP, 29 and 27 kDa, respectively, we used this rate directly to estimate the LuxR yield per biosensor cell. By using a copy number of 200 for plasmid pSB1A3 (<http://parts.igem.org/Part:pSB1A3>)^{27,28}, we estimated a synthesis rate (S) of 664.30 LuxR molecules $\times \text{cell}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$ (**Table S2**). These calculations relate GFP production to plasmid copy number.

For a protein expressed at a constant rate and degraded at a rate proportional to its concentration and assuming a constant cell volume (<http://bio5495.wustl.edu/SystemsBiology/SysBioGuide.html>):

$$dm_i/dt = S_i - D_i m_i \quad (5)$$

where m_i is the concentration of protein i (in molecules per cell), S_i is the synthesis rate of protein i (in molecules per second per cell), and D_i is the degradation rate constant for protein i (in units of protein per second). Once integrated in closed form, the following formula expresses the protein concentration m_i as a function of time t :

$$m(t) = (S/D) - [(S/D) - P_o]e^{-tD} \quad (6)$$

where P_o is the initial concentration of protein. At the equilibrium concentration (the limit as t goes to infinity), this expression reduces to S/D . Taking into account that the degradation rate (D) for LuxR has been estimated in 0.01 min^{-1} ²⁹, the steady state level of LuxR would be of nearly 5 million molecules of LuxR cell⁻¹ (3,985,800 molecules of LuxR cell⁻¹ or 4.21 mM. **Table S2**), assuming unlimited resources available to the cell.

To calculate the evolution of extracellular AHL concentration during the time of incubation with the biosensor, we turned to the measurements performed with *Pseudomonas aeruginosa* by Pearson et al.³⁰. In these studies, the authors established that this bacterium is freely permeable to N-butyryl homoserine lactone, so that the external and cytoplasmic concentrations of AHL equilibrate in less than 30 seconds³⁰. In addition, it has been determined that *E. coli* and *A. fischeri* are also freely permeable to AHL³¹. We used the results of Pearson et al.³⁰ to establish a lower limit to the permeability of our biosensor cells to AHL. Accordingly, every 30 seconds the equivalent of the whole cellular volume, represented by all the elongated rods in the culture, would equilibrate with the extracellular medium. Intracellular AHL molecules will remain trapped as LuxR-AHL complexes. Under these conditions the time-resolved levels of remaining external AHL can be easily simulated on a spreadsheet by using the following rules:

$$t = t_{.l} + 30 \text{ sec} \quad (7)$$

$$AHL_{taken,t} = vol_{cell,t} \times AHL_{left,t-1} + AHL_{taken,t-1} \quad (8)$$

$$AHL_{left,t} = AHL_{left,t-1} - AHL_{taken,t} \quad (9)$$

where $AHL_{left,t}$ is the concentration of AHL molecules (in molecules fL^{-1}) left at time t , $AHL_{left,t-1}$ is the total concentration of AHL (in molecules fL^{-1}) left at time $t-1$, $vol_{cell,t}$ is the total volume (in fL) occupied by the population of elongated rods at time t .

4.3.6. Simulation of the AHL-based response of bacteria in a 3D-cubic lattice model

The simulation software platform used was developed by Christoph Engwer as part of his PhD thesis, which contains a full description of the algorithm (2019)³². The simulations included in this work were carried out by Celina Vila-Sanjurjo and preliminarily published as part of a bioRxiv preprint, co-authored by Celina Vila-Sanjurjo and C. Engwer in 2016¹⁹, except for those aimed at elucidating the mode of CA-induced entailing LuxR inactivation with AHL release, which have not been published before. This mode of inhibition was modelled as the regular inactivators described in C. Engwer's PhD thesis³², but with the proviso of an AHL-release step, so that trapped AHLs could be returned to the system.

The complete description of the open-source software developed by Cristoph Engwer is available in his thesis³², and open-source code in Python, together with the stand-alone program, are available online (<https://www.engwer.net/d/response.html>). For clarity purposes only we include here a simplified description of the algorithm.

Briefly, the AHL-based bacterial response was simulated in an artificial 3D-cubic lattice in which bacteria were assumed to live, move, and replicate in the presence of diffusing AHL and inhibitor molecules, hereon named ligands. The lattice was divided into n^3 lattice wells, where n is the length of the lattice, and each of the wells have six neighboring positions connected by their edges.

The parameters driving bacterial growth, movement, and ligand diffusion, as well as the internal equilibrium kinetics, were calculated at discrete arbitrary time units for every bacterium and ligands present

in the lattice. Bacteria are randomly seeded with defined starting densities, representing the fraction of lattice-cells that are occupied at the beginning of the simulation. Bacteria were allowed to move randomly along the edges as long as neighboring lattice cells were not occupied by other bacteria. The growth rate was defined as the probability of a given bacterium to duplicate itself in a unit of time whenever an adjacent lattice cell was available. Such growth rate, defining the fraction of bacteria that duplicated within the lattice ensured logistic growth and resulted in growth curves that were in close agreement with experimental data (see Results section).

Ligands were also allowed to diffuse randomly across the lattice, being possible for more than one ligand to be present in the same lattice cell at a given time. The probability of encounter between an activator molecule and its potential ligands (signal, antagonist, or inactivator) is determined as follows. For every lattice cell the algorithm creates a dynamic and random list of ligand species at every time point. The ligand species that becomes available for binding to the activator monomer is randomly chosen from this list. Thus, the more abundant a ligand species is the more likely that it will be chosen for binding. Whether binding between the activator and the ligand occurs depends on the probabilities associated to their corresponding P parameter. Once a ligand molecule is chosen and bound to an activator, it is permanently removed from the list. Chosen, but unbound ligands are temporarily removed from the list until the next time point. The same sequence of events is performed for the next available activator until all activator molecules present in the lattice cell were allowed to bind. The list is dynamic and regenerates at every time step, according to ligand movement and availability in the lattice cells. Antagonists were allowed to compete with AHL for binding to activator molecules, with their own binding and release probabilities. AHL-trapping inactivators were similarly modeled but without release probabilities. AHL-trapping inactivators with the capability of returning AHL to the system were modeled as regular AHL-trapping inactivators but with the addition of an AHL-release probability, so that trapped AHLs could be returned to the system. For the sake of simplicity, all the events following dimerization were summarized in a single step. The number of

monomeric and dimeric activator species was randomly and asymmetrically distributed among the daughter cells^{6,33}.

The concordance of our simulations with Hill behavior was analyzed as follows. The levels of agent-normalized dimers at the end of the simulation were plotted against the initial signal density and the plot was fitted to a sigmoidal Hill function by a minimization iteration process (OriginLab, Northampton, MA) and the parameters providing the best fit were determined^{19,32}.

A complete set of the parameters used for the different simulations is available in **Table S3**.

4.4. RESULTS

4.4.1. The QS response of a synthetic *E. coli* biosensor can be described by a percolation function

We used a fluorescent *Escherichia coli* biosensor carrying a *luxI*-deficient synthetic genetic device based on the *lux* operon of *A. fischeri* as a simplified model of QS²⁸. This biosensor has been exhaustively characterized and shown to respond to exogenous AHL in a predictable manner²⁸. In this biosensor, binding of LuxR dimers to the *lux* pR promoter in the presence of externally added N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL, AHL) drives the expression of the green fluorescent protein (GFP)²⁸. **Figure 1 A** shows the results of experiments performed with three different concentrations of externally added AHL. The density-normalized fluorescence response, FI/OD₆₀₀, increased with growth up to a maximum level whose magnitude is determined by the AHL concentration. Even though the lowest AHL concentration (5×10^{-10} M) was below the K_{Hill} (**Figure S1**), it was still possible to quantify fluorescence evolution. In general, increasing AHL concentrations resulted in steeper curves and greater maximum values of the density-normalized fluorescent response. The semi-logarithmic growth curves (inset in **Figure 1 A**) indicated that varying the AHL concentration had no discernable effect in cell growth and showed that the cultures remained in log phase during the length of the experiment. The shape of the initial part of the response curves, with an abrupt take-off during the initial ~100 min, led us to hypothesize that the biosensor's

early QS response might be approximated by the percolation scaling law function (Equation 1):

$$P_{\infty} = K (p - p_c)^{\beta} \quad (1)$$

In its classical conception, PT describes the size of the cluster which is formed around the critical percolation threshold, p_c (Eq. 1), where the exponent β describes the abrupt rising of the order parameter in a phase transition system²³. The value of the critical exponent solely depends on the dimensionality d of the lattice, thus making it universal (see Materials and Methods). In a simple percolation process described in a five-dimensional lattice, β takes the universal value of 0.835^{22,34}.

By assuming that the concentration of the “percolation enabling agent”, i.e. the molecule whose accumulation triggers percolation in the system, varies linearly with time²⁰, Eq. 1 can be expressed as:

$$P_{\infty} = K (t - t_c)^{\beta} \quad (2)$$

In this form, Eq. 1 satisfactorily fitted the experimental data of **Figure 1A**. Representative plots showing the best-fit curves along with experimental data are shown in **Figure 1B** ($R^2 \geq 0.97$). The values of the fitting parameters are summarized in **Table S1**. Remarkably, both β and t_c parameters assume values that lie within a very narrow range and remain essentially independent of the AHL concentration (**Figure 1C** and **D**, **Table S1**). Moreover, the obtained β exponents hardly deviate from the universal value for d -defined percolating lattices with $d=5$, namely 0.835 (**Figure 1C**)^{22,34}. **Figure 1D** and **Table S1** also show that for all AHL concentrations, the t_c value (i.e., the critical time to trigger the response) is very short ($t_c= 7$ -10 min). Since a GFP molecule can be translated in about 17 seconds during fast growth³⁵ and the estimated average time constant for GFP maturation is 6.3 min²⁸, the

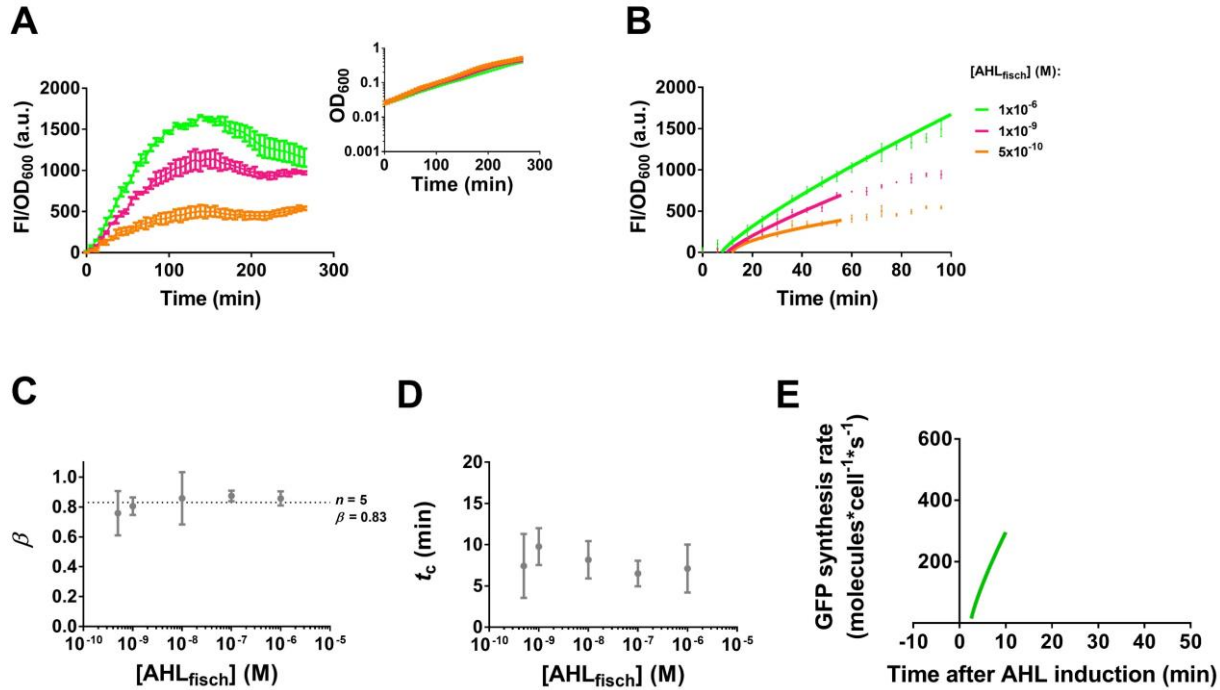


Figure 1. Adjustment of the density-normalized QS response of the *E. coli* biosensor to the percolation function.

Legend Figure 1: Adjustment of the density-normalized QS response of the *E. coli* biosensor to the percolation function. **A.** FI/OD₆₀₀-vs-time plots at three different AHL concentrations: 1×10^{-6} (green, above K_{Hill}), 1×10^{-9} (magenta, close to K_{Hill}) and 5×10^{-10} M (orange, below K_{Hill}). Inset: Corresponding OD₆₀₀ vs. time plot at the three different AHL concentrations. Data represent the mean and standard deviation of three independent experiments with three biological replicates each. The individual experiments of **A** are shown in **Figure S2**. **B.** Fit of representative density-normalized QS responses to the percolation function. The FI/OD₆₀₀ values (solid circles) observed during the first 100 minutes of incubation at the three different AHL concentrations were fitted to the percolation function (solid lines). The actual data used for the plot is shown in **Figure S2 A1, A4, and A5**. Panels **C** and **D** show the effect of AHL concentration on the percolation coefficients β and t_c , respectively. The dotted line in panel **C** represents the value of the universal exponent for a fractal dimension value of 5 ($d=5$). The plotted data was calculated by using all the percolation fittings shown in **Figure S2**. The actual percolation coefficients obtained from the fits in **B** and **Figure S2** are shown in **Table S1**. **E.** Fit to the percolation function of the results from Canton et al.²⁸ of density-normalized, QS-driven, GFP fluorescence over time by a synthetic *E. coli* biosensor identical to the one used here. X axis = time (min). Y axis = GFP synthesis rate (molecules \times cell⁻¹ \times s⁻¹). The solid line indicates the best fit to a percolation function. Original data, corresponding to Figure 3 in Canton et al.²⁸ is not shown for copyright reasons.

above t_c value strongly suggests that the system percolates immediately or very shortly after induction. These results agree with those of Canton et al.²⁸ obtained with a synthetic *E. coli* biosensor carrying a LuxR-driven GFP expression system identical to ours. When we fitted their results to Eq. 1, a t_c of 2.38 min was obtained (**Figure 1 E**), in good agreement with our conclusion that the system enters the “percolation phase” immediately after induction. In this case, the β exponent value was 0.80, again very close to the universal value. The putative percolative character of the biosensor’s response prompted us to elucidate the nature of the “percolation enabling agent”. To do this, we examined the dynamics of AHL accumulation inside biosensor cells. Based on the expression levels expected for the biosensor, we estimated that each biosensor cell could carry up to 4×10^6 LuxR molecules (see Materials & Methods, **Table S2**). This is likely an overestimate due to the fact that the total number of proteins in a typical *E. coli* cell ranges from 2 - 4×10^6 proteins per fL³⁶. Nevertheless, our estimate was consistent with the idea that LuxR must have been highly overexpressed

in the biosensor. Since it has been estimated that the maximum amount of overexpressed protein achievable in *E. coli*, before cell growth ceases, is $\sim 30\%$ of the total protein³⁷, we used this figure, together with the above limit for the total protein content in a typical *E. coli* cell (2×10^6 proteins per fL), and an estimated volume of 1.57 fL for actively growing biosensor cells (see Materials & Methods), to further constraint the maximum amount of intracellular LuxR. We reached a number of intracellular LuxR of 942,000 molecules ($\sim 1.57 \times 10^{-3}$ M, **Table S2**). Even with this corrected figure, the concentration of LuxR molecules in the system, 5.23×10^{13} molecules ml^{-1} , exceeded by two orders of magnitude that of intracellular AHL molecules at the K_{Hill} concentration, namely 4.50×10^{11} molecules ml^{-1} (see Materials & Methods, **Table S2**). At this concentration of AHL, one can assume that any free AHL molecule that enters the cell will always find a LuxR molecule available for binding. As a result, biosensor cells may be considered as “AHL traps” in which all the intracellular AHL remains bound to LuxR and none comes out. With this in mind, we performed a discrete-step simulation aimed at understanding the dynamics of intracellular AHL accumulation in our biosensor cells. Notably, intracellular AHL accumulation under these conditions displayed a clear linear character during a long portion of growth (**Figure 2**). These results strongly suggest that intracellular AHL could act as the “enabling agent” responsible for the percolative character of the biosensor’s response, in agreement with the assumptions of Eq. 1.

It is known that *A. fischeri* cells with the native *lux* architecture display high levels of variability in their responses, especially at early times³⁸, with single cells responding on different time scales to AHL and with variable amplitudes³⁸. To check whether high levels of single-cell heterogeneity could be detected in our *E. coli* biosensor, we observed the cells by fluorescent microscopy after induction with AHL. **Figure 3 A-D** and **Figure S3 A-D** show snapshots of biosensor cells obtained during growth in the presence of AHL. Clearly, all the cells in the population displayed similar levels of QS-dependent fluorescence upon induction with AHL concentrations below and above k_{Hill} . When we measured single-cell fluorescence intensity, only moderate levels of variability in the intensity of fluorescence could be detected within the

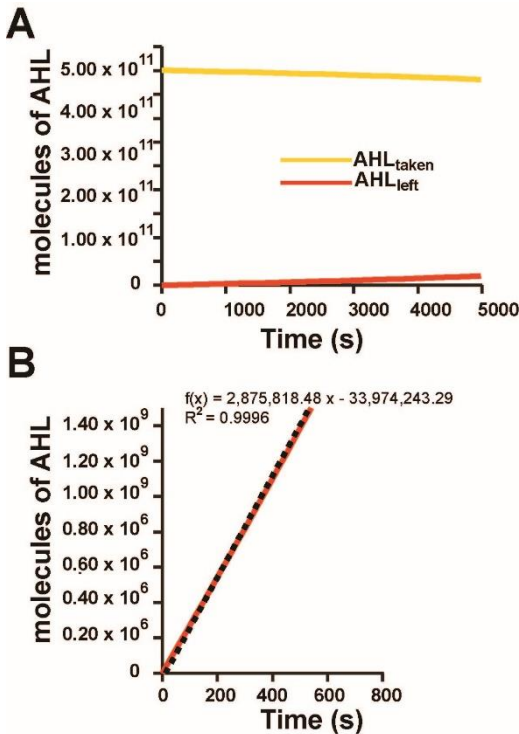


Figure 2. AHL intracellular accumulation under the “AHL trap hypothesis”. **A.** The figure shows the discrete-step simulation of the accumulation of intracellular AHL (AHL_{taken}) in elongated *E. coli* cells, as calculated with Eq. 8 (see Materials and Methods). Red line, AHL_{taken}; yellow line, depletion of external AHL (AHL_{left}) as calculated with Eq. 9 (see Materials and Methods). X axis, time in seconds; Y axes, number of AHL molecules. **B.** Linearity of intracellular AHL accumulation during the first 1000 seconds. X axis, time in seconds; Y axes, number of AHL molecules. Thick red line, simulated values; black, dashed line, fit to a linear function. The formula of the linear function and the R² coefficient of the fitting are shown.

same frame, regardless of the AHL concentration used in the experiment or the time after induction at which the frames were recorded (**Figure 3 E-F**). Taken all together, the data presented in **Figure 3**, **Figure S3**, and **Figure S4** are in agreement with the existence of a highly synchronous response of all the cells in the culture upon addition of AHL, in contrast to the high degree heterogeneity observed in the QS response of wild-type *A. fischeri*³⁸. In addition, the microscopy results suggest that the percolation-like response of our QS biosensor may be the result of the synchronous AHL-dependent activation of the whole cell population.

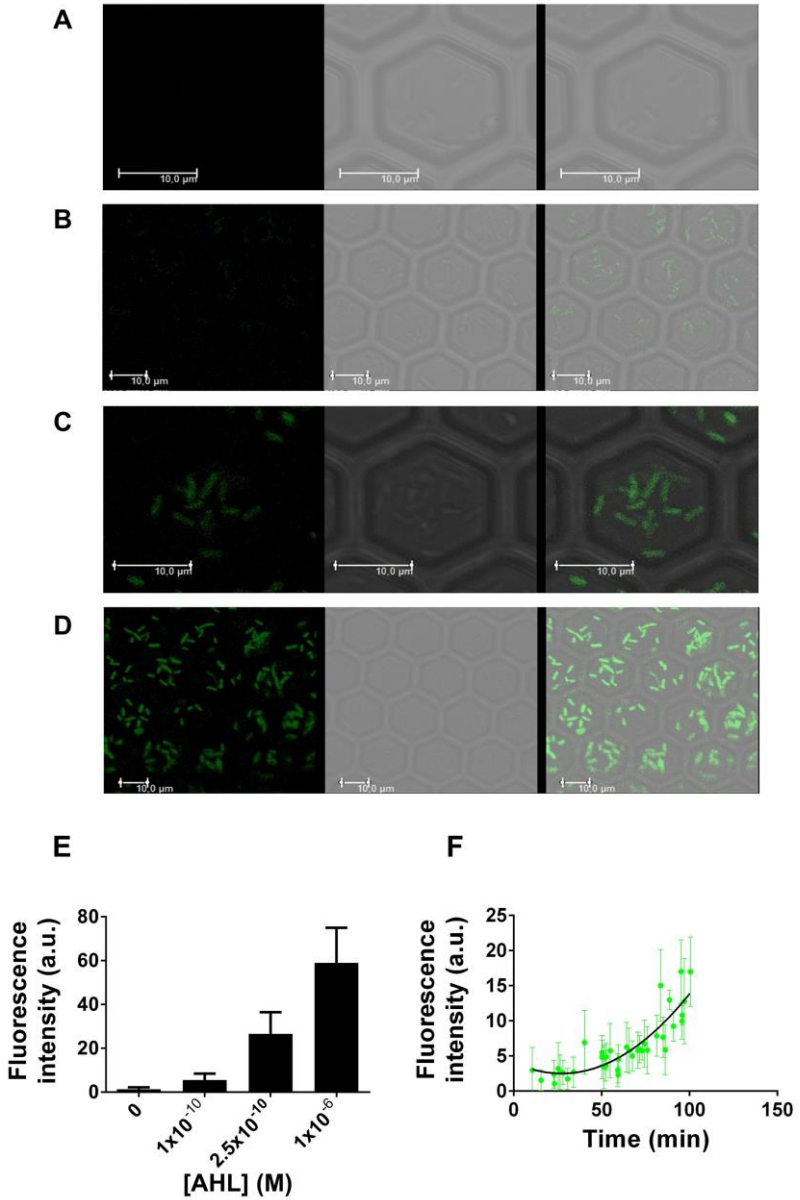


Figure 3. Fluorescence microscopy imaging of the *E. coli* biosensor.

Legend Figure 3: Fluorescence microscopy imaging of the *E. coli* biosensor. A-D. End-point fluorescence displayed by individual biosensor cells in the presence of 0 (A), 1×10^{-10} (B), 2.5×10^{-10} (C), and 1×10^{-6} M AHL (D). Left panel: GFP fluorescence; middle panel: bright-field; right panel; overlay. Scale bar is shown. **E.** Quantification of end-point fluorescence intensity in individual cells. Error bars show the mean and standard deviation of 28-69 regions of interest (ROIs) (see Materials and Methods). **F.** Evolution of fluorescence intensity over time. Data shows the mean and standard deviation of 4-15 ROIs in each time frame, belonging to the images shown in **Figure S4** plus additional time-lapse images (not shown) (see Materials and Methods). The black line shows the fitting of the data to a second order polynomial curve.

4.4.2. The response of the QS biosensor is sensitive to QS inhibitors

Next, we tested whether the fluorescent *E. coli* biosensor could be used to monitor the activity of QS inhibitors, such as trans-cinnamaldehyde (CA). CA is thought to compete with AHL decreasing LuxR's capacity of to bind its DNA target^{39,40}. **Figure 4 A** shows the results of a representative trial in which increasing concentrations of CA were added to the QS biosensor in the presence of a constant concentration of AHL (5×10^{-10} M). A clear dose-dependent response to the inhibitor was evident in these experiments. **Figure 4 A** show that CA had a prominent effect on the timing of the response. However, the shapes of the response curves were not too different from those of controls. While we have observed variation from experiment to experiment (see additional trials in **Figure S5**), the general trend is highly consistent and shows a clear dose-dependent retardation of the response's onset upon CA addition. **Figure 4 B** shows the fitting of the FI/OD₆₀₀-vs-time plots to percolation (best-fit parameters are shown in **Figure S5C**). In agreement with the delay observed in the original response (**Figure 4 A**), **Figure 4 C** shows that t_c increases linearly with CA concentration. On the contrary, the values of the β exponent appear to be independent of CA concentration and oscillate closely around the universal value for $d=5$ (**Figure 4D**), namely $\beta = 0.835$ ^{22,34}. Notably, CA can effectively delay the onset of the "percolation phase" in our QS system at concentrations that hardly affect cell growth ($< 500 \mu\text{M}$ CA) (**Figure 4 E**).

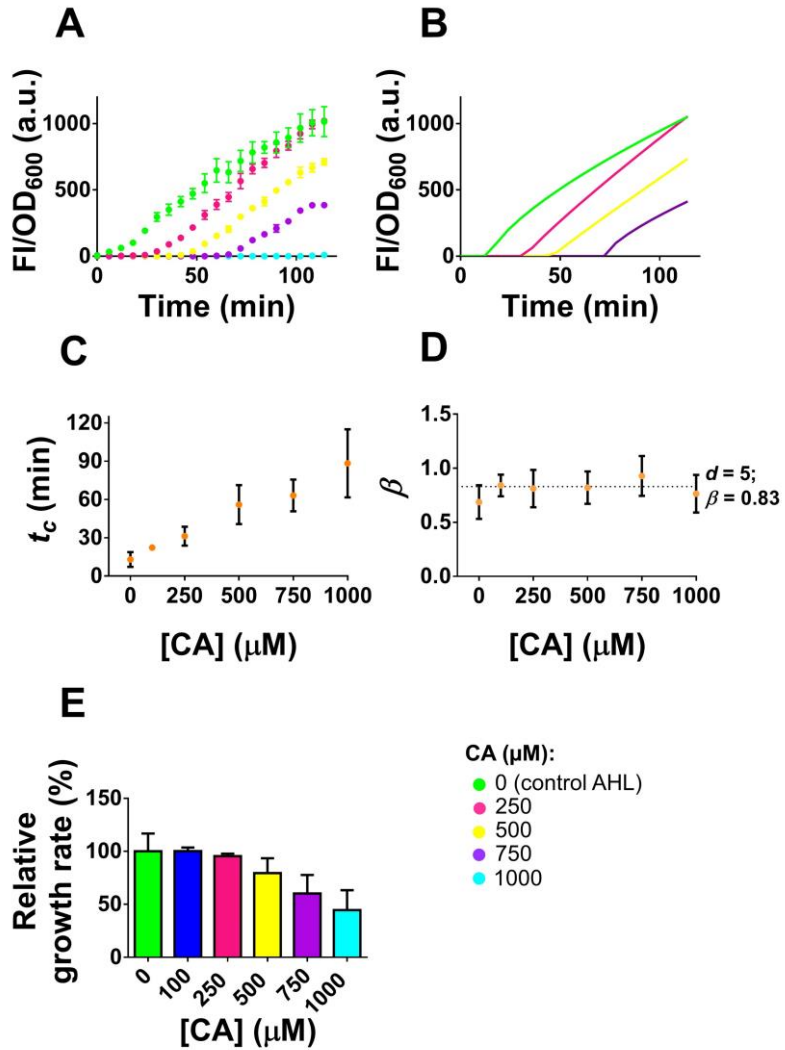


Figure 4. Effect of CA on the percolative response of the *E. coli* biosensor.

Legend Figure 4: Effect of CA on the percolative response of the *E. coli* biosensor. **A.** Representative FI/OD₆₀₀-vs-time plots after treatment of the *E. coli* biosensor with varying CA concentrations in the presence of 5x10⁻¹⁰ M AHL. Data points represent the mean (solid dots) and standard deviation (error bars) of three biological replicates in a single experiment. The actual data used for the plot are shown in **Figure S5C**. **B.** Solid lines represent the fit of the curves of **A** to the percolation function. Dots in **A** and solid lines in **B** are color coded to CA concentration as indicated in key (right bottom corner). Panels **C** and **D** show the effect of CA on the percolation parameters t_c and β , respectively. Data points represent the mean (solid dots) and standard deviation (error bars) of six independent experiments, with three biological replicates each. The plots were generated with the data of panel **A** and additional data shown in **Figure S5**. **E.** Endpoint effect of CA concentration on the growth rate of the *E. coli* biosensor during the first 100 minutes of incubation. Bars represent the mean and standard deviation (error bars) of six independent experiments, with three biological replicates each. The plot contains growth data from the same experiment of **A** plus all additional experiments shown in **Figure S5**.

4.4.3. *In silico* modeling of the biosensor's response

In his PhD thesis, Christoph Engwer (2019)³² developed an agent-based simulation platform to model the response of the *E. coli* biosensor. In this Chapter, we make use this software suite as a simulation tool to glean further insight into how the microscopic events in single-cells led to the synchronous fluorescent response observed at the population level with the biosensor. Most of the simulations presented here were originally published as part of a bioRxiv preprint¹⁹, as mentioned in Materials and Methods. Our aim was to arrive at a set of plausible rules governing the individual behavior of a virtual system of agents, which included bacteria, AHL, and LuxR, so that the emergent behavior of the system resembled the response observed *in vivo* (**Figure 1**). To this end, the agent-based simulation algorithm³² allowed us to describe the growth of idealized bacterial cells in a virtual 3D lattice in which all the microscopic rules, defining the flow of AHL and LuxR molecules through the system, had initial, user-defined probabilities assigned to them (**Figure 5 A**). To maintain a manageable level of unknown parameters, we restricted the number of microscopic rules to 1) P_{+1} and P_{-1} , governing the synthesis and degradation of species LuxR₁ (LuxR monomers), 2) P_{+2} and P_{-2} , governing the interconversion between LuxR₁ and [LuxR-AHL]₁ (LuxR-AHL monomeric complexes), and 3) P_{+3} and P_{-3} , governing the interconversion between [LuxR-AHL]₁ and [LuxR-AHL]₂ (LuxR-AHL

dimers) (see, **Figure 5 A**). To further simplify our simulations, we did not attempt to model events further downstream of [LuxR-AHL]₂ formation and used this LuxR species as a proxy for the *in silico* response. Hence, virtual cells carrying [LuxR-AHL]₂ were considered to be in the “ON state”, i.e. equivalent to the fluorescent cells observed *in vivo*, whereas the rest would be in the “OFF state” (**Figure 5 A**). The endpoint criteria of success for this *in silico* model would be as follows. The modeled response must: 1) Exhibit a high goodness of fit to a the percolation function of the form of Eq. 1 ($R^2 > 0.99$), 2) be able to reproduce the almost immediate response observed with the biosensor, 3) reproduce the universal and synchronous character of the response at the single-cell level, 4) recreate the Hill behavior of the experimental data, and 5) successfully recreate the response to the inhibitor observed *in vivo*. The “AHL trap” hypothesis was used to simplify our search of appropriate simulation conditions by setting the starting LuxR₁ species at saturating levels. No further assumptions were made regarding the rest of the initial parameters.

As shown by **Figure 5 B**, we managed to arrive at growth conditions that allowed logistic growth of the bacterial agent population. Next, we searched for P parameters that produced an accumulation of “ON” cells that resembled the FI/OD₆₀₀ plots obtained with the *in vivo* data (**Figure 1 A**). We focused our attention on simulations carried out with the following combination of P parameters: $P_{+1} = 0.5$, $P_{-1} = 0.01$, $P_{+2} = 0.8$, $P_{-2} = 0.1$, $P_{+3} = 0.9$, and $P_{-3} = 0.4$ (**Table S3**). As these parameters led to simulations that closely resembled the *in vivo* system, we called them the “chosen conditions”. In particular, the [LuxR-AHL]₁ and [Lux-AHL]₂ species showed a pattern of accumulation that strikingly resembled the FI/OD₆₀₀-vs-time plots obtained with the *in vivo* data (cf. right panel in **Figure 5 C** to **Figure 1A**). These parameters also gave rise to Hill behavior, as shown in **Figure 5 D** for the [Lux-AHL]₂ species ($K_{Hill} = 110.7 \pm 2.7$ AHL lattice- cell⁻¹).

Figure 5 E shows the signal-dependent evolution of all the LuxR species under the “chosen conditions”. As the LuxR₁ species becomes

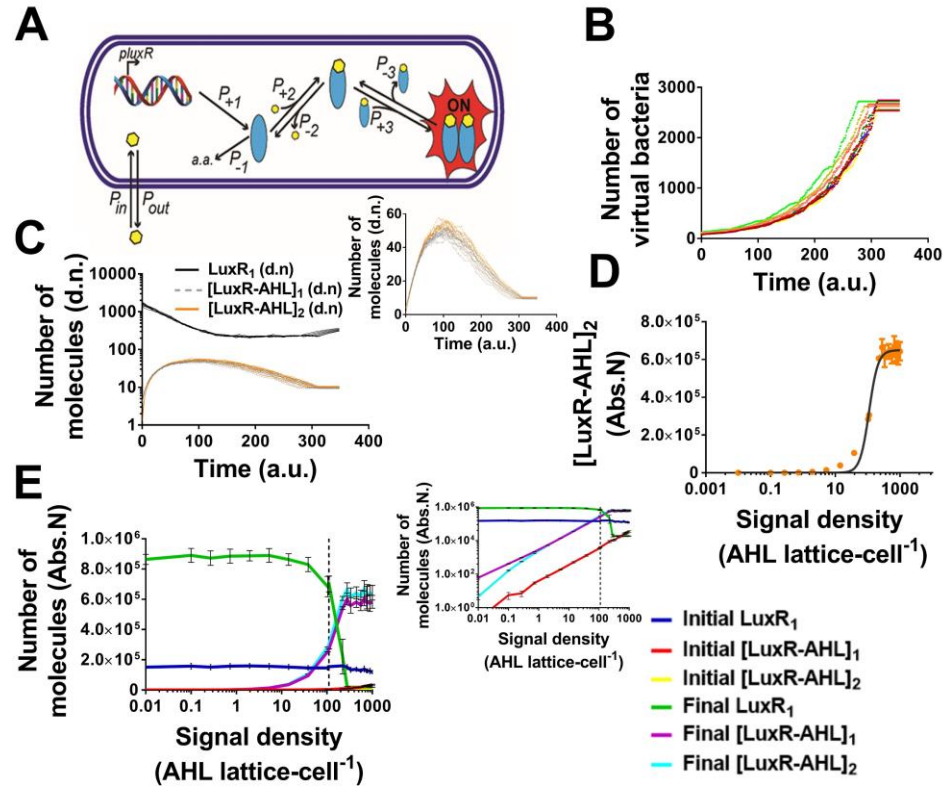


Figure 5. *In silico* simulation of the *E. coli* biosensor

Legend Figure 5: *In silico* simulation of the *E. coli* biosensor. **A.** Diagram showing the flow of molecules in our virtual bacterial cells. Stochastic transcription from a single p_{luxR} promoter (indicated by a DNA double helix) with a probability P_{+1} , yields the $LuxR_1$ species (cyan ovals). This species can either get degraded to its constituent amino acids (a.a) with a probability P_{-1} or capture an AHL molecule (yellow hexagon) with a probability P_{+2} , yielding the $[LuxR-AHL]_1$ species. This species can either fall back to $LuxR_1$ after dissociation from its bound AHL or dimerize with another $[LuxR-AHL]_1$ molecule to form the $[LuxR-AHL]_2$ species with probability P_{+3} . The $[LuxR-AHL]_2$ species can fall back to two $[LuxR-AHL]_1$ species. Virtual bacteria carrying $[LuxR-AHL]_2$ molecules are considered to be in the “ON state”. **B.** Simulated bacterial growth. Typical virtual growth curves from ten independent simulations are shown. X axis: simulation time in arbitrary units (a.u.) Y axis: number of virtual bacteria. **C.** Main panel. Time-resolved accumulation of the three LuxR species. Individual traces from ten independent simulations are shown. Traces were color coded as indicated. X axis, time; Y axis, density-normalized number of molecules. Y axis is shown in logarithmic scale in main panel for clarity. Inset. Same as main panel but with Y axis in regular scale, showing the resemblance to the *in vivo* data. **D.** Fitting of $[LuxR-AHL]_2$ levels to the Hill equation. Orange dots, average $[LuxR-AHL]_2$ levels; black curve, Hill-adjusted curve ($R^2 = 0.98$, $K_{Hill} = 110.7 \pm 2.7$ AHL lattice-cell⁻¹). Error bars indicate standard deviations from ten independent simulations. X axis: starting signal density in AHL lattice-cell⁻¹. Y axis: Absolute number of $[LuxR-AHL]_2$ molecules. **E.** Main panel. Average signal-dependent levels of LuxR species in the simulation. X axis: starting signal density. Y axis: Absolute number of molecules. Error bars indicate standard deviations from ten independent simulations. Vertical dotted line indicates K_{Hill} . Lines are color coded according to LuxR species as indicated. Inset. Same as main panel but with Y axis in logarithmic scale. The following simulation parameters (“chosen conditions”, see Table S3) were used in panels B-E: $P_{+1} = 0.5$, $P_{-1} = 0.01$, $P_{+2} = 0.8$, $P_{-2} = 0.1$, $P_{+3} = 0.9$, and $P_{-3} = 0.4$.

depleted, when the signal density approximates K_{Hill} (green line in **Figure 5 E**), both $[LuxR-AHL]_1$ (red line **Figure 5 E**) and $[LuxR-AHL]_2$ (cyan line in **Figure 5 E**) become the dominant intracellular LuxR species.

Next, we looked at the response at the virtual-cell-population level. The results are shown in **Figure 6**, in which the 3D virtual lattice was projected onto a 2D surface on which the cell and $[LuxR-AHL]_2$ accumulation along the third dimension was plotted.

By comparing the virtual cell tiles in **Figure 6** to the corresponding $[LuxR-AHL]_2$ tiles, one can see that the two patterns perfectly superimpose, indicating that 1) practically all the cells are on the ON state (contain $[LuxR-AHL]_2$) and 2) that the ON state in each column is proportional to the number of cells contained in the column. In other

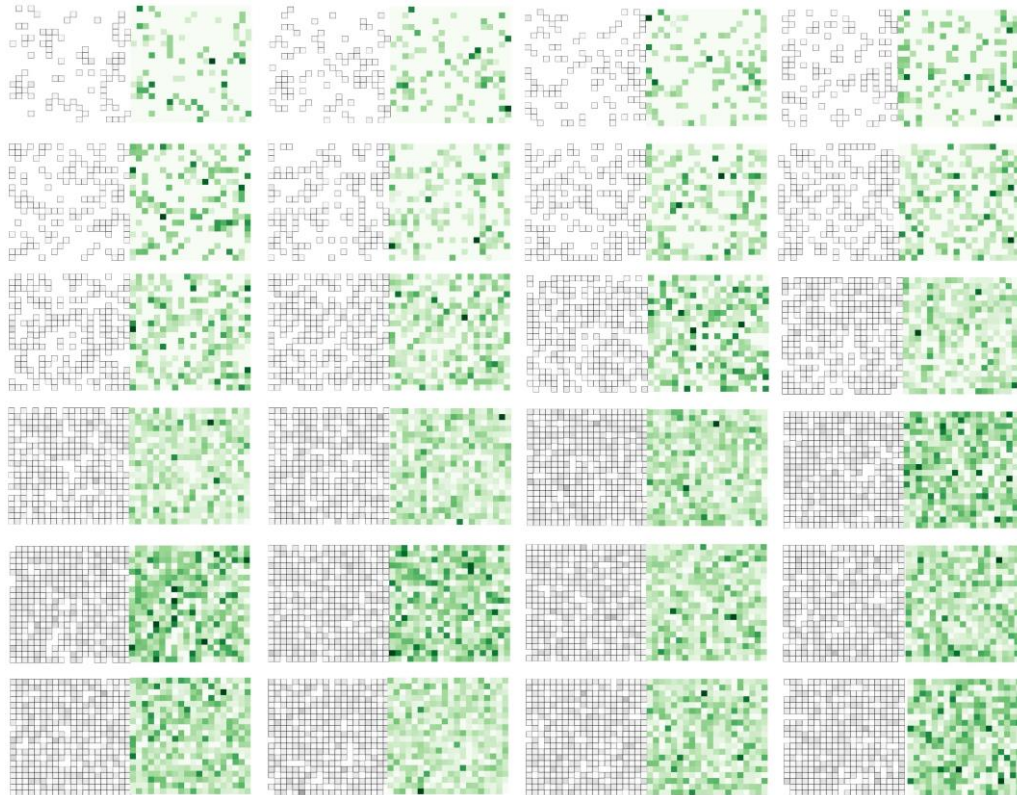


Figure 6. *In silico* population response. 2D representation of a simulation run showing the accumulation of $[\text{Lux-AHL}]_2$ over time in the virtual bacterial population. Each pair of tiles corresponds to one of 25-time steps equally spaced from time zero (top, left) until the end of the simulation (bottom, right) (total of 350-time steps). The plots are the result of the projection of the apical view of the 3D cubic lattice into 2D. Each pixel corresponds to a column in the box. Left tiles: time-resolved, total cell density in each column is represented by a scale of gray. Right tiles: time-resolved, accumulation of $[\text{LuxR-AHL}]_2$ in each column is represented by a scale of green (right panels).

words, the level of $[\text{LuxR-AHL}]_2$ is very similar in all cells. These results are in perfect agreement with our single-cell microscopic observations (**Figure 3**, **Figure S3** and **Figure S4**).

By using $[\text{LuxR-AHL}]_2$ -vs-time plots, we thoroughly assessed how varying the simulation P parameters affected the modeled response at the level of LuxR dimers. Starting with the “chosen conditions” (**Table S3**), each panel in **Figure 7** shows the effect of varying a single parameter. Except for extreme conditions that completely block the flow through the forward pathway of association between AHL and LuxR, e.g. making P_{+2} , and P_{+3} equal to zero (cyan traces in **Figure 7 B** and **C**), the shape of the virtual response is quite stable (see also **Figures S6** and **S7**). Besides these extreme values, the only two parameters causing a significant change in the shape of the density-normalized, $[\text{LuxR-AHL}]_2$ vs. time plots are the ones directly affecting the levels of $[\text{LuxR-AHL}]_2$ species, namely P_{+3} and P_{-3} (**Figure 7 C** and **F**). Making P_{+1} equal to zero has little effect on the shape of the response (**Figure 7 A**), due to the high number of starting LuxR molecules.

4.4.4. The *in silico* simulated response can be fitted to the percolation function

Next, we explored the percolative behavior of the *in silico* response. The insets in **Figure 7** show that, much like the *in vivo* response, the density-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_2$ -vs-time plots could be successfully fitted to the percolation function (Equation 1), yielding a β exponent and a t_c that are in close agreement with the values measured experimentally and our previously published results¹⁹.

In an attempt to explore the so far hidden biological meaning of the resemblance between percolation phenomena and the biosensor response, we decided to monitor how the simulation P parameters influenced the percolation coefficients. The curves with P_{+2} , and P_{+3} equal to zero (cyan traces lying along the X axes in panels **B** and **C** of **Figure 7**) were excluded from this analysis. **Figure 8** shows that all percolation coefficients are quite refractory to changes in the simulation

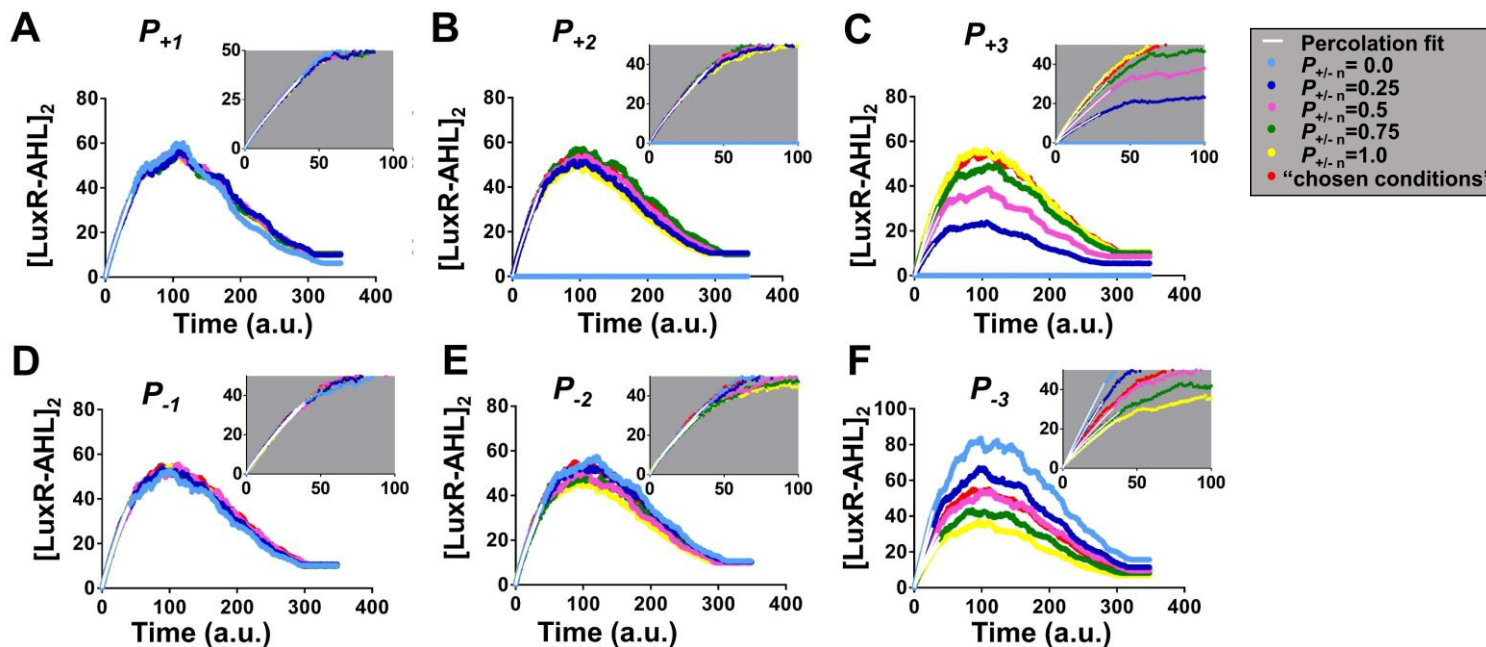


Figure 7. $[\text{LuxR-AHL}]_2$ -vs-time plots. A-F. The influence of the simulation P parameters P_{+1} , P_{+2} , P_{+3} , P_{-1} , P_{-2} , and P_{-3} on the levels of the density-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_2$ species is shown. In each panel the values of a given P parameter ($P_{+/-n}$) vary as indicated in the legend, while the values of the rest of the P -parameters remain set to the “chosen-condition” values (Table S3). Every trace represents a single, typical simulation trial out of a collection of ten replicates. X axis, simulation time in a.u.; Y axis, number of agent-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_2$. Curves are color-coded to the value of the selected P parameter as indicated in key. Insets: enlarged views of the $[\text{LuxR-AHL}]_2$ -vs-time plots near the origin, showing the fit of the percolation function (white, solid line).

parameters P_{+1} , P_{+2} , P_{-1} , and P_{-2} . Only the P parameters directly affecting the levels of the [LuxR-AHL]₂ species, P_{+3} and P_{-3} , had a significant influence on the values of K , t_c . (**Figure 8 C and F**) and β (**Figure 8 F**, inset). In the case of K , P_{+3} and P_{-3} had opposite effects on the magnitude of K , with P_{+3} driving K up in a linear fashion and P_{-3} doing exactly the opposite (cf. panels **C** and **F** in **Figure 8**). The effect of P_{+3} and P_{-3} on the percolation coefficient K is perfectly explained by the insets in panels **C** and **F** of **Figure 7**, in which the influence of these parameters on the slopes of the percolation fits is clearly visible. The percolation time t_c was close to zero regardless of the tested simulation parameters, except in the case of P_{+3} (**Figure 8C**). This means that restricting the flux of LuxR through the pathway leading to the [LuxR-AHL]₂ species, increases t_c . Since both P_{+2} and P_{+3} can restrict the flux along this pathway (Panels **E** and **F** in **Figure S6**), we believe that values of P_{+2} between 0 and 0.25 should also increase t_c . This hypothesis remains to be tested.

The β exponent fluctuates around the universal value for a d -defined percolating lattice with $d=5$, except for the cases of P_{-3} , which regulates the rate of conversion of [LuxR-AHL]₂ dimers back to two [LuxR-AHL]₁ monomers (**Figure 8 F** and **Table S4**). When P_{-3} is equal to zero, i.e. when the flow of LuxR dimers back to monomers is blocked, β reached a value above 0.9 and decreased towards the universal value thereof (inset in **Figure 8 F** and **Table S4**). The reason for this behavior is unknown, but it is clearly related to the aforementioned effect on K , as both vary in the same direction when P_{-3} changes. While it is possible that P_{+3} displays the opposite behavior, particularly at low values, more data points closer to zero would be necessary to firmly reach this conclusion.

We also fitted to percolation the accumulation of [LuxR-AHL]₁ (**Figure S7**). Notably, t_c took negative values (**Figure S8 A-F**). We believe that these values are an artifact due to the assumptions on initial conditions used during algorithm design, specifically the fact that [LuxR-AHL]₁ species are allowed to form at time 0. We observed that the β exponent took values between 0.7 and 0.8, a fact that could hypothetically indicate a decrease in the dimensionality of the percolation network (**Figure S8**).

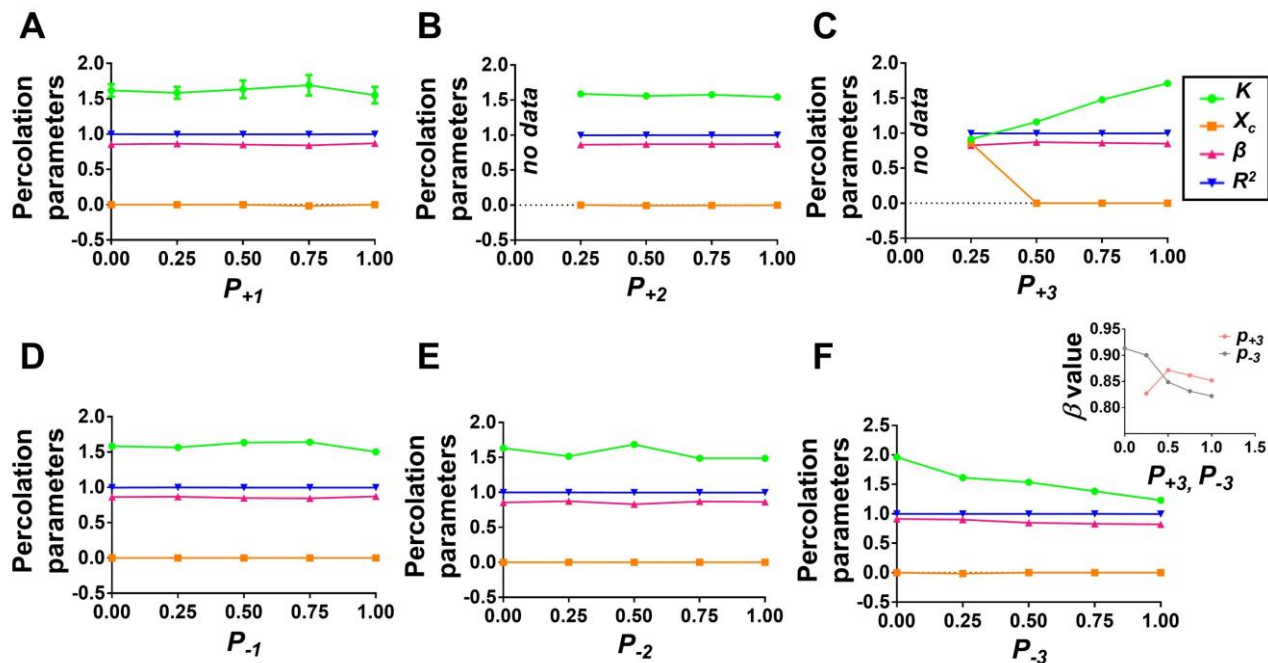


Figure 8. Influence of the simulation parameters on the percolation coefficients. A-F. The plots show how variations in the simulation parameters P_{+1} (A), P_{+2} (B), P_{+3} (C), P_{-1} (D), P_{-2} (E), and P_{-3} (F) affect the percolation coefficients K , t_c , β , and R^2 obtained after fitting [LuxR-AHL]₂ vs. time plots to percolation. Inset in panel F shows the effect of p_{+3} and p_{-3} variation on the β coefficient in detail. X-axes: values of simulation parameters; Y-axes: values of percolation coefficients. Curves are color-coded to the individual coefficients as indicated in color key. Data represent average values obtained from percolation fits of ten independent agent-normalized [LuxR-AHL]₂ vs. time plots. Error bars represent standard deviations.

Figure 9 A shows the fitting of agent-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_2$ vs. time plots obtained at varying AHL densities to the percolation function. The resulting percolation coefficients are plotted in **Figure 9 B**. Again, t_c remained near zero regardless of the signal density (orange curve in **Figure 9 B**). In contrast, the value of K increased linearly with the signal density (green curve in **Figure 9 B**). Interestingly, the β coefficient remains near the universal value even at signal densities beyond K_{Hill} (110.7 ± 2.7 , **Figure 5 D**).

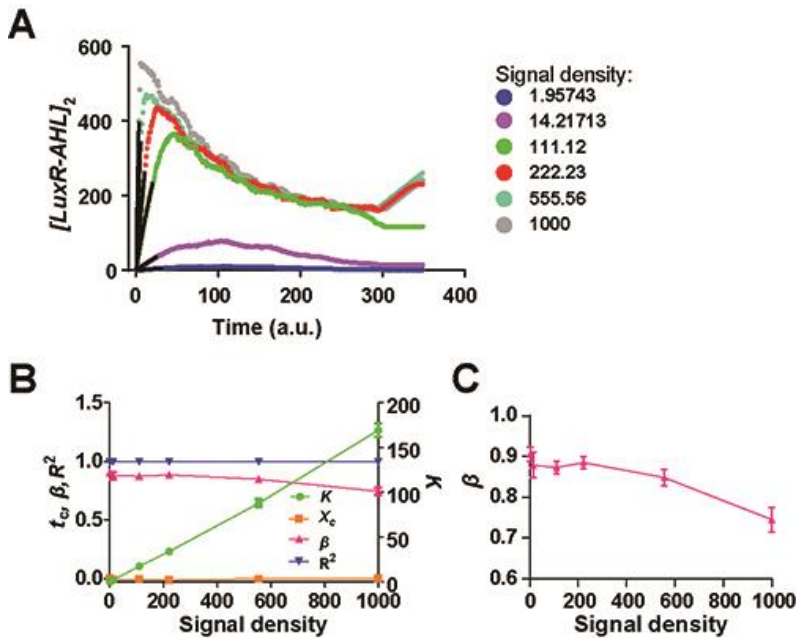


Figure 9. Influence of the AHL density on the percolation coefficients. **A.** Fitting of agent-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_2$ -vs-time plots obtained at different signal densities to the percolation function. Dots, actual simulation values; black lines, percolation fits. X axis, simulation time in a.u.; Y axis, agent-normalized number of simulated $[\text{LuxR-AHL}]_2$ molecules. Curves are color-coded to signal density as indicated in key. Data represent average values from ten independent replicates. Standard deviations not shown for clarity. **B.** Effect of signal density on the coefficients obtained from the percolation fits shown in **A**. X axis, signal density (AHL lattice-cell⁻¹); left Y axis, value of percolation coefficients t_c and β and the fitting coefficient R^2 ; right Y axis, value of percolation coefficient K . Curves are color-coded to the individual coefficients as indicated in color key. Error bars represent standard deviations. **C.** Same as **B** but with expanded Y axis to better show β .

Beyond 222.23, the β coefficient show to decay under a monothonic trend, perhaps indicating a gradual decrease in the dimensionality of the system once it becomes saturated with AHL (magenta curve in **Figure 9 B**). There are several reasons why the dimensionality of a percolating network may deviate from the initial conditions as the concentration of one of the reagents vary, particularly in diffusion-controlled chemical reactions ⁴¹. Besides, it has been recently elucidated how certain biochemical and biophysical processes in microorganisms are subject of dynamic fluctuations which lead to non-equilibrium particle diffusion that deviates from classical models ⁴². On a highly speculative note, we venture to suggest that as the [LuxR-AHL]₂ dimerized receptors act as “traps” for diffusing AHL autoinducers beyond a given point, the percolative pathways available to be explored by the AHL signals in the system decrease, thus effectively, reduce the fractal dimension. This is known for diffusion-controlled reactions on percolation clusters that give rise to unusual kinetics that cannot be explained by classical theories ⁴¹. These hypotheses constitute an important advance over our preliminary interpretation ^{19,32} and should be a starting point for future research efforts.

Notably, our simulations also reproduced the linearity of intracellular AHL accumulation during the initial phase of the simulation (**Table 1, Figure S9**), strongly supporting the idea that intracellular AHL is the “percolation enabling agent” both in our simulations and *in vivo*.

The plots in **Figure 10** show the time-resolved evolution of all the simulated molecules at three different concentrations regimes of AHL, namely below K_{Hill} , $\sim K_{Hill}$, and above K_{Hill} . In all cases, the *in silico* response starts immediately, as the consequence of the AHL-mediated, rapid conversion of the starting LuxR₁ species into [LuxR-AHL]₁ and [LuxR-AHL]₂ (**Figure 10 A, C, E**). **Figure 10 B, D, and F** show the dynamics of the extracellular AHL in the system. Extracellular AHL (orange traces) gets depleted in all cases due its partitioning into LuxR-bound AHL (plotted in **Figure 10 A, C, E**) and a minute amount of

Table 1

A	B	R ²
347.08	1173.58	0.995
364.01	901.16	0.9974
354.63	586.93	0.9985
366.91	1346.8	0.9961
353.17	1263.17	0.9961
369.85	1109.61	0.9975
409.72	900.13	0.9985
407.67	1015.42	0.9983
433.46	425.19	0.9995
469.3	258.41	0.9998

Linearity of intracellular accumulation of virtual AHL.

The table shows the A and B coefficients resulting from the fitting of time-resolved, simulated intracellular AHL levels, to a linear expression ($y = Ax + B$). The R² fitting coefficient is also shown. The table was built with 10 independent simulations performed with the “chosen conditions”. Only the 100 first time units of the simulation were used for the analysis.

intracellular, free AHL (blue traces). This is a situation that was also reported by Engwer³² and would not likely occur *in vivo* due to the large scale differences between the volume occupied by the cells and the total culture volume. This is a clear limitation imposed by the constraints of our simulation algorithm which, in order to handle a manageable number of agents, forced us to artificially approximate the intracellular vs. extracellular volume relationship in our *in silico* work³². Hence, only the early simulated data points are to be trusted for our interpretations. Despite these shortcomings, we are confident that the simulations capture many key aspects of the real system, as shown in this section.

4.4.5. *In silico* modeling of QS inhibition

To model the inhibitory effect of CA *in silico*, we first assumed an antagonistic mode of action in which the antagonist (ant), competed with AHL for its binding site in LuxR, in keeping with previous studies^{32,39}. To model this, we incorporated new parameters in the simulations, namely P_{+a} and P_{-a} to describe the reversible conversion and dissociation of the LuxR₁ species into [LuxR-ant]₁ complexes, respectively (**Figure 11 A**). When we simulated the presence of an antagonist, we failed to achieve agent-normalized [LuxR-AHL]₂-vs-time plots that recreated the CA effect *in vivo* (cf. **Figure 4 A** to **Figure**

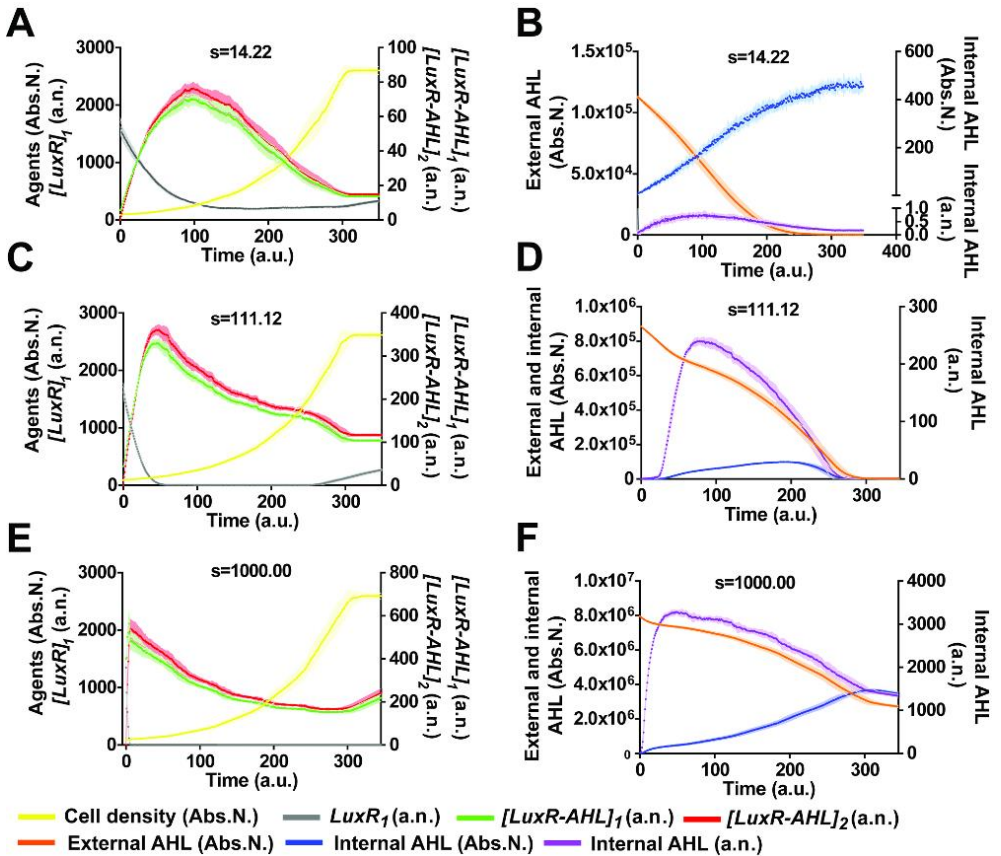
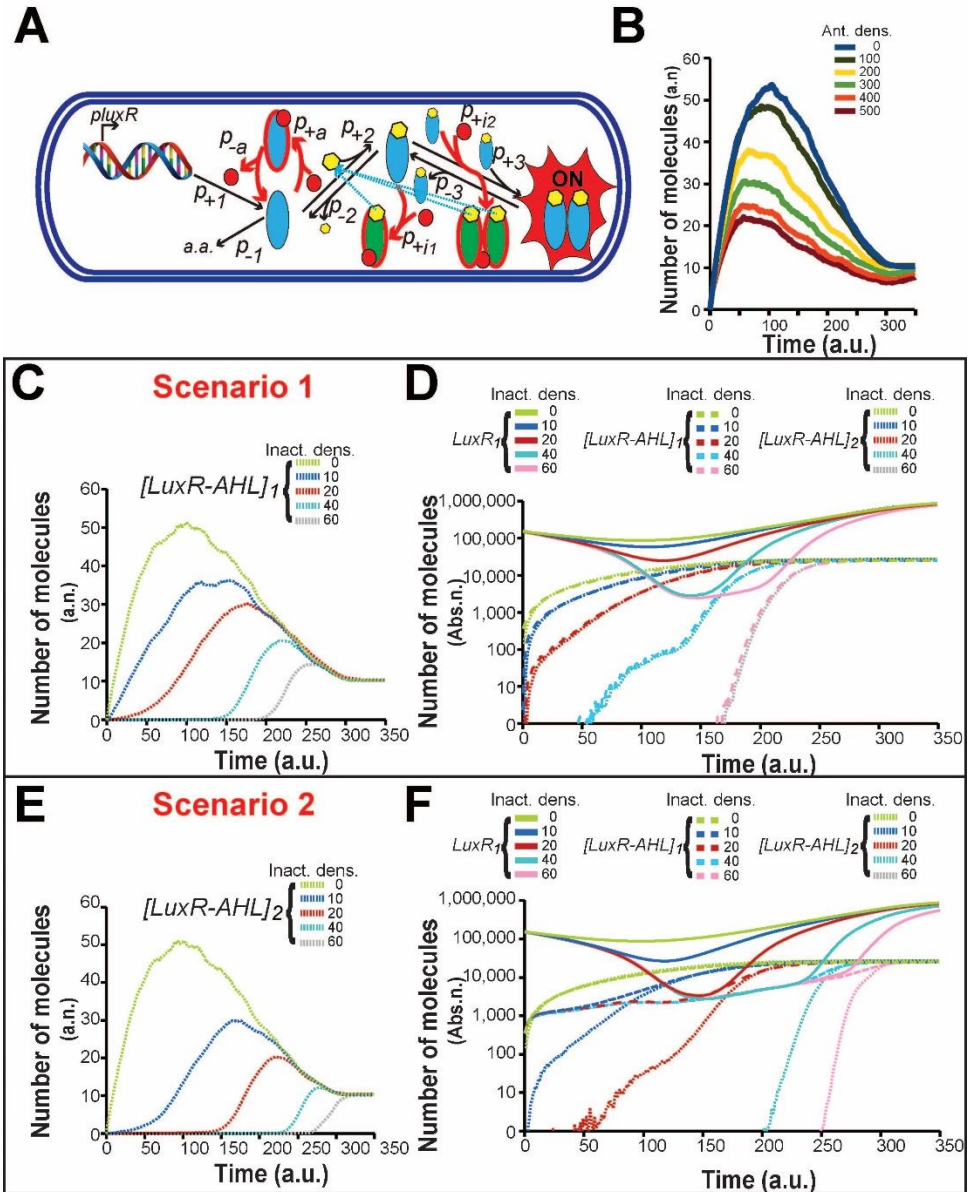


Figure 10. Time-resolved evolution of all simulated molecules. A-F. Time resolved, agent-normalized number of molecules of the three LuxR species $LuxR_1$, $[LuxR-AHL]_1$, and $[LuxR-AHL]_2$ (A, C and E) and AHL (B, D and F) at the following signal densities: 14.22, below K_{Hill} (A and B); 111.12, $\sim K_{Hill}$ (C and D); and 1000, above K_{Hill} (E and F). Curves are color coded as indicated in key. Simulated growth curves (yellow traces) are embedded in A, C and E for clarity. X axis, simulation time in a.u.; Y axes, absolute (Abs.N.) and/or agent-normalized (a.n.) number of molecules. Y axes labels explicitly reference their associated molecules. The mean of 10 simulations is represented by solid lines and the data range is indicated by the light shadowed area.

11 B). These results were in agreement with those obtained by C. Engwer in his thesis with similar simulation settings³². Notice in the simulation traces that increasing doses of antagonist resulted in curves

Figure 11. *In silico* modeling the inhibition of biosensor activity

Legend Figure 11: *In silico* modeling the inhibition of biosensor activity. **A.** Scheme of inhibition as implemented in our simulations. Inhibitor molecules are shown as red circles. In the antagonist pathway, the inhibitor is captured and released by the $LuxR_1$ species with probabilities P_{+a} and P_{-a} . Antagonist-bound LuxR is shown as a red/blue oval. In the inactivator pathways either the $[LuxR-AHL]_1$ or the $[LuxR-AHL]_2$ species becomes irreversibly inactivated as $inact-[LuxR-AHL]_1$ or $inact-[LuxR-AHL]_2$ complexes with probabilities P_{+i1} or P_{+i2} . Black arrows denote the regular branches of the LuxR pathway, whereas red arrows denote the inhibitory branches of the LuxR pathway. Dotted cyan arrows indicate the release of trapped AHLs back to the free AHL intracellular pool. See **Figure 5 A** for additional information. **B.** $[LuxR-AHL]_2$ -vs-time plots in the presence of antagonist. X-axis, simulation time in a.u.; Y axis, number of $[LuxR-AHL]_2$ dimers. **C and D.** Simulation of inactivation at the level of $[LuxR-AHL]_1$ (scenario 1). **C.** $[LuxR-AHL]_2$ -vs-time plots in the presence of $inact-[LuxR-AHL]_1$. X axis, simulation time in a.u.; Y axis, agent-normalized number of molecules of $[LuxR-AHL]_2$. **D** $[LuxR]_{all-species}$ -vs-time plots in the presence of $inact-[LuxR-AHL]_1$. X axis, simulation time in a.u.; Y axis, absolute number of molecules of all three LuxR species. Y axis shown in logarithmic scale. $LuxR_1$ solid lines, $[LuxR-AHL]_1$ dashed lines, $[LuxR-AHL]_2$ dotted lines. **E and F.** Simulation of inactivation at the level of $[LuxR-AHL]_2$ (scenario 2). **E.** As **C** but in the presence of $inact-[LuxR-AHL]_2$. **F.** As **D** but in the presence of $inact-[LuxR-AHL]_2$. In all plots (**B-F**), curves are color coded to the antagonist or inactivator densities indicated in color keys. Traces correspond to the average of ten independent simulations. Standard deviations not shown for clarity.

with an even smaller number of $[LuxR-AHL]_2$ dimers but with similar t_c s, as judged by the fact that all curves took off at time zero (**Figure 11 B**), at odds with the experimental observations (Figure 4A) that showed a direct linear dependence between t_c and $[CA]$. The effect was similar to that of increasing P_{-3} or decreasing P_{+3} , i.e. a net reduction in the number of the $[LuxR-AHL]_2$ species. This discrepancy between the *in vivo* and *in silico* results suggested that CA does not act as an antagonist *sensu stricto*. Next, we attempted to model an inactivator (*inact*) whose binding destroyed LuxR's ability to carry out its function but not its AHL binding activity. To model this, we created P parameters P_{+i1} and P_{+i2} that would govern the irreversible conversion of either the $[LuxR-AHL]_1$ species into $[LuxR-AHL-inact]_1$ complexes or the $[LuxR-AHL]_2$ species into $[LuxR-AHL-inact]_2$ complexes, respectively (**Figure 11 A**). Both types of inactivator-bound complexes will not count in terms of the measured response of the virtual cell, i.e. number of $[LuxR-AHL]_2$. The clear displacement of the FI/OD₆₀₀-vs-time curves towards longer incubation times observed *in vivo* in the presence of CA, resembled a situation in which AHL induction was simply

delayed, relative to the control (**Figure 4 A**). Assuming a simple antagonistic mode of inhibition in our simulations did not produce the pattern observed *in vivo* (**Figure 11 B**). For this reason, we tested the possibility that the inhibitor acted by inactivation. A simplistic inactivator resulting in the disappearance of LuxR molecules from the system also failed to lead to the typical delay pattern observed *in vivo*, as previously shown³². This led us to contemplate a more complicated scenario in which the signal itself might be transiently sequestered into irreversibly inactivated complexes under the influence of CA, so that a wave of signal release would occur upon degradation of all the inactivated LuxR molecules. We implemented this concept at the level of [LuxR-AHL]₁, leading to inact-[LuxR-AHL]₁ (*scenario 1*) and at the level of [LuxR-AHL]₂, leading to inact-[LuxR-AHL]₂ (*scenario 2*) (**Figure 11 A**). In both cases, AHLs are returned to the system after their release from the inactivated LuxR molecules. **Figure 11 C** and **E** show that in both cases, the simulations resulted in [LuxR-AHL]₂-vs-time plots highly reminiscent of the inhibition curves observed *in vivo* for the fluorescent response upon addition of CA (**Figure 4 A**). While the simulated curves displayed a somewhat conspicuous sigmoidal character, it became clear that the response delay is highly consistent with the results observed *in vivo* (cf. **Figure 11 C** and **E** to **Figure 4 A**). These results constitute a substantial improvement over previous attempts at understanding the inactivation mechanism displayed by CA^{19,32}. While the [LuxR-AHL]₂ vs. time plots obtained in *scenario 1* and *2* looked very similar, differences were apparent when the fate of all LuxR species was plotted over time as in **Figure 11 D** and **F**. First, the time of appearance of the [LuxR-AHL]₂ species, relative to inactivator concentration, suffered longer delays in *scenario 2*. Second, in *scenario 1* the accumulation of the [LuxR-AHL]₁ and [LuxR-AHL]₂ followed the same kinetics, whereas in *scenario 2* only [LuxR-AHL]₂ accumulation was delayed (cf. **Figure 11 D** to **F**). A clear difference is obvious at the level of the [LuxR-AHL]₂ species, whose formation in *scenario 1* is delayed as the inactivator concentration increases, so that formation of [LuxR-AHL]₁ and [LuxR-AHL]₂ is almost simultaneous (cf. **Figure 11 D** to **F**). **Figures S10** and **S11** shows some interesting aspects of the simulations. First, we noticed that the [LuxR-AHL]₂ and the inactivator

curves always intersect at the same point on the Y axis (discontinuous line in **Figures S10** and **S11**), which corresponds to a number of dimers that amount to $\sim \frac{1}{2}$ of the final dimer levels. We also noticed that, in the absence of inactivator, the level of free-intracellular AHL is very low. However, in the presence of inactivator, intracellular AHL reaches much higher levels, as the signal is released from inactivated LuxR species. The black arrows in **Figures S10** and **S11** indicate the initial burst of intracellular AHL in the presence of inactivator. The increase in the levels of intracellular AHL produces a decrease in the levels of LuxR₁, compared to the inactivator-less situation (see **Figures S10** and **S11**). Green arrows in **Figures S10** and **S11** indicate the minima in the LuxR₁ curves. First, we noticed that the [LuxR-AHL]₂ and the inactivator curves always intersect at the same point on the Y axis (discontinuous line in **Figures S10** and **S11**), which corresponds to a number of dimers that amount to $\sim \frac{1}{2}$ of the final dimer levels. We also noticed that, in the absence of inactivator, the level of free-intracellular AHL is very low. However, in the presence of inactivator free-intracellular AHL reaches much higher levels, as the signal is released from inactivated LuxR species. The black arrows in **Figures S10** and **S11** indicate the initial burst of intracellular AHL in the presence of inactivator. The increase in the levels of intracellular AHL produces a decrease in the levels of LuxR₁, compared to the inactivator-less situation (see **Figures S10** and **S11**). Green arrows in **Figures S10** and **S11** indicate the minima in the LuxR₁ curves. These high levels of free-intracellular AHL promote a burst of [LuxR-AHL]₂ formation upon inactivator depletion. Interestingly, we found a relationship between the maximum of free-intracellular AHL and the rate of inactivator depletion. The rate of inactivator depletion over time was calculated as the discrete difference between the inhibitor levels at a given time point and the levels at the following time point. **Figure 12**, clearly shows that the maximum of free-intracellular AHL coincides with the maximum rate of inactivator depletion, both under *scenarios 1* and *2*.

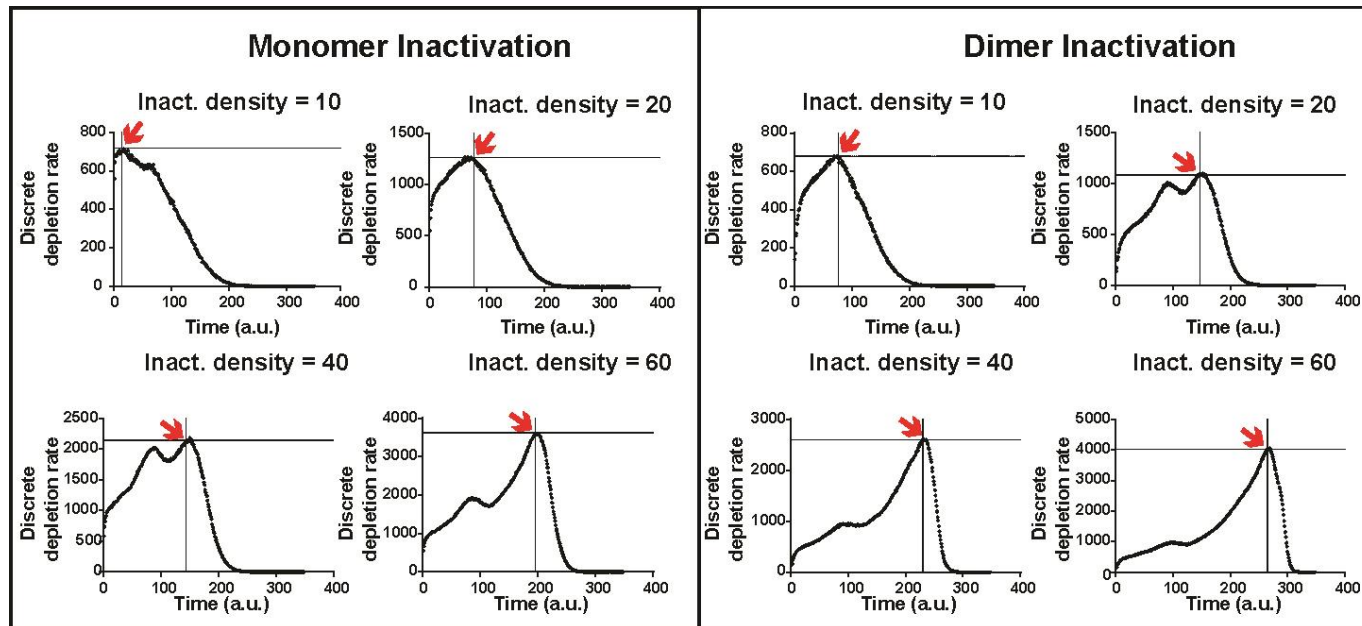


Figure 12. Rate of inactivator depletion predicted by the simulations. A-D. Discrete depletion rate over time under *scenario 1* (monomer inactivation) at the indicated inactivator densities, 10, 20, 40, and 60. E-H. Discrete depletion rate over time under *scenario 2* (dimer inactivation) at the indicated inactivator densities, 10, 20, 40, and 60. Red arrows indicate the point of the discrete-depletion-rate curve corresponding to the time when the maximum free intracellular AHL level is reached. Vertical and horizontal crossing lines, intersecting at this point are also provided for clarity.

4.5. DISCUSSION

In a pre-print in the *Biorxiv* repository¹⁹, we showed, for the first time, that PT can be used to describe the QS “listening” component conveniently. In fact, our work was the first to ever mention PT in the context of QS¹⁹. Kindler et al. recently modeled QS autoinduction feedback loops in biofilm-forming colonies, obtaining percolation-like bursts of autoinducer⁴³. In contrast to Kindler et al., here we showed that LuxR dimer formation also occurs in percolation-like bursts, indicating that the whole QS response is driven by percolation kinetics. Specifically, we have shown that the initial part of the FI/OD₆₀₀ response curve displayed by an AHL-sensing biosensor after induction with AHL can be approximated by the percolation scaling law function (Eq. 2), in agreement with a geometrical foundation of the percolation network⁴¹. An alternative, conductivity-based foundation to approximate the AHL-induced QS response by percolation has been recently proposed by Engwer³². While both approximations can be used to fit the data, here, we adhere to the classical geometrical foundation for the following reasons. First, geometrical principles determining critical transitions have been described for hundreds of biological networks^{44,45}. These principles, which include nodular and clustering descriptors and lattice-based networks, have allowed the investigation of structure-function relationships in biological systems, such as metabolic networks or subcellular interaction networks (*e.g.*, protein-protein, aminoacid-aminoacid, gene-protein, and gene regulation)⁴⁵. Second, a percolative model in which critical transitions are based on the relative levels of LuxR species (LuxR₁, [LuxR-AHL]₁, and [LuxR-AHL]₂), as we propose in this Chapter, could in principle be also explained in terms of a geometrical topology of active nodes and occupancy thresholds. Third, the linear, time dependent accumulation of our percolation enabling agent (intracellular AHL), resembles the dynamics of cluster formation in other percolation systems²⁰, thus allowing us to express the percolation scaling law function in terms of t_c rather than p_c .

The calculated biosensor t_c values show that the system percolates immediately or very shortly after AHL induction and the value of the β exponent assumes values that lie closely to a conserved universal value

of 0.83, corresponding with a 5-dimensional percolating system (**Figure 1**). Interestingly, β and t_c values remained essentially independent of the AHL concentration (**Figure 1 C and D**). To fit the FI/OD_{600} curves to the percolation scaling law function we assumed linearity between the “percolation enabling agent”, p (Eq. 1), and time, t^{20} , thus, allowing us to estimate the threshold percolation time, t_c . This assumption forced the “percolation enabling agent” to accumulate linearly with time in the *in vivo* system up to a threshold at which percolation ensues²⁰.

We next set out to understand how a biological system composed of individual, physically non-connected cells can provide an output signal that is consistent with percolation network theory. Microscopy imaging of individual biosensor cells showed that the percolation-like response of our QS biosensor was the result of the almost synchronous activation of the whole cell population (**Figure 3, Figure S3 and Figure S4**). This near synchronicity is likely the consequence of the high levels of LuxR present in these cells before activation with AHL. Indeed, our discrete-step simulations led to the conclusion that biosensor cells overexpress LuxR, reaching an extremely high intracellular concentration of the protein (see Materials and Methods). We hypothesized that, as a result of such high levels of LuxR, biosensor cells act as “AHL traps” and effectively sweep AHL out of the medium and into complexes with LuxR. The “AHL trap” hypothesis led to the crucial idea that AHL accumulated linearly in the biosensor population (**Figure 2**), thus, connecting the intracellular levels of AHL to the concept of the “percolation enabling agent”.

To further explore the microscopic events defining the percolation-like nature of the biosensor’s fluorescent output, we arrived at a specific set of P parameters, namely “*chosen conditions*” (**Table S3, Figure 5**) which allowed us to recapitulate several aspects of the *in vivo* response, such as its synchronous nature (**Figure 6**), its Hill behavior (**Figure 5 D**), and its five-dimensional percolative character (**Figures 7 and 8**). In addition, our agent-based simulations unmistakably recreated *in silico* the linearity of intracellular AHL accumulation predicted for the *in vivo* system (**Figure 2, Table 1**). Since this linearity was not explicitly implied in the simulation algorithm, it provided strong support to our

mathematical assumption of a linear relationship between time (t) and the accumulation of the “percolation enabling agent” (p) (Eq. 1 and 2). As a result, our claim that AHL-driven GFP accumulation in the biosensor *in vivo* can be explained as a five-dimensional percolation system, as initially suggested by the *in vivo* data. According to our *in silico* simulations, we believe that the five dimensions would be constituted by the number of bacteria, b ; the intracellular signal concentration, s ; and the three possible LuxR species, namely $LuxR_1$ and bound $[LuxR-AHL]_1$, and $[LuxR-AHL]_2$ (r_0 , r_1 , and r_2 respectively). By doing this, Eq. 2 becomes:

$$P_{\infty}(r_{0,1,2}, b, s) = K * (t - t_c)^{\beta} \quad (3)$$

This is in agreement with the fact that percolation fitting of the kinetics of $[LuxR-AHL]_1$ -vs-time plots led to smaller β coefficients, as if the dimensionality had effectively decreased (**Figure S8**). This observation needs to be analyzed further due to the existence of artefactual t_c s associated to these plots (**Figure S8**). The same was observed when the signal concentration approximated saturation levels (**Figure 9 C**). Notably, the virtual response (at the level of $[LuxR-AHL]_2$) and the values of the percolation parameters t_c and β were highly refractory to changes in the simulation P parameters and the AHL concentration (**Figures 8 and 9**), thus indicating that the simple design we chose for modeling the behavior of all the agents interacting in our simulations gave rise to percolative behavior under a wide range of combinations of the starting microscopic rules. These results led to a much more robust description of the microscopic rules defining the virtual response than previously reported^{19,32}. Extrapolating to the *in vivo* situation, these observations suggest that LuxR-based systems are quite refractory to perturbation, thus ensuring that robust QS responses can be maintained under a wide range of AHL concentrations. Taking into account that the local AHL concentration sensed by cells carrying the LuxR-LuxI system of QS will be highly variable⁴⁶, a robust LuxR response will ensure that most the cells in the population will respond to the signal.

We have also gathered unequivocal experimental and *in silico* evidence that in the presence of sublethal levels of the QS inhibitor CA, the QS response of the biosensor was clearly delayed (**Figure 4 A**). While a decrease in the magnitude of the QS response in the presence of CA had been reported for AHL-based QS systems similar to the one used here³⁹, the delayed response detected in our experiments was unknown. Fitting the CA-induced FI/OD₆₀₀ curves to percolation resulted in increased t_c s and invariant β exponents which, again, remained close to the universal value for a dimensionality of $d=5$ (**Figure 4 C and D**). This suggests that at least the initial part of the delayed response was similar in kind to that of its uninhibited counterpart. Our agent-based simulations helped us to make sense of this observations by providing an explanation for the mode of action of CA. Initial attempts in which we modeled CA as an antagonist, failed to yield responses resembling the effect of CA observed *in vivo* (**Figure 11 B**)³². A central finding in this Chapter was the *in silico* recreation of the CA-dependent increase of t_c observed *in vivo*. This required the incorporation of a transient AHL-sequestration step to the simulations, by the formation of inactive $\text{inact-[LuxR-AHL]}_1$ or $\text{inact-[LuxR-AHL]}_2$ complexes, followed by AHL release after complex degradation. It has been proposed that CA inhibition of an *E. coli* AHL-based biosensor similar to ours could occur by competitive interaction between CA and AHL³⁹. However, the experimental setup used by these authors cannot discriminate between the existence of competitive inhibition and inactivation of LuxR-AHL complexes followed by AHL release, as proposed here.

Ayrapetyan et al.⁴⁷ have reported that CA is able to delay the AI-2-induced, QS-mediated resuscitation capacity of viable but non-culturable vibrios. This is in agreement with the observed CA-induced inhibition of AI-2-induced bioluminescence in *V. harveyi* and the decreased survival of certain AI-2-responding *Vibrio* species upon starvation^{39,40}. The effect of CA in these studies was tentatively assigned to a decreased ability of *V. harveyi* LuxR to bind DNA⁴⁰. Despite some similarities between these reports and our results, it must be noted that AI-2-based QS occurs through a QS route that differs widely from the AHL-LuxR-based circuitry of our biosensor and involves a LuxR master regulator with little homology to its *A. fischeri*

counterpart⁴⁸. For all these reasons, the relevance of the observations performed in AI-2-based systems to our results is, at best, vague.

In light of our simulation results with an *in silico* model of CA-induced, LuxR-inactivation with AHL release, we interpret the *in vivo* results as follows. We propose that *in vivo*, LuxR-AHL complexes might be covalently inactivated by CA either at the monomeric or dimeric stage, (i.e. inact-[LuxR-AHL]₁ or inact-[LuxR-AHL]₂, respectively). Given the large abundance of LuxR in the cell, all CA would be consumed at the beginning of the incubation time. The duration of this phase would depend on the initial CA concentration. Following degradation of the inactive complexes, a wave of AHL release would ensue, thus giving rise to a delayed response with normal percolation kinetics. Covalently-bound CA would not be released upon LuxR degradation, thus not interfering with AHL binding at this stage.

We presented two possible scenarios for CA inactivation: inactivation at the level of [LuxR-AHL]₁ (*scenario 1*) and inactivation at the level of [LuxR-AHL]₂ (*scenario 2*). [LuxR]_{all-species}-vs-time plots under both scenarios looked very similar. However, clear differences regarding the timing of [LuxR-AHL]₂ accumulation relative to [LuxR-AHL]₁ were obvious, i.e. accumulation of [LuxR-AHL]₁ and [LuxR-AHL]₂ is almost simultaneous in *scenario 1*, whereas a delay exists between the accumulation of the two species under *scenario 2* (cf. **Figure 11 D to F**). These properties of the system could potentially be harnessed to distinguish the two possible scenarios from *in vivo* experiments. In both cases, free intracellular AHL accumulates until the rate of depletion of inactivator molecules reaches its maximum (**Figures S10 and S11**). In our simulations, inactivator depletion occurs by irreversibly binding to LuxR. This could not occur in the actual experiments given the large differences between the volume occupied by the cells and the culture volume, as discussed above for AHL. However, there are alternative avenues for the depletion of free CA in bacterial cultures. CA has two electrophilic reactive sites, an aldehyde group and a conjugated double bond, both of which are capable of reacting with nucleophilic molecules⁴⁹. For these reasons, it is believed that CA can react *in vivo* with proteins and nucleic acids⁴⁹. In particular, the reaction between CA and thiol compounds such as cysteine are well

known^{50,51}. Hence, reaction of CA with cysteines present in the medium as part of the amino acid supplement mixture could effectively account for the depletion of free CA in a similar fashion as modeled in the simulations. Thus, our simulations provide a reasonable hypothetical framework to investigate the inhibitory effect of CA in QS. To the best of our knowledge, this is the first evidence for such mode of QS inhibition by CA.

In conclusion, the work described here demonstrated for the first time that the response of a QS biosensor to external AHL is governed by percolation kinetics. Relative to previous accounts of portions of this work^{19,32}, we have refined our understanding of this behavior both *in vivo* and *in silico*, leading to an improved view of the connection between the data and the percolation law function. Furthermore, our new simulations have aided in the interpretation of the inhibitory effect of CA observed by us *in vivo*. The model of CA inhibition of QS proposed here will certainly guide new rounds of experimental trials aimed to illuminate the search for new-generation antimicrobials.

4.6. SUPPORTING INFORMATION

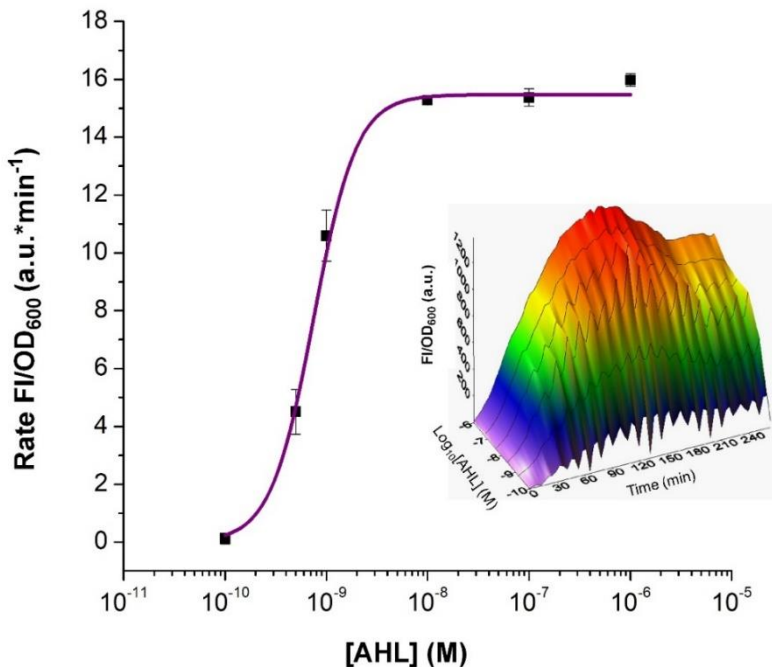
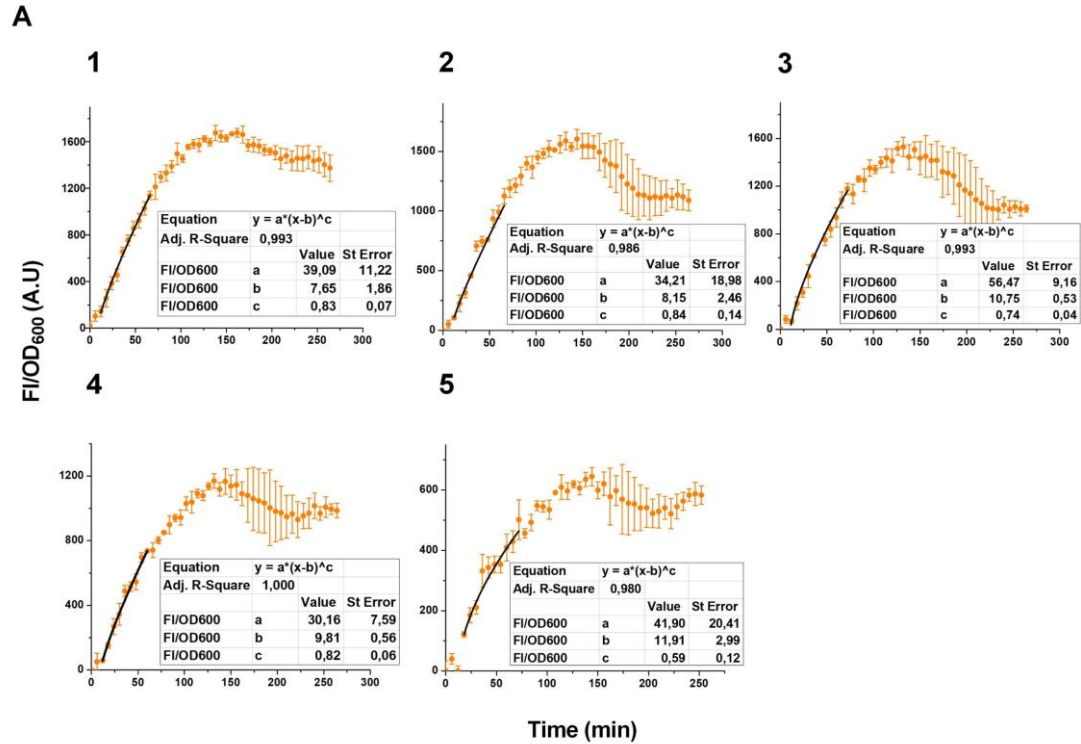


Figure S1. Rate of fluorescence intensity normalized by OD₆₀₀ at various AHL concentrations. The continuous line represents the best fit of the three-parameter Hill function ($y = V_{max} \frac{x^n}{k_{Hill}^n + x^n}$) to the experimental data. The Hill parameter k_{Hill} represents the critical AHL concentration required for the half maximum rate of FI/OD₆₀₀, n is the Hill slope and V_{max} represents the maximum rate of FI/OD₆₀₀, with the following values: $k_{Hill} = 7.48 \times 10^{-10} \pm 9.03 \times 10^{-11}$ M, $n = 2.06 \pm 0.44$, and $V_{max} = 15.47 \pm 0.15$ a.u.* min⁻¹. At AHL concentrations higher than 1×10^{-9} M, the fluorescence response is saturated. The inset shows a 3D plot of FI/OD₆₀₀ against time and AHL concentration. It should be noted that under our experimental conditions, we achieved a 10-fold increase in sensitivity over previously reported values²⁸. Data represent the mean and standard deviation of three independent experiments with three biological replicates each.

Figure S2A. Fitting of the experimental FI/OD₆₀₀ to the percolation function in individual experiments

B

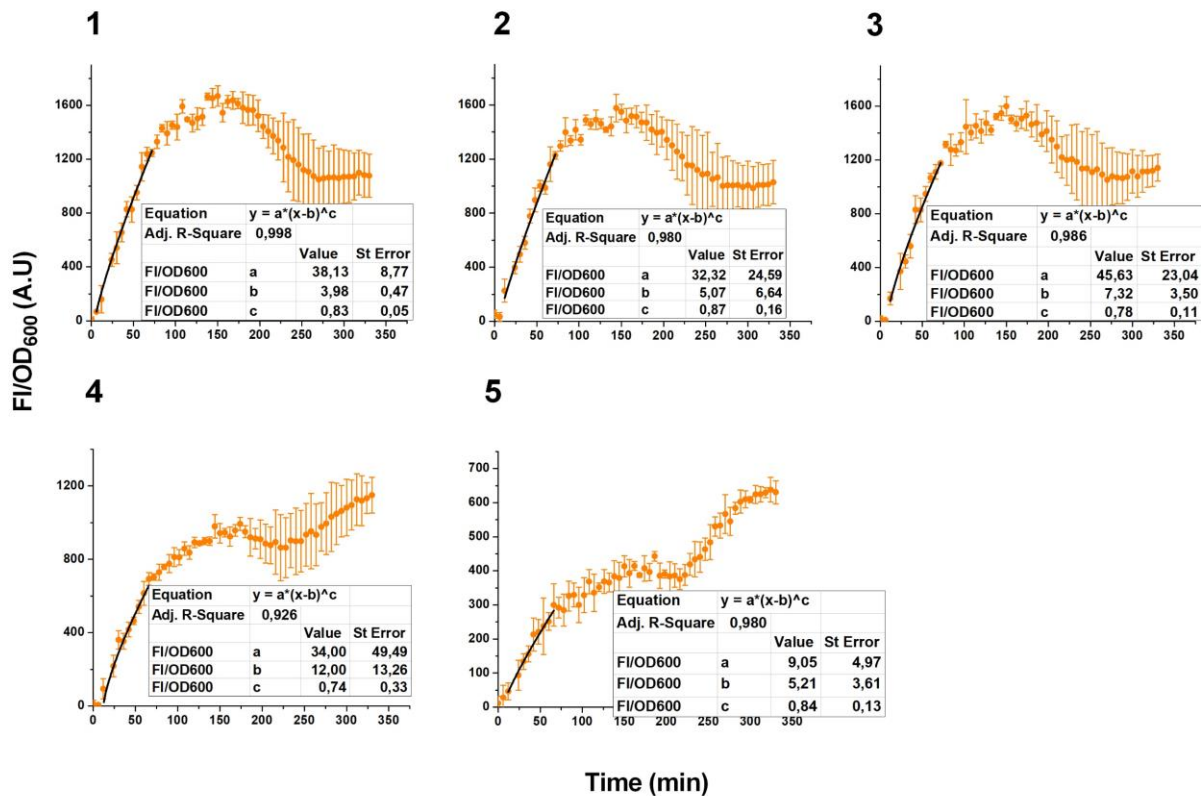
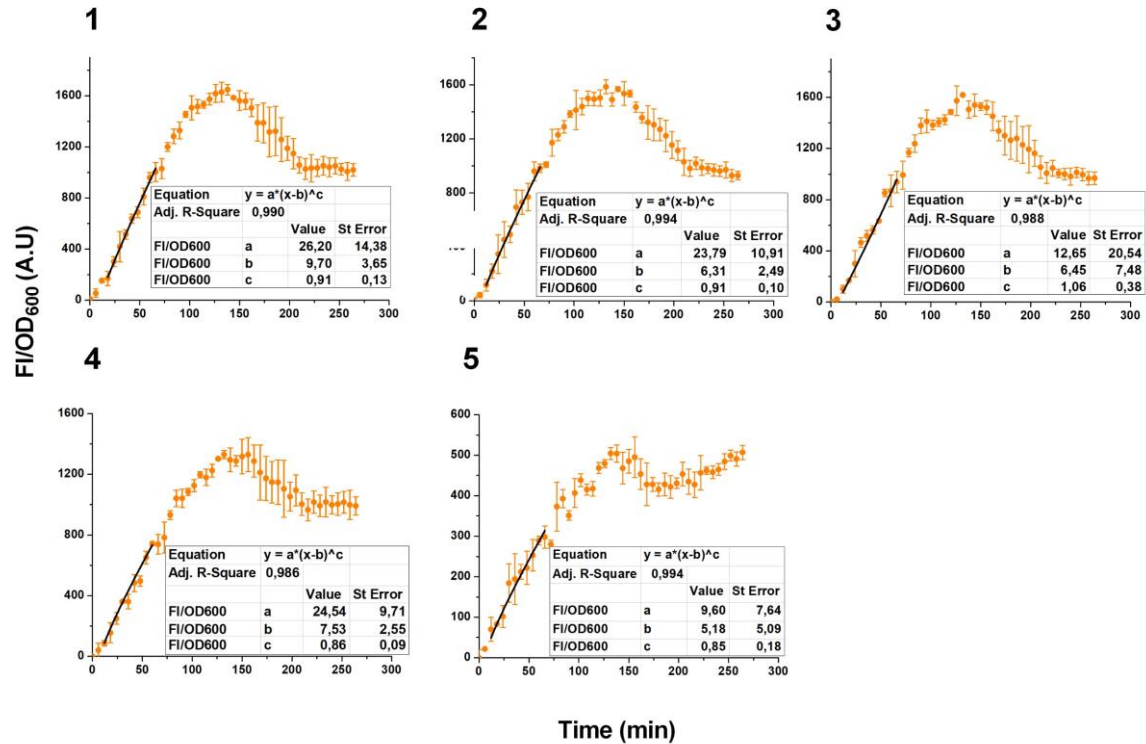


Figure S2B. Fitting of the experimental FI/OD₆₀₀ to the percolation function in individual experiments

C

Figure S2C. Fitting of the experimental FI/OD₆₀₀ to the percolation function in individual experiments

Legend Figure S2: Fitting of the experimental FI/OD₆₀₀ to the percolation function in individual experiments. A-C. FI/OD₆₀₀ as a function of time at five different AHL concentrations: 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , and 5×10^{-10} M. Fit of the density-normalized QS response to the percolation function. The average FI/OD₆₀₀ values (solid circles) observed during the first 100 minutes of incubation at the three different AHL concentrations were fitted to the percolation function (solid lines). Results from three independent experiments, with three biological replicates each, are shown in panels A-C. Solid dots, average of biological replicates; whiskers, standard deviations. Solid lines show the best fit to the percolation function. The results of the fitting are shown in every case.

Table S1. Summary of the percolation coefficients obtained from the fit of FI/OD₆₀₀ to the percolation function $y = K(t-t_c)^\beta$ at various AHL concentrations. Data represent the mean and standard deviation of three independent experiments with three biological replicates each.

[AHL _{fish}] (M)	Percolation parameters			
	K	t_c (min)	β	R^2
1×10^{-6}	34.47 ± 7.18	7.11 ± 2.89	0.85 ± 0.05	0.994 ± 0.004
1×10^{-7}	30.11 ± 5.55	6.51 ± 1.55	0.87 ± 0.04	0.986 ± 0.007
1×10^{-8}	38.25 ± 22.82	8.18 ± 2.27	0.86 ± 0.18	0.989 ± 0.004
1×10^{-9}	29.57 ± 4.76	9.78 ± 2.24	0.81 ± 0.06	0.971 ± 0.039
5×10^{-10}	20.18 ± 18.81	7.43 ± 3.88	0.76 ± 0.15	0.985 ± 0.008

Table S2. Parameters and constants used in the discrete-step simulation.

	Value	Units	Ref.
MW GFP	27.00	kDa	52
MW LuxR	29.00	kDa	53
Rate degradation LuxR protein	0.01	min ⁻¹	29
Copy number of standard plasmid (medium copy number)	40.00	plasmids cell ⁻¹	27
Average copy number of pSB1A3-1	200.00	plasmids cell ⁻¹	54
Standard protein synthesis from a reference promoter (BioBrick part Bba_J23101) carried on a medium-copy-number plasmid	102.20	GFP molecules cell ⁻¹ sec ⁻¹	27
Activity of the <i>tetR</i> promoter (BioBrick part R0040), relative to reference promoter	1.30	Relative promoter units (RPU)	27
Expected yield of <i>tetR</i> promoter	132.86	GFP molecules cell ⁻¹ sec ⁻¹	27
LuxR per biosensor cell per second	664.30	LuxR molecules cell ⁻¹ sec ⁻¹	this work
Estimated steady state number of intracellular LuxR molecules	3.99x10 ⁶	Molecules LuxR fL ⁻¹	this work
Estimated intracellular concentration of LuxR	4.21x10 ⁻³	M	this work
Volume biosensor cell	3.2	μm ³ of fL	24
Growth rate	44.92	min	this work
Number of proteins in <i>E. coli</i>	2.00 - 4.00x10 ⁶	molecules	36
Max. amount overexpressed protein in <i>E. coli</i>	30.00	%	37
Corrected maximum number of intracellular LuxR	94.42x10 ⁵	molecules	this work
Corrected maximum concentration of intracellular LuxR	~1.57x10 ³	M	this work
Corrected number of LuxR molecules at time 0	5.23x10 ¹³	molecules ml ⁻¹	this work
Estimated number of AHL molecules at time 0	4.50x10 ¹¹	molecules ml ⁻¹	this work

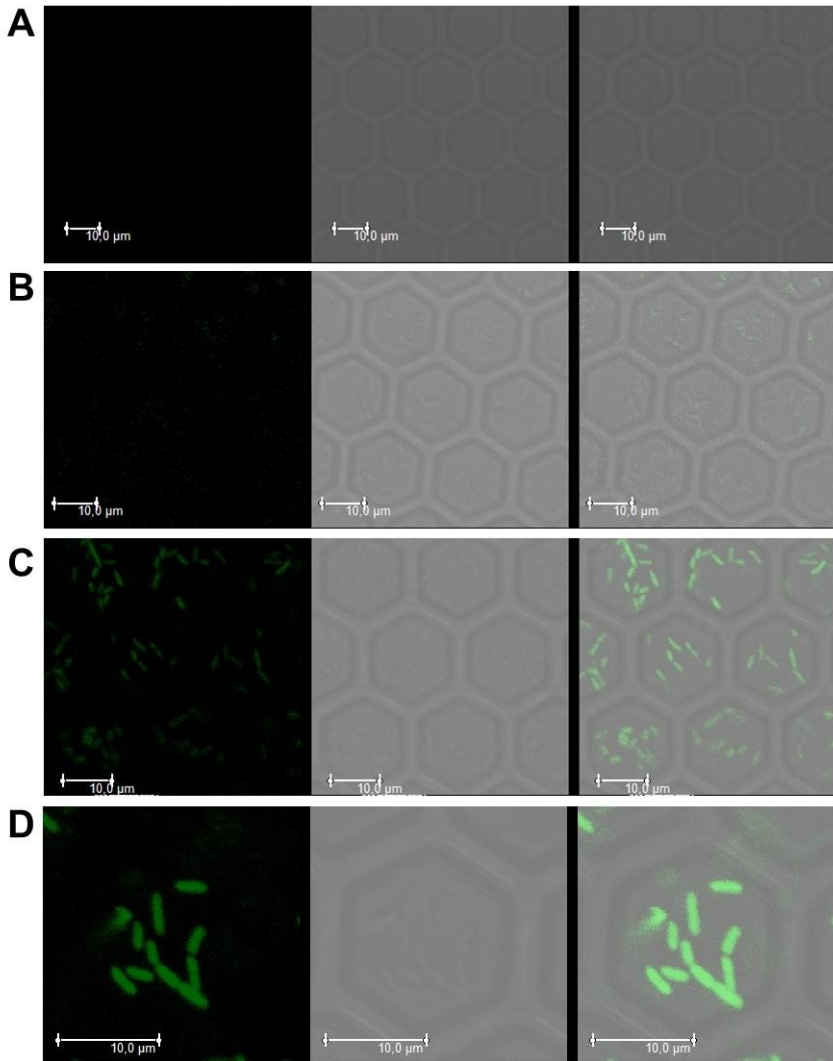


Figure S3. Fluorescence microscopy imaging of the *E. coli* biosensor. End-point fluorescence displayed by individual biosensor cells in the presence of 0 (A), 1×10^{-10} (B), 2.5×10^{-10} (C), and 1×10^{-6} M AHL (D). Left panel: GFP fluorescence; middle panel: bright-field; right panel; overlay. Scale bar: 10 μm.

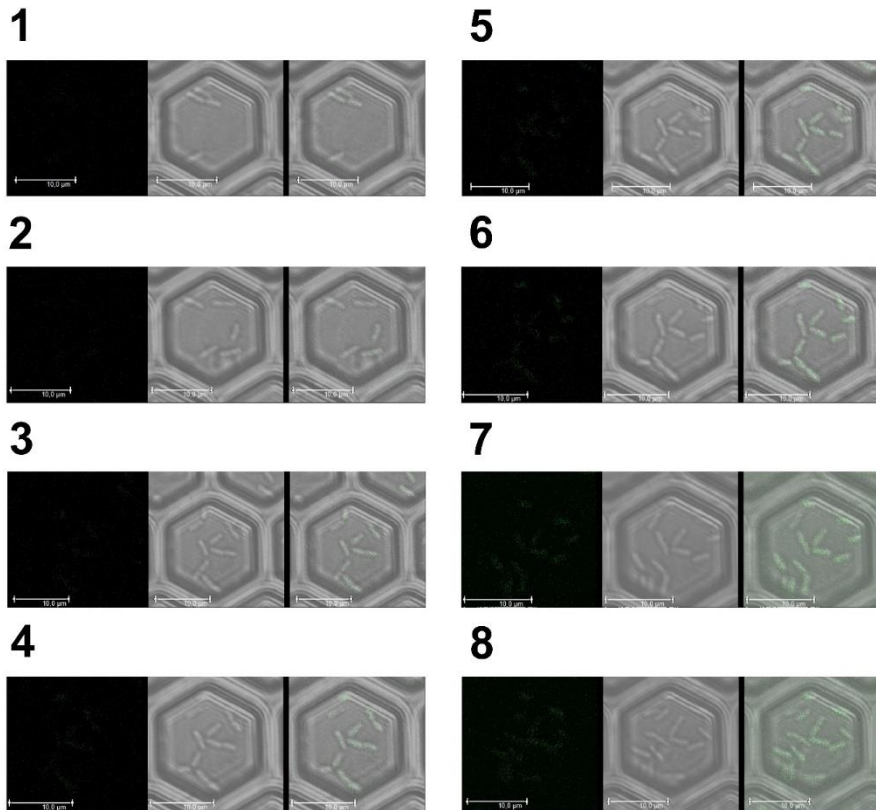


Figure S4. Fluorescence microscopy imaging of the *E. coli* biosensor. Representative time-lapse frames from induced cultures at incubation times spanning from 0 to 90 min (1-8) in the presence of 2.5×10^{-10} M. Left panel: GFP fluorescence; middle panel: bright-field; right panel; overlay. Scale bar: 10 μm.

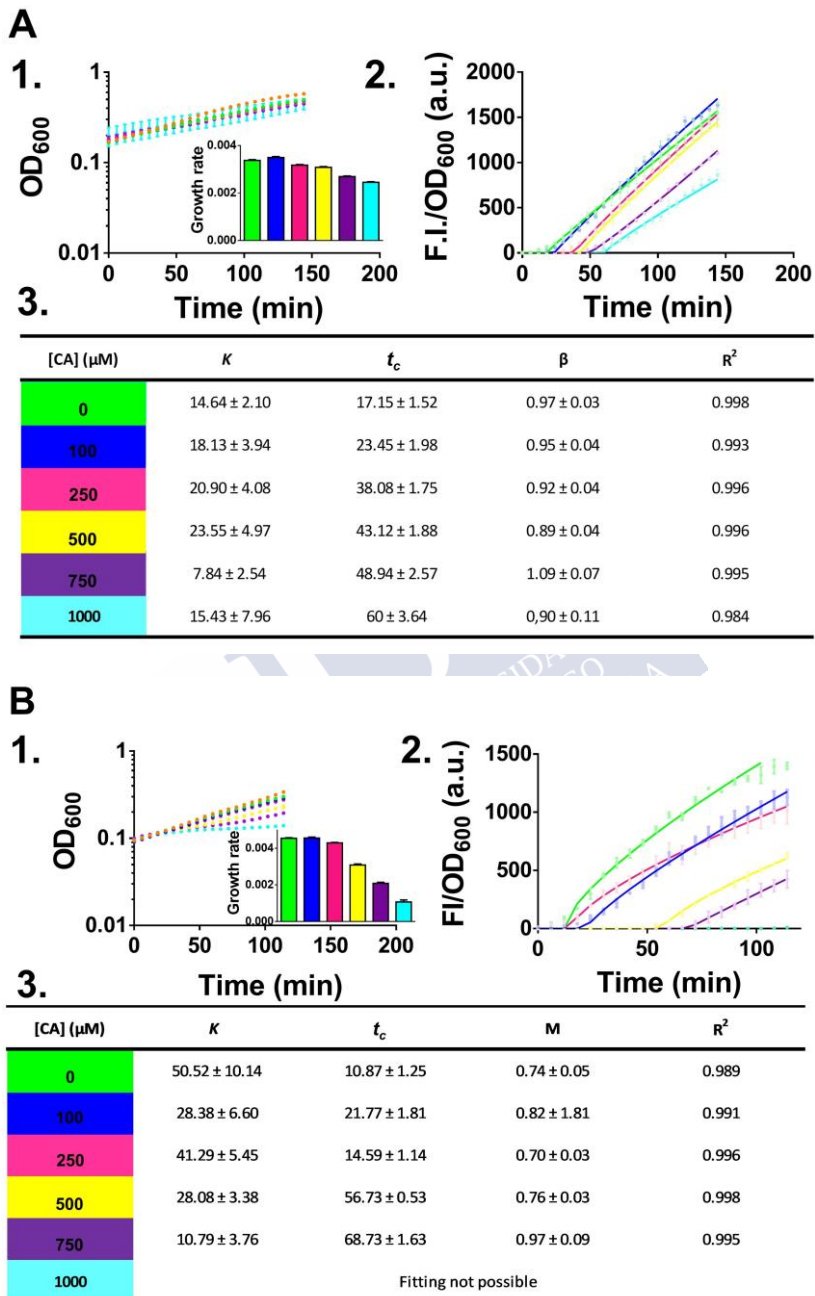


Figure S5 A-B. The percolation critical time is sensitive to QS inhibitors

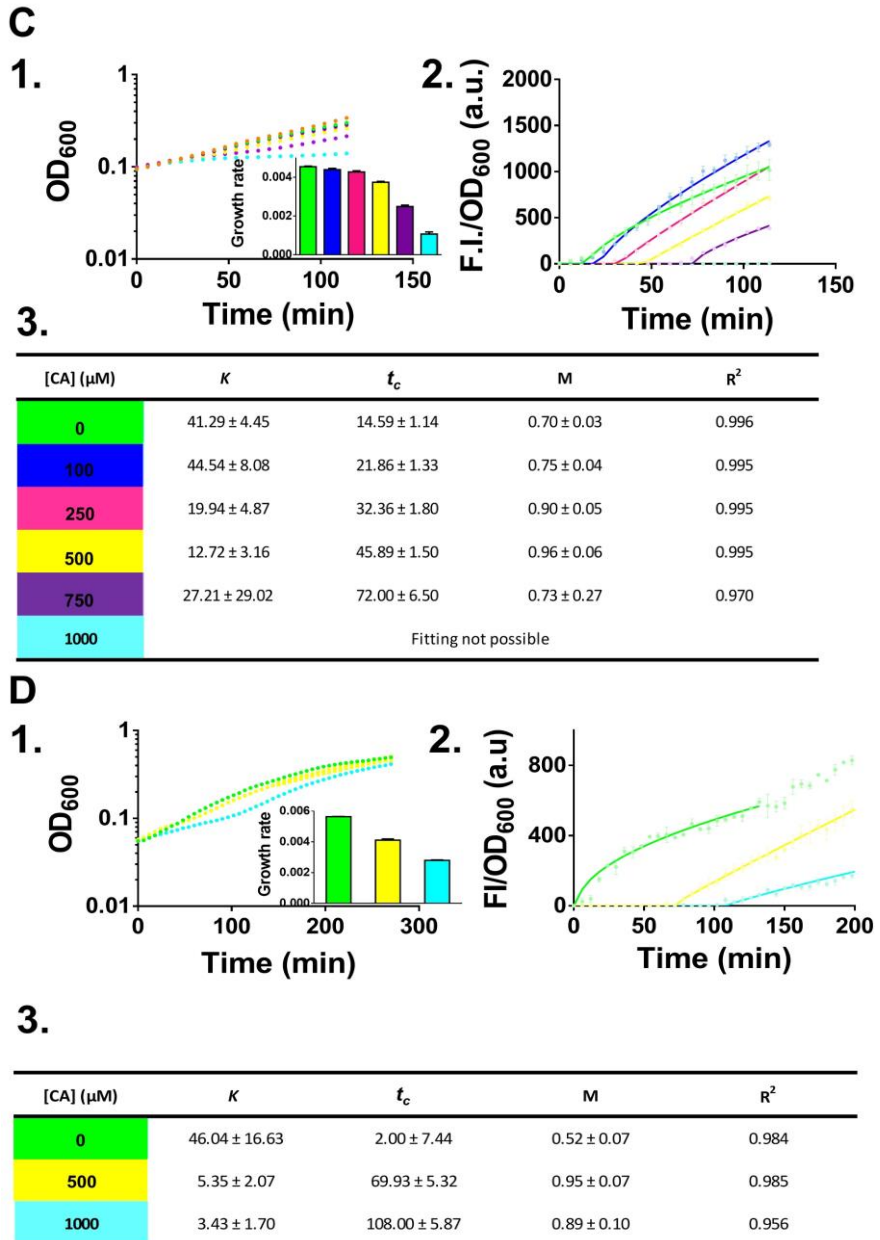
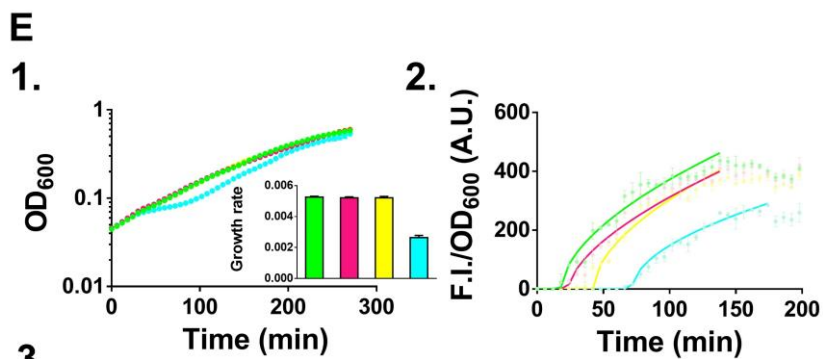
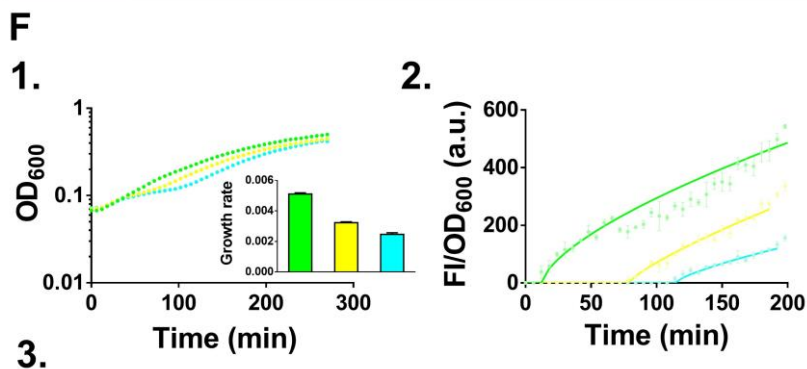


Figure S5 C-D. The percolation critical time is sensitive to QS inhibitors



[CA] (μM)	K	t_c	M	R^2
0	29.85 ± 5.00	17.94 ± 1.00	0.57 ± 0.04	0.955
250	21.86 ± 5.59	23.41 ± 1.24	0.61 ± 0.06	0.965
500	30.62 ± 22.74	42.00 ± 8.36	0.57 ± 0.16	0.906
1000	25.30 ± 5.19	71.57 ± 0.20	0.53 ± 0.05	0.996



[CA] (μM)	K	t_c	M	R^2
0	15.25 ± 3.91	11.99 ± 1.84	0.66 ± 0.05	0.900
250				
500	6.22 ± 2.29	78.59 ± 2.68	0.79 ± 0.08	0.980
1000	4.74 ± 3.98	114.00 ± 8.31	0.74 ± 0.18	0.947

Figure S5 E-F. The percolation critical time is sensitive to QS inhibitors

Legend Figure S5: The percolation critical time is sensitive to QS inhibitors. Experimental data and percolation analysis of CA treatments for six independent experiments, panels A-F. **1.** OD_{600} plots of the *E. coli* biosensor treated with various CA concentrations in the presence of 5×10^{-10} M AHL. The mean (solid dots) and standard deviation (error bars) of three replicates is shown. The insets show the effect of CA concentration on the growth rate. **2.** FI/ OD_{600} plots of the *E. coli* biosensor treated with various concentrations of CA in the presence of 5×10^{-10} M AHL. The mean and standard deviations of three replicates are shown as solid dots and error bars. Solid lines represent the best fit to the percolation function. **3.** Summary table of the percolation parameters. CA was dissolved in absolute ethanol to a concentration of 5×10^{-2} M (panels A-C) or 2×10^{-1} M (panels D-F), and further sub-diluted in water as explained in Materials and Methods.

Table S3. Model parameters used in simulations.

A set of "chosen conditions" were used to create the plots of Figure 5B-E.

Simulation parameters ("chosen conditions"):	
antagonist diffusion: false	P+1: 0.5
antagonist starting density: 0.0	P+2: 0.8
bacterial growth: true	P+3: 0.9
bacterial movement: true	k+a: 0.0
bacterial starting density: 0.01	P-1: 0.01
box size: 20	P-2: 0.1
growth penalty: 0.0	P-3: 0.4
growth rate: 0.013	k-a: 0.1
internalization constant: 0.4	signal diffusion: true
release constant: 0.1	signal production rate: 0.0
repetitions: 10	signal starting density: 10.0
response: true	starting receptors: 2000
response degradation rate: 0.0	time steps: 350
signal degradation rate: 0.0	transcriptional sites: 10

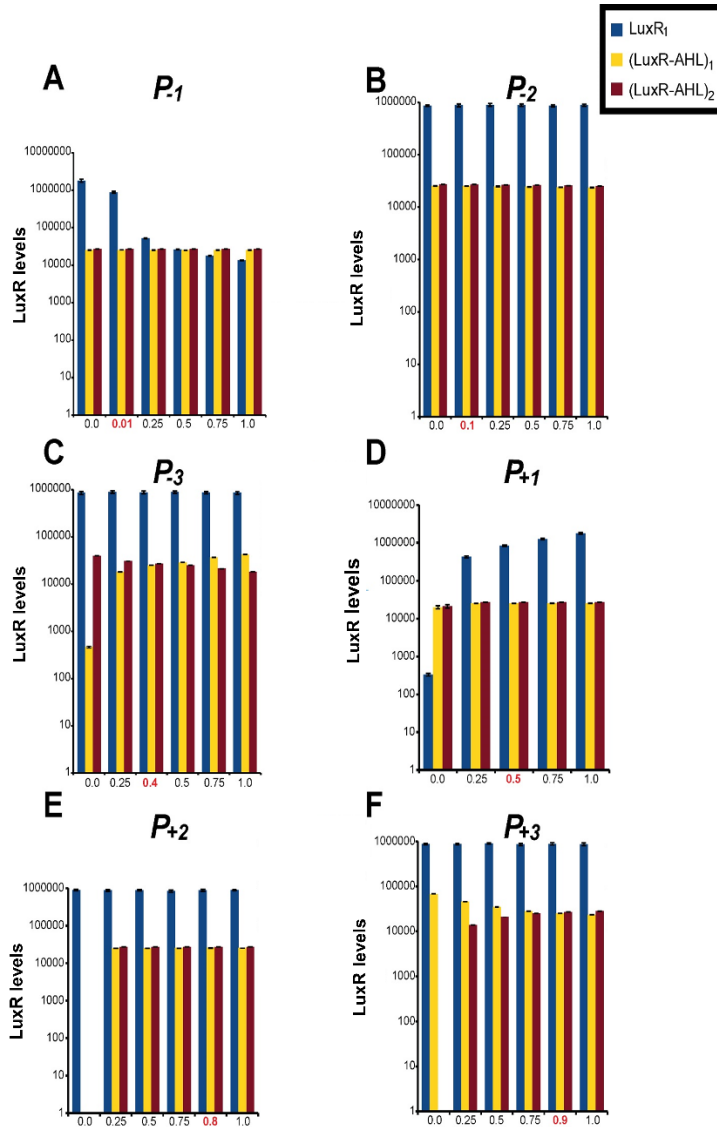


Figure S6. Influence of the simulation's P parameters on the final levels of virtual LuxR species. A. P_1 . B. P_2 . C. P_3 . D. P_{+1} . E. P_{+2} . F. P_{+3} . Each bar corresponds to the average of 10 simulations. Error bars denote standard deviations. The different LuxR species are color coded, blue: LuxR_1 ; yellow: $(\text{LuxR-AHL})_1$; brown: $(\text{LuxR-AHL})_2$. X axis: value of the P parameter; Y axis: amount of LuxR species in log scale. P values corresponding to the "chosen conditions" are highlighted in red.

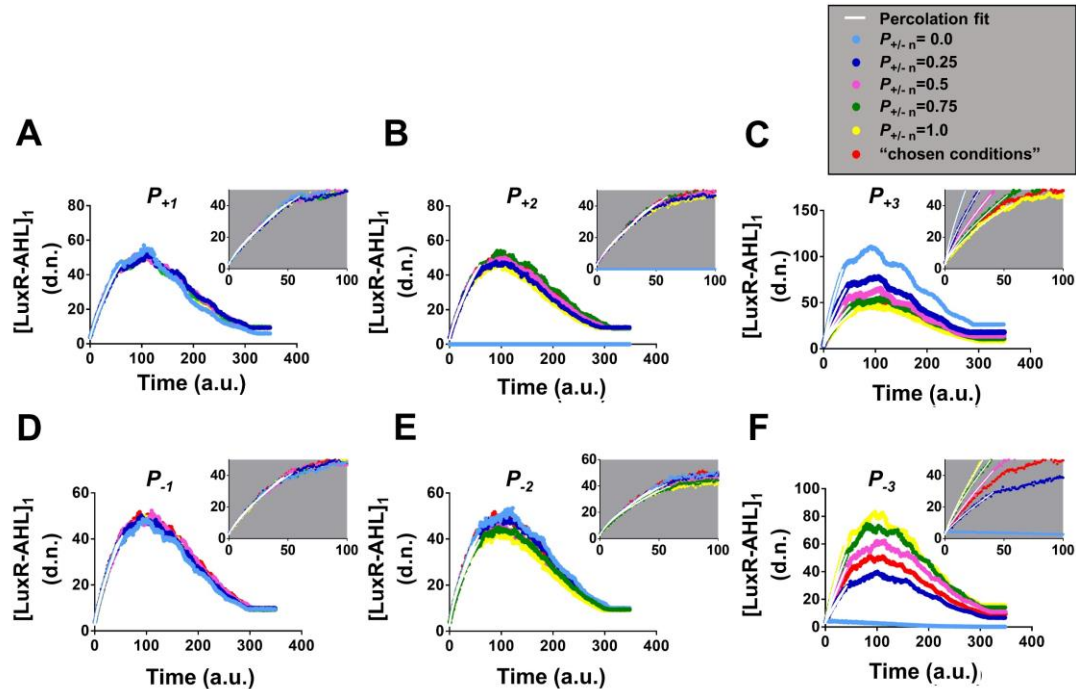


Figure S7. [LuxR-AHL]₁-vs-time plots. A-F. The influence of the simulation P parameters P_{+1} , P_{+2} , P_{+3} , P_{-1} , P_{-2} , and P_{-3} on the levels of the density-normalized [LuxR-AHL]₁ species is shown. In each panel the values of a given P parameter ($P_{+/-n}$) vary as indicated in the legend, while the values of the rest of the P -parameters remain set to the “chosen conditions” values (Table S2). Every trace represents a single, typical simulation trial out of a collection of ten replicates. X axis, simulation time in a.u.; Y axis, number of agent-normalized [LuxR-AHL]₁ monomeric complexes. Curves are color-coded to the value of the selected P parameter as indicated in key. Insets: enlarged views of the [LuxR-AHL]₁-vs-time plots near the origin, showing the fit of the percolation function (white, solid line).

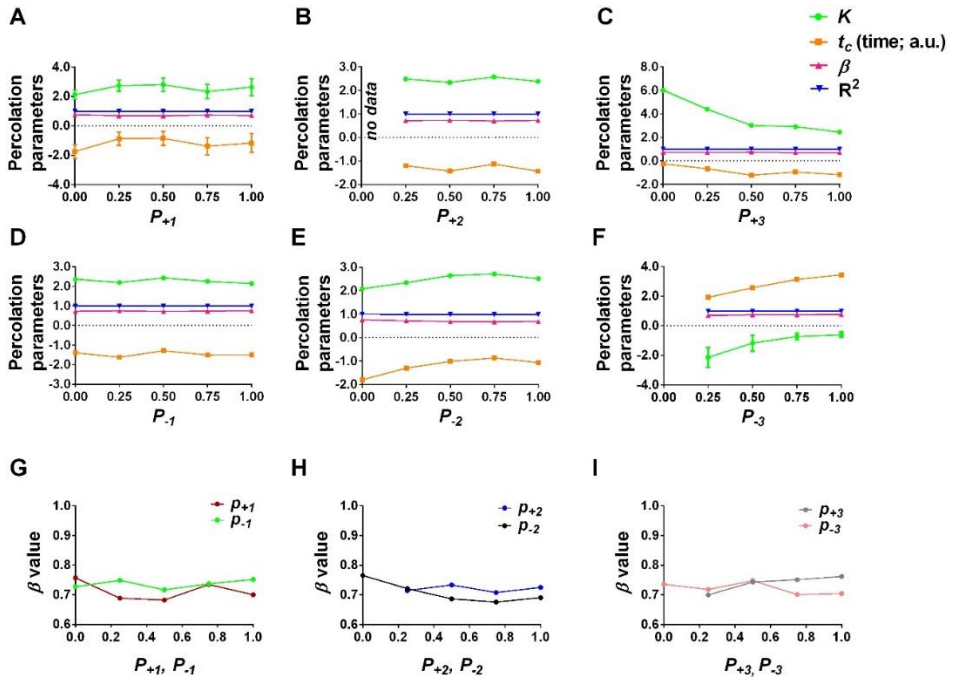


Figure S8. Influence of the simulation parameters on the percolation coefficients. A-F. The plots show how variations in the simulation parameters P_{+1} (A), P_{+2} (B), P_{+3} (C), P_{-1} (D), P_{-2} (E), and P_{-3} (F) affect the percolation coefficients K , t_c , β , and R^2 . Curves are color-coded to the individual coefficients as indicated in color key. G-I. Effect of variation in the simulation parameters P_{+1} , P_{-1} (G), P_{+2} , P_{-2} (H), P_{+3} and P_{-3} (I) on the β coefficients. X-axis: value of changing simulation parameter; Y-axis: values of percolation coefficients. Data represent average values obtained from percolation fits of ten independent agent-normalized $[\text{LuxR-AHL}]_1$ vs. time plots. Error bars represent standard deviations.

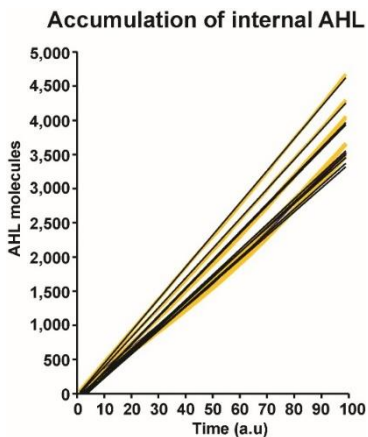


Figure S9. Linearity of intracellular accumulation of AHL in our *in silico* simulations. Accumulation of internal AHL over the initial 100 units of simulation time in ten independent simulations run with the “chosen conditions”. Data, orange traces; linear, fits black lines. X axis, time in a.u.; Y axis

Table S4. Summary of the percolation coefficients obtained from the fit of $[\text{LuxR-AHL}]_2$ vs. time plots to the percolation function $y = K \times (t-t_c)^\beta$ with varying P parameters. Data represent the mean and standard deviation obtained after fitting the data from ten independent simulations. The simulation parameters under the “chosen conditions” are shown in red.

		Percolation parameters			
		K	X_c	β	R^2
P_{+1}	0.0	1.62 ± 0.09	-3.4x10 ⁻⁹ ± 1.0x10 ⁻⁸	0.86 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	0.25	1.58 ± 0.08	-1.8x10 ⁻¹⁰ ± 2.0x10 ⁻¹⁰	0.86 ± 0.02	0.997 ± 0.002
	0.5	1.63 ± 0.12	-8.4x10 ⁻¹¹ ± 8.7x10 ⁻¹¹	0.85 ± 0.03	0.998 ± 0.001
	0.75	1.69 ± 0.14	-0.01 ± 0.05	0.84 ± 0.03	0.996 ± 0.002
	1.0	1.55 ± 0.12	-3.2x10 ⁻⁹ ± 9.4x10 ⁻⁹	0.87 ± 0.03	0.998 ± 0.001
P_{-1}	0.0	1.58 ± 0.11	-2.3x10 ⁻⁹ ± 6.0x10 ⁻⁹	0.86 ± 0.03	0.998 ± 0.001
	0.25	1.57 ± 0.07	-2.3x10 ⁻¹⁰ ± 3.1x10 ⁻¹⁰	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	0.5	1.63 ± 0.15	-7.7x10 ⁻¹¹ ± 1.3x10 ⁻¹⁰	0.85 ± 0.03	0.997 ± 0.001
	0.75	1.64 ± 0.09	-1.6x10 ⁻⁹ ± 4.8x10 ⁻⁹	0.85 ± 0.02	0.997 ± 0.002
	1.0	1.50 ± 0.16	-2.0x10 ⁻⁹ ± 5.1x10 ⁻⁹	0.87 ± 0.03	0.998 ± 0.002
P_{+2}	0.0	n/a	n/a	n/a	n/a
	0.25	1.59 ± 0.14	-2.8x10 ⁻¹⁰ ± 3.9x10 ⁻¹⁰	0.86 ± 0.03	0.998 ± 0.001
	0.5	1.56 ± 0.08	-1.0x10 ⁻² ± 2.0x10 ⁻²	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	0.75	1.58 ± 0.10	-3.0x10 ⁻³ ± 1.0x10 ⁻²	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	1.0	1.54 ± 0.10	-8.6x10 ⁻⁵ ± 3.0x10 ⁻⁴	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
P_{-2}	0.0	1.63 ± 0.12	-3.6x10 ⁻¹⁰ ± 6.8x10 ⁻⁴	0.85 ± 0.03	0.998 ± 0.001
	0.25	1.51 ± 0.07	-3.6x10 ⁻¹⁰ ± 4.3x10 ⁻¹⁰	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	0.5	1.68 ± 0.15	-8.1x10 ⁻¹¹ ± 1.3x10 ⁻¹⁰	0.83 ± 0.03	0.997 ± 0.001
	0.75	1.49 ± 0.07	-1.6x10 ⁻¹⁰ ± 1.2x10 ⁻¹⁰	0.87 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	1.0	1.49 ± 0.07	-2.1x10 ⁻¹⁰ ± 1.8x10 ⁻¹⁰	0.86 ± 0.01	0.997 ± 0.001
P_{+3}	0.0	n/a	n/a	n/a	n/a
	0.25	0.91 ± 0.06	9.0x10 ⁻¹ ± 9.0x10 ⁻²	0.83 ± 0.02	0.996 ± 0.001
	0.5	1.16 ± 0.06	-4.6x10 ⁻¹⁰ ± 3.8x10 ⁻¹⁰	0.87 ± 0.01	0.997 ± 0.002
	0.75	1.48 ± 0.12	-2.3x10 ⁻¹⁰ ± 3.0x10 ⁻¹⁰	0.86 ± 0.02	0.997 ± 0.002
	1.0	1.71 ± 0.10	-1.8x10 ⁻¹⁰ ± 2.9x10 ⁻¹⁰	0.85 ± 0.02	0.998 ± 0.001
P_{-3}	0.0	1.96 ± 0.12	-9.0x10 ⁻¹⁰ ± 8.5x10 ⁻¹⁰	0.91 ± 0.02	0.998 ± 0.001
	0.25	1.61 ± 0.18	-1.0x10 ⁻² ± 4.0x10 ⁻²	0.90 ± 0.04	0.999 ± 0.001
	0.5	1.54 ± 0.12	-1.3x10 ⁻¹⁰ ± 2.7x10 ⁻¹⁰	0.85 ± 0.03	0.998 ± 0.001
	0.75	1.38 ± 0.08	-1.1x10 ⁻¹⁰ ± 2.8x10 ⁻¹⁰	0.83 ± 0.02	0.999 ± 0.001
	1.0	1.23 ± 0.04	-1.8x10 ⁻¹⁰ ± 5.4x10 ⁻¹⁰	0.82 ± 0.01	0.997 ± 0.001

Monomer Inactivation

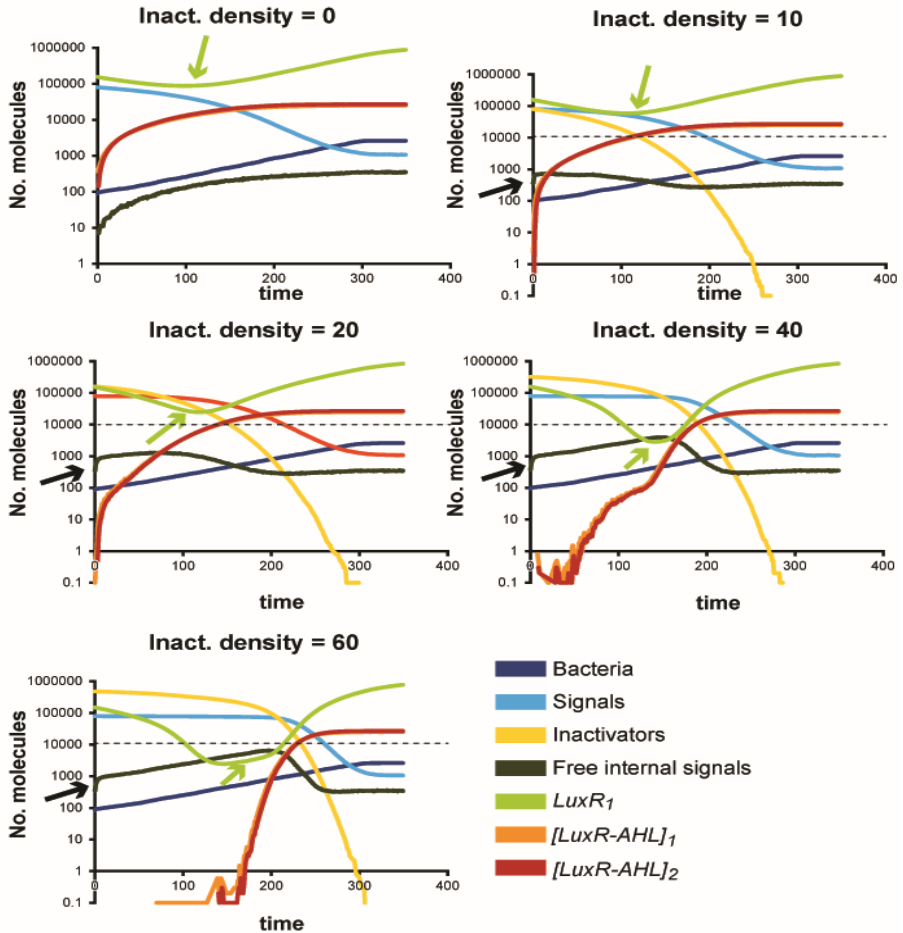


Figure S10. *In silico* modelling the inactivation of LuxR molecules under scenario 1 (monomer inactivation). Specific inactivator densities are indicated over each plot. X-axis: Simulation time in arbitrary units; Y-axis: number of virtual agents: bacteria (navy), extracellular signals (cyan), inactivators (yellow), free internal signals (black), LuxR₁ (green), [LuxR-AHL]₁ (orange), and [LuxR-AHL]₂ (red). Discontinuous lines: intersections of the [LuxR-AHL]₂ and the inactivator curves on the Y axis. Black arrows: initial burst of intracellular AHL in the presence of inactivator. Green arrows: minima in the LuxR₁ curves. Y-axis is shown in logarithmic scale. Traces correspond to the average of ten independent simulations. Standard deviations not shown for clarity.

Dimer Inactivation

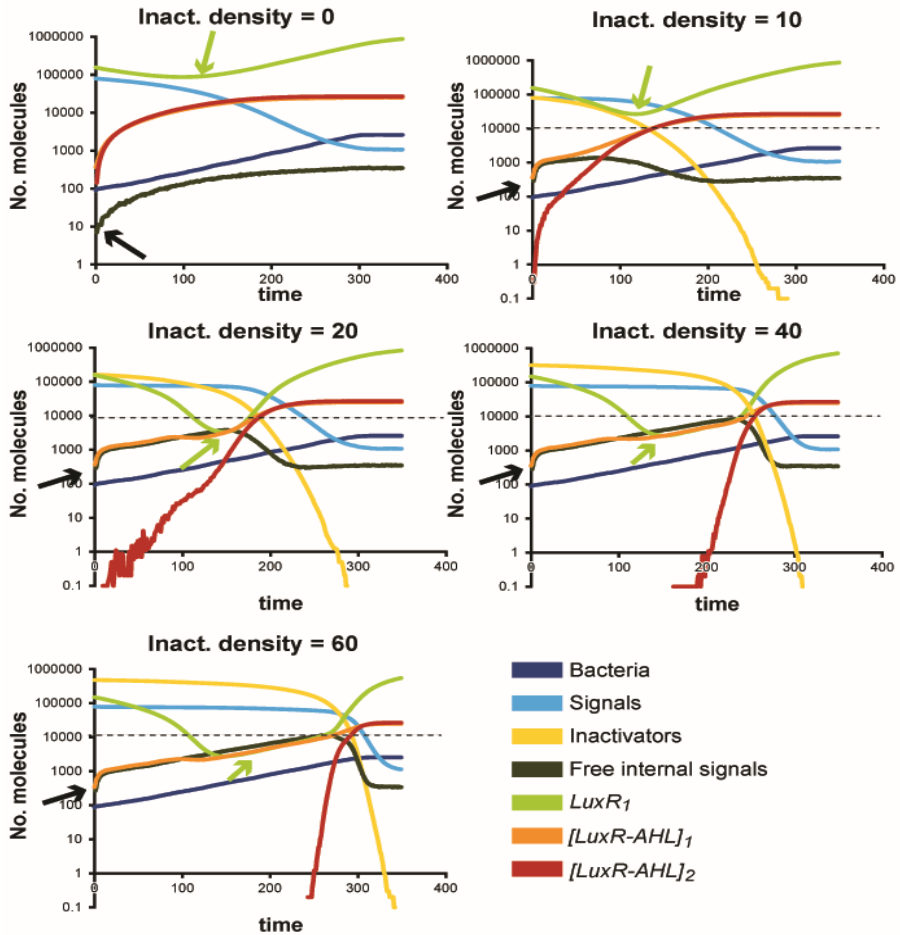


Figure S11. *In silico* modelling the inactivation of LuxR molecules under scenario 2 (dimer inactivation). Specific inactivator densities are indicated over each plot. X-axis: Simulation time in arbitrary units; Y-axis: number of virtual agents: bacteria (navy), extracellular signals (cyan), inactivators (yellow), free internal signals (black), $LuxR_1$ (green), $[LuxR-AHL]_1$ (orange), and $[LuxR-AHL]_2$ (red). Discontinuous lines: intersections of the $[LuxR-AHL]_2$ and the inactivator curves on the Y axis. Black arrows: initial burst of intracellular AHL in the presence of inactivator. Green arrows: minima in the $LuxR_1$ curves. Y-axis is shown in logarithmic scale. Traces correspond to the average of ten independent simulations. Standard deviations not shown for clarity.

4.7. REFERENCES

- (1) Koch, B.; Liljefors, T.; Persson, T.; Nielsen, J.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. The LuxR Receptor: The Sites of Interaction with Quorum-Sensing Signals and Inhibitors. *Microbiology* **2005**, *151* (11), 3589–3602.
- (2) Qin, N.; Callahan, S. M.; Dunlap, P. V.; Stevens, A. M. Analysis of LuxR Regulon Gene Expression during Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (11), 4127–4134.
- (3) Goryachev, A. B. Design Principles of the Bacterial Quorum Sensing Gene Networks. *Wiley Interdiscip. Rev. Biol. Med.* **2009**, *1* (1), 45–60.
- (4) Medaniel, R.; Weiss, R. Advances in Synthetic Biology : On the Path from Prototypes to Applications. **2005**, 476–483.
- (5) Perez, P.; Weiss, J.; Hagen, S. Noise and Crosstalk in Two Quorum-Sensing Inputs of *Vibrio Fischeri*. *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5* (1), 153.
- (6) Weber, M.; Buceta, J. Dynamics of the Quorum Sensing Switch: Stochastic and Non-Stationary Effects. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7* (1), 6.
- (7) Müller, J.; Kuttker, C.; Hense, B. A.; Rothballer, M.; Hartmann, A. Cell–Cell Communication by Quorum Sensing and Dimension-Reduction. *J. Math. Biol.* **2006**, *53*, 672–702.
- (8) Fujimoto, K.; Sawai, S. A Design Principle of Group-Level Decision Making in Cell Populations. *PLoS Comput Biol* **2013**, *9* (6), e1003110.
- (9) Williams, J. W.; Cui, X.; Levchenko, A.; Stevens, A. M. Robust and Sensitive Control of a Quorum-Sensing Circuit by Two Interlocked Feedback Loops. *Molec Syst Biol* **2008**, *4*, 234.
- (10) Melke, P.; Sahlin, P.; Levchenko, A.; Jönsson, H. A Cell-Based Model for Quorum Sensing in Heterogeneous Bacterial Colonies. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (6), e1000819.
- (11) Gorochowski, T. E.; Matyjaszkiewicz, A.; Todd, T.; Oak, N.; Kowalska, K.; Reid, S.; Tsaneva-Atanasova, K.; Savery, N. J.; Grierson, C. S.; di Bernardo, M. BSim: An Agent-Based Tool for Modeling Bacterial Populations in Systems and Synthetic Biology. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42790.
- (12) Rai, N.; Anand, R.; Ramkumar, K.; Sreenivasan, V.; Dabholkar, S.; Venkatesh, K. V.; Thattai, M. Prediction by Promoter Logic in Bacterial Quorum Sensing. *PLoS Comput Biol* **2012**, *8* (1), e1002361.
- (13) Goryachev, A. B. Understanding Bacterial Cell-Cell Communication with Computational Modeling. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 238–250.
- (14) Kurz, V.; Nelson, E. M.; Perry, N.; Timp, W.; Timp, G. Epigenetic Memory Emerging from Integrated Transcription Bursts. *Biophys. J.* **2013**, *105* (6), 1526–1532.
- (15) Bunde, A.; Kantelhardt, J. W. Diffusion and Conduction in Percolation Systems. In *Diffusion in Condensed Matter*; Heitjans, P., Kärger, J., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2005; pp 895–914.
- (16) Stanley, H. E.; Andrade, J. S.; Havlin, S.; Makse, H. A.; Suki, B. Percolation Phenomena: A Broad-Brush Introduction with Some Recent Applications to Porous Media, Liquid Water, and City Growth. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **1999**, *266* (1–4), 5–16.
- (17) Cohen, O.; Keselman, A.; Moses, E.; Martinez, M. R.; Soriano, J.; Tlusty, T. Quorum Percolation in Living Neural Networks. *Epl* **2010**, *89* (1), 18008.

- (18) Richardson, T. O.; Christensen, K.; Franks, N. R.; Jensen, H. J.; Sendova-Franks, A. B. Ants in a Labyrinth: A Statistical Mechanics Approach to the Division of Labour. *PLoS One* **2011**, *6* (4), e18416.
- (19) Vila-Sanjurjo, C.; Engwer, C.; Qin, X.; Hembach, L.; Verdía-Cotelo, T.; Remuñán-López, C.; Vila-Sanjurjo, A.; Goycoolea, F. M. A Single Intracellular Protein Governs the Critical Transition from an Individual to a Coordinated Population Response during Quorum Sensing: Origins of Primordial Language. *bioRxiv* **2016**.
- (20) Sauerwald, T.; Hennemann, J.; Kohl, C.-D.; Wagner, T.; Russ, S. H2S Detection Utilizing Percolation Effects in Copper Oxide. In *Proc Sens 2013*; 2013; pp 656–660.
- (21) Kurselis, K.; Kiyani, R.; Bagratashvili, V. N.; Popov, V. K.; Chichkov, B. N. 3D Fabrication of All-Polymer Conductive Microstructures by Two Photon Polymerization. *Opt. Express* **2013**, *21* (25), 31029–31035.
- (22) Stauffer, D.; Aharony, A. Cluster Numbers. In *Introduction to Percolation Theory*; Stauffer, D., Aharony, A., Eds.; London: UK Taylor & Francis Ltd., 1994; pp 15–59.
- (23) Sethna, J. P. Order Parameters, Broken Symmetry, and Topology. In *Statistical Mechanics. Entropy, Order Parameters, and Complexity*; Sethna, J. P., Ed.; Oxford: Oxford University Press. Master Series in Statistical, Computational, and Theoretical Physics, 2006; pp 192–196.
- (24) Volkmer, B.; Heinemann, M. Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia Coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling. *PLoS One* **2011**, *6* (7), e23126.
- (25) Panikov, N. S. Microbial Ecology. In *Environmental Biotechnology*; Ivanov, V., Tay, J.-H., Eds.; Humana Press, 2010; pp 121–191.
- (26) Maier, R. M.; Pepper, I. L.; Gerba, C. P. *Environmental Microbiology*; Elsevier: San Diego Calif., 2006.
- (27) Kelly, J. R.; Rubin, A. J.; Davis, J. H.; Ajo-Franklin, C. M.; Cumbers, J.; Czar, M. J.; de Mora, K.; Gliberman, A. L.; Monie, D. D.; Endy, D. Measuring the Activity of BioBrick Promoters Using an in Vivo Reference Standard. *J. Biol. Eng.* **2009**, *3* (1), 4.
- (28) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.
- (29) Manefield, M.; Rasmussen, T. B.; Henzter, M.; Andersen, J. B.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. Halogenated Furanones Inhibit Quorum Sensing through Accelerated LuxR Turnover. *Microbiology* **2002**, *148* (Pt 4), 1119–1127.
- (30) Pearson, J. P.; Van Delden, C.; Iglewski, B. H. Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas Aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (4), 1203–1210.
- (31) Kaplan, H. B.; Greenberg, E. P. Diffusion of Autoinducer Is Involved in Regulation of the *Vibrio Fischeri* Luminescence System. *J. Bacteriol.* **1985**, *163* (3), 1210–1214.
- (32) Engwer, C. Understanding the Principles of Bacterial Communication and Particle Formation, and the Interaction between Them (PhD Thesis), University of Münster, 2019.
- (33) Teng, S.; Wang, Y.; Tu, K. C.; Long, T.; Mehta, P.; Wingreen, N. S.; Bassler, B.; Ong, N. P. Measurement of the Copy Number of the Master Quorum-Sensing Regulator of a Bacterial Cell. *Biophys J* **2010**, *98* (9), 2024–2031.
- (34) Adler, J.; Meir, Y.; Aharony, A.; Harris, A. B.; Klein, L. Low-Concentration Series in General Dimension. *J. Stat. Phys.* **1990**, *58* (3–4), 511–538.
- (35) Young, R.; Bremer, H. Polypeptide-Chain-Elongation Rate in *Escherichia Coli* B/r as a Function of Growth Rate. *Biochem. J.* **1976**, *160* (2), 185–194.

- (36) Milo, R. What Is the Total Number of Protein Molecules per Cell Volume? A Call to Rethink Some Published Values. *BioEssays* **2013**, *35* (12), 1050–1055.
- (37) Kurland, C. G.; Dong, H. Bacterial Growth Inhibition by Overproduction of Protein. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21* (1), 1–4.
- (38) Pérez, P. D.; Hagen, S. J. Heterogeneous Response to a Quorum-Sensing Signal in the Luminescence of Individual *Vibrio Fischeri*. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15473.
- (39) Niu, C.; Afre, S.; Gilbert, E. S. Subinhibitory Concentrations of Cinnamaldehyde Interfere with Quorum Sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43* (5), 489–494.
- (40) Brackman, G.; Defoirdt, T.; Miyamoto, C.; Bossier, P.; Van Calenbergh, S.; Nelis, H.; Coenye, T. Cinnamaldehyde and Cinnamaldehyde Derivatives Reduce Virulence in *Vibrio* Spp. by Decreasing the DNA-Binding Activity of the Quorum Sensing Response Regulator LuxR. *BMC Microbiol.* **2008**, *8* (149).
- (41) Sahimi, M. Elements of Percolation Theory. In *Applications of Percolation Theory*; Sahimi, M., Ed.; Taylor & Francis: London, 1994; pp 8–22.
- (42) Guzmán-Lastra, F.; Löwen, H.; Mathijssen, A. J. T. M. Active Carpets Drive Non-Equilibrium Diffusion and Enhanced Molecular Fluxes. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1906. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22029-y>.
- (43) Kindler, O.; Pulkkinen, O.; Cherstvy, A. G.; Metzler, R. Burst Statistics in an Early Biofilm Quorum Sensing Model: The Role of Spatial Colony-Growth Heterogeneity. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1).
- (44) Brovchenko, I.; Oleinikova, A. Which Properties of a Spanning Network of Hydration Water Enable Biological Functions? *ChemPhysChem* **2008**, *9* (18), 2695–2702.
- (45) Kohestani, H.; Giuliani, A. Organization Principles of Biological Networks: An Explorative Study. *Biosystems* **2016**, *141*, 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2016.01.004>.
- (46) Müller, J.; Kuttler, C.; Hense, B. A. Sensitivity of the Quorum Sensing System Is Achieved by Low Pass Filtering. *BioSystems* **2008**, *92* (1), 76–81.
- (47) Ayrapetyan, M.; Williams, T. C.; Oliver, J. D. Interspecific Quorum Sensing Mediates the Resuscitation of Viable but Nonculturable Vibrios. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (8), 2478–2483.
- (48) Showalter, R. E.; Martin, M. O.; Silverman, M. R. Cloning and Nucleotide Sequence of LuxR, a Regulatory Gene Controlling Bioluminescence in *Vibrio Harveyi*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*.
- (49) Friedman, M. Chemistry, Antimicrobial Mechanisms, and Antibiotic Activities of Cinnamaldehyde against Pathogenic Bacteria in Animal Feeds and Human Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, pp 10406–10423.
- (50) Kim, B. H.; Lee, Y. G.; Lee, J.; Lee, J. Y.; Cho, J. Y. Regulatory Effect of Cinnamaldehyde on Monocyte/Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*.
- (51) Youn, H. S.; Lee, J. K.; Choi, Y. J.; Saitoh, S. I.; Miyake, K.; Hwang, D. H.; Lee, J. Y. Cinnamaldehyde Suppresses Toll-like Receptor 4 Activation Mediated through the Inhibition of Receptor Oligomerization. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75* (2), 494–502.
- (52) Hink, M. A.; Griep, R. A.; Borst, J. W.; van Hoek, A.; Eppink, M. H.; Schots, A.; Visser, A. J. Structural Dynamics of Green Fluorescent Protein Alone and Fused with a Single Chain Fv Protein. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (23), 17556–17560.
- (53) Urbanowski, M. L.; Lostroh, C. P.; Greenberg, E. P. Reversible Acyl-Homoserine Lactone Binding to Purified *Vibrio Fischeri* LuxR Protein. *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (3), 631–637.
- (54) <http://parts.igem.org/Part:pSB1A3>



5. CHAPTER 2. EFFECT OF THE ULTRASTRUCTURE OF CHITOSAN NANOPARTICLES IN COLLOIDAL STABILITY, QUORUM QUENCHING AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES*

* The results from this chapter have already been published as Vila-Sanjurjo, C. ^{a,c}, David, L. ^b, Remuñán-López, C. ^c, Vila-Sanjurjo, A. ^d and F.M. Goycoolea ^{a,e}. Effect of the ultrastructure of chitosan nanoparticles in colloidal stability, quorum quenching and antibacterial activities. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *556*, 592–605. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.061>., ISSN: 0021-9797.

^a Westfälische Wilhelms Universität Münster, IBBP, Laboratory of Nanobiotechnology, Schlossplatz 8, Münster 48143, Germany.

^b Ingénierie des Matériaux Polymères IMP@Lyon1, CNRS UMR 5223, Univ. Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 15, Bd A. Latarjet, 69622 Villeurbanne Cedex, France

^c Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

^d Grupo GIBE, Departamento de Biología Celular e Molecular, Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Universidade da Coruña, Campus Zapateira, s/n, 15071 A Coruña, Spain

^e School of Food Science and Nutrition, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, United Kingdom



5.1. ABSTRACT

We have fabricated two types of crosslinked chitosan-based nanoparticles (NPs), namely 1) ionically crosslinked with tripolyphosphate (TPP), designated as IC-NPs and 2) dually co-crosslinked (ionically and covalently with TPP and genipin, respectively) termed CC-NPs. The two types of NPs were physicochemically characterized by means of DLS-NIBS, synchrotron SAXS and M3-PALS (zeta potential). First, we found that covalent co-crosslinking of ionically pre-crosslinked nanoparticles yielded monodisperse CC-NPs in the size range of ~200 nm, whereas the parental IC-NPs remained highly polydisperse. While both types of chitosan nanoparticles displayed a core-shell structure, as determined by synchrotron SAXS, only the structure of CC-NPs remained stable at long incubation times. This enhanced structural robustness of CC-NPs was likely responsible of their superior colloidal stability even in biological medium. Second, we explored the antimicrobial and quorum sensing inhibition activity of both types of nanoparticles. We found that CC-NPs had lower long-term toxicity than IC-NPs. In contrast, sub-lethal doses of IC-NPs consistently displayed higher levels of quorum quenching activity than CC-NPs. Thus, this work underscores the influence of the NP's ultrastructure on their colloidal and biological properties. While the cellular and molecular mechanisms at play are yet to be fully elucidated, our results broaden the spectrum of use of chitosan-based nanobiomaterials in the development of antibiotic-free approaches against Gram-negative pathogenic bacteria.

5.2. INTRODUCTION

The abuse of antibiotic therapies as a strategy to combat bacterial pathogens for many decades has led to major public health concerns regarding the spreading of bacterial drug resistance. As a result, numerous calls in favor of the urgent pursuit of alternative antimicrobial strategies are now widespread^{1,2}. Among these, strategies directed to interfere with bacterial quorum sensing (QS), also called quorum quenching (QQ), are of particular interest^{3,4}. The term QS comprises several mechanisms of cell-to-cell communication mediated by

exocellular chemical compounds that act as autoinducers ^{5,6}. Acyl-homoserine lactones (AHLs), initially described in the marine bioluminescent bacterium *Aliivibrio fischeri* ⁶, constitute the best-known family of autoinducers. Together with the rest of the QS machinery of *A. fischeri*, composed of the proteins LuxI and LuxR, AHLs are evolutionary well conserved among Gram-negative bacteria ^{6,7}. AHLs are synthesized by LuxI-type enzymes and can freely diffuse in and out of the cell, where they bind to LuxR-type activators to regulate communal behavior ^{6,7}. As such, AHL-based signaling is a bacterial communication strategy consisting in the integration of the environmental concentration of signal as a surrogate of cell density. QS is involved in many pathogenic processes in bacteria, including the production of virulence factors, biofilm formation, and bacteria-host interactions among others ^{8,9}. QQ strategies include the use of agents capable of blocking QS-based mechanisms by inactivating the signaling molecules, interfering with signal reception, or inhibiting signal synthesis ^{3,10,11}.

Chitosan (CS) refers to a family of aminopolysaccharides obtained by partial chemical deacetylation of chitin. This biopolymer is composed of linear chains of β -1,4-linked glucosamine and *N*-acetyl-D-glucosamine units. The properties of chitosan mainly depend on its molecular weight, polydispersity, and the molar fraction of acetylated units, together with their distribution pattern. Ionic (also known as physical) or chemical crosslinking may be applied in order to improve or modulate the characteristics of CS and to design novel CS-based platforms intended for biopharmaceutical applications ¹². Ionic crosslinking of CS has been widely described for the development of non-toxic, CS-based hydrogels, as well as for the preparation of CS-based micro- and nano-systems ¹³⁻¹⁹. The mild conditions involved in ionic crosslinking makes this method optimal for the encapsulation and protection of delicate therapeutic biomolecules (biologics), such as peptides, proteins and nucleic acids ²⁰⁻²³. Ionic crosslinking of CS is normally performed by using either multivalent anions or polyanions, such as tripolyphosphate (TPP). After finding the optimal physico-chemical and processing parameters, particles in the micro- or nano-meter range can be created by ionic gelation of CS with TPP ^{13,15,24-27}.

The use of chemical crosslinkers is known to improve the stability of CS against pH, temperature variations, and biological and mechanical degradation, while allowing to modulate structure and properties of the CS gel network^{14,28–34}. In fact, by controlling the extent of chemical crosslinking of CS, it is possible to constraint important features of CS-based materials such as size, which may range from nanoparticles to macroscopic gels or films, or the extent of association and release of bioactive payloads of interest^{31,32,35–42}. Genipin (GNP) is a natural crosslinking agent obtained from the glycosylated geniposide iridoid compound produced by the fruits of *Gardenia jasminoides* and *Genipa americana*. GNP has been reported to be much less cytotoxic and more biocompatible than other well-known chemical crosslinkers used in the context of CS, such as glutaraldehyde^{30,32,39,43–45}. Thus, the use of GNP as a CS crosslinker has become a promising alternative for developing fully biocompatible CS-based materials. The chemical crosslinking reaction between GNP and CS takes place in two steps. The first and faster step involves a nucleophilic attack by the amino groups of chitosan on the olefinic carbon of GNP, followed by the opening of the dihydropyran ring and the attack by the secondary amino group of the newly formed aldehyde. The second step, slower than the first one, consists in the nucleophilic substitution of the ester group of GNP, leading to the formation of a secondary amide linkage with CS and of crosslinked bridges^{39,44–46}.

CS has been shown to interfere with biofilm formation⁴⁷ and with both biofilm formation and QS⁴⁸ in a variety of Gram positive and negative bacteria. However, no studies on the QQ effect of CS-based nanomaterials were reported until very recently. Our group has recently reported that CS oil-core nanocapsules can bind to bacterial cells, promote cell aggregation, and attenuate the QS response of a model biosensor⁴⁹. Here, we describe the preparation and the physicochemical and structural characterization of two types of CS NPs, namely ionically (IC) and chemically co-crosslinked (CC) NPs. By using a model QS biosensor, we demonstrate that IC-NPs constitute a subset of CS-NPs capable to strongly interfere with QS at sublethal doses.

5.3. MATERIALS AND METHODS

5.3.1. Materials

We used a high-purity grade, commercial sample of the hydrochloride salt form of CS (ProtasanUP CL113; Novamatrix, FMC-Biopolymer, Norway; MW ~92 kDa; Ip ~2.5, as determined by GPC-MALLS-DRI; DA ~14%, as determined by ¹H NMR). GNP was purchased from Challenge Bioproducts (Taiwan). Analytical grade TPP, *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL, named AHL thereafter), and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Milli-Q water was used throughout this work.

5.3.2. Preparation and characterization of nanoparticles

5.3.2.1. Modulation of ionic strength:

IC-NPs were prepared according to the general ionotropic gelation protocol described by Calvo et al.¹⁵ with minor modifications. To assess the optimal composition for the fabrication of IC-NPs with average size ≤ 200 nm and with low polydispersity (PDI~0.1-0.2), different CS:TPP mass ratios were screened in water and 85 mM NaCl. To obtain IC-NPs with varying CS:TPP mass ratios (from 2.67:1 to 9.0:1), stock solutions of CS (2-3 mg/mL) and TPP (1-1.25 mg/mL) were prepared both in water and 85 mM NaCl and aliquots of the two components were mixed in 96-well microplates. To rapidly assess the composition of IC-NPs that would yield NPs with the lowest average NP diameter and polydispersity index (PDI), we followed the classification method described by Calvo et al. and Dmour & Taha^{15,50}. Larger batches (30 mL) of IC-NPs with desired sizes and PDIs, were prepared by pouring 11.25 mL of TPP solution onto 18.75 mL of CS solution under magnetic stirring (500 rpm). When necessary, IC-NPs were isolated by centrifugation (40 min, 10.000 x g, 25 °C) in 1.5 mL vials containing a glycerol bed and the pellets were resuspended in 100 μ L of water.

5.3.2.2. Covalent GNP co-crosslinking of NPs:

IC-NPs were covalently co-crosslinked with GNP at different GNP:CS mass ratios (0.06:1 – 1.7:1). Aliquots of a 5 mg/mL GNP solution were added to a freshly prepared, non-isolated IC-NP suspension, to a final concentration of 1 mg/mL in water. The mixture was incubated at 37 °C under shaking (~1400 rpm) for times ranging from 24 to 244 h.

5.3.2.3. Physicochemical characterization of IC- and CC-NPs:

The size distribution and ζ -potential of the NPs were determined by dynamic light scattering using non-invasive back scattering (DLS-NIBS, measuring angle 173°) and by phase-analysis light scattering (PALS), respectively. In both cases, we used a Malvern Zetasizer NanoZS ZEN 3600 (Malvern Instruments UK) equipped with a 4 mW, He/Ne laser output operating at $\lambda=633$ nm. The Malvern patented, mixed mode measurement method (M3-PALS) was used for PALS analysis. All measurements were performed at 25.0 ± 0.2 °C. ζ -potential analysis were performed in 1mM KCl and 85 mM NaCl. The value of ζ -potential was derived using Smolouchowski's equation from the electrophoretic mobility measurements, according with the function:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(Ka)}{3\eta} \quad \text{Eq. 1}$$

where:

U_E = electrophoretic mobility; ε = dielectric constant; ζ = zeta potential; η = Viscosity of solvent; $f(Ka)$ = Henry's function (= 1.5 Smoluchowski approximation for nanoparticles > 200 nm and $I > 10^{-3}$ M).

The kinetics of the crosslinking reaction were monitored by UV/VIS spectroscopy with a Beckman-Coulter DU® DU 730 - Life Science UV/Vis Spectrophotometer and by Synchrotron SAXS at the BM2 D2AM beamline of the ESRF synchrotron (Grenoble, France). For SAXS an incident energy (E) of 16.000 keV, and a sample to detector distance ~1.88 m were used. The I(q) vs. q patterns were obtained with a Roper Scientific CCD camera after performing dark-image subtraction, pixel-sensitivity normalization, and radial averaging

around the image centre (centre of gravity of the incident beam) with the BM2IMG software. Q-pixel calibration was performed with silver behenate.

5.3.2.4. Determination of the concentration of IC-NPs and CC-NPs:

Batch NP concentration was determined after centrifugation (40 min, 10.000 x g, 25 °C) of fixed volumes of freshly prepared, non-isolated IC-NPs in the absence of glycerol. This was performed in triplicate with tared vials, by discarding the supernatants and dry-weighting the remaining pellets. The batch IC-NP solution with a known concentration of NPs was serially sub-diluted in triplicated vials (dilution factors: 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 and 1000) and the derived count rate (kilo counts per second; kcps) was estimated for each condition by DLS-NIBS at 25 °C and with an attenuator value of 9. Linear regression calibration of the kcps values against NPs is shown in **Figure S1**. The resulting calibration equation:

$$\text{Derived count rate (Kcps)} = 285946 \times [\text{NPs}](\text{mg/mL}) - 0.9950 \quad \text{Eq. 2}$$

was used to readily estimate the concentration of IC-NPs and CC-NPs from their DLS-NIBS-measured kcps values during subsequent experimental steps (e.g., isolation, covalent crosslinking, dilution, etc.)

51

5.3.3. Stability of IC- and CC-NPs in supplemented M9 minimal medium

IC-NPs, with a CS:TPP mass ratio of 3.3:1, were prepared in 85 mM NaCl from CS and TPP solutions at concentrations of 2 and 1 mg/mL, respectively. The resulting IC-NPs were isolated as explained above and diluted to a final concentration of 1 mg/mL. Isolated IC-NPs were sub-divided into six vials (1 mL each), three of which would be used as controls in the experiments described below. The other three vials were subjected to crosslinking with 60 µL of GNP (5 mg/mL) and incubated for 24 h at 37 °C under shaking (100 rpm), to obtain CC-NPs at a GNP:CS mass ratio of 0.3:1. 60 µL of water were added to the

control vials instead of GNP and incubated under the same conditions as above. After incubation, the NPs were centrifuged and isolated as explained above and re-suspended in water to a final concentration of 1 mg/mL. All vials were sub-diluted 1:50 in M9 minimal medium supplemented with 0.5% casamino acids, 1 mM thiamine hydrochloride, and ampicillin (200 µg/mL), in a final volume of 1 mL. Control vials were sub-diluted and incubated in water under the same conditions as above. IC-NPs and CC-NPs were incubated under shaking (100 rpm) for 6 h in M9 minimal medium at 37 °C. The time-resolved evolution of NP size was monitored by DLS-NIBS at 37 °C.

5.3.4. Microbiological assays

5.3.4.1. Assays with the *E.coli* fluorescent biosensor:

The *Escherichia coli* strain Top10 was transformed with plasmid pSB1A3-BBa_T9002, carrying the BBa_T9002 genetic device (Registry of Standard Biological Parts: http://parts.igem.org/Part:BBa_T9002), kindly donated by Prof. John C. Anderson (UC Berkeley, USA). The transformed strain is a biosensor that can respond to AHL⁵². Cultures were prepared as per the protocol described in **Chapter 1**.

5.3.4.2. Determination of antimicrobial activity of CS NPs:

Isolated IC-NPs and CC-NPs were serially diluted in water by a factor of 0, 2, 5, 10 and 20. Following the protocol described in the previous section, ten-µL aliquots of the NP dilutions were applied to triplicated wells containing 180 µL of the *E. coli* biosensor culture and 10 µL of 1×10^{-8} M AHL (final AHL concentration = 5×10^{-10} M), resulting in a final volume of 200 µL. Control wells in the absence of NPs were prepared by adding 10 µL of water to the culture instead of AHL. Blank and AHL-less control wells were prepared as explained above. Final NP concentrations in the microplate ranged from 6.26 µg/mL to 25.81 µg/mL for IC-NPs and from 6.85 to 70.93 µg/mL for CC-NPs. Microplates were incubated in the microplate reader for 300 min, as explained above. To monitor cell viability, 20 µL-aliquots from each treatment were applied to a new microplate containing 180 µL of

fresh M9 minimal medium and incubated for further 300 min in the microplate reader. To estimate the effect of the NP treatments on cell growth, the OD₆₀₀ values were plotted against time and the growth curve cell was fitted to the SGompertz function (OriginLab, Northampton, MA):

$$OD_{600} = ae^{-\exp(-k(t-t_c))} \quad \text{Eq. 3}$$

where:

a = amplitude, or maximum value,

k = growth rate coefficient

t_c = time at inflection

Growth rate values (μ_m) were calculated from the fitted parameters as explained by Tjørve and Tjørve⁵³:

$$\mu_m = a \frac{k}{e} \quad \text{Eq. 4}$$

Statistical comparisons between NP treatments and controls were made with GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA) using one-way ANOVA together with multiple-comparison Dunnett's Test (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$).

The IC₅₀ values for IC-NPs and CC-NPs were calculated as follows. The ratio of the OD₆₀₀ values obtained after a 300-min incubation in fresh medium of NP-pre-treated and control cells were converted to % viability values, plotted against the log₁₀ of NP concentration, and fitted to the non-linear dose-response function ($Y = 100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X) \times \text{HillSlope}))}$), GraphPad version 6.00, GraphPad Software, La Jolla California USA).

5.3.4.3. Evaluation of the ability of CS NPs to inhibit the QS response in the *E. coli* biosensor:

The QS inhibitory activity of IC-NPs and CC-NPs was evaluated as follows. IC-NPs and CC-NPs, prepared and isolated as explained above, were serially diluted in water and 10- μ L aliquots of

all the dilutions were applied to a microplate containing the *E. coli* biosensor culture in the presence of 5×10^{-10} M AHL. The plates were incubated for 300 min in the microplate reader as explained above.

5.4. RESULTS

5.4.1. Modulation of ionic strength for the optimization of size and polydispersity of ionically, TPP-crosslinked CS NPs (IC-NPs)

The type of high-purity grade hydrochloride salt form of CS (see Experimental Section) has been manufactured to allow its easy dissolution in water⁵⁴. It is known that the ionic strength of the solvent affects the intrinsic viscosity and chain conformation of CS in polyelectrolyte solutions⁵⁵. Huang and Lapitsky⁵⁶ have shown that moderate amounts of NaCl enhance the colloidal stability of TPP crosslinked chitosan NPs during their formation, likely by inhibiting the bridging of the newly formed microgels by TPP. In addition, Jonassen et al.¹³ have reported that smaller and more compact particles were formed in saline solvents, compared to particles formed in pure water. Building into these studies, and in order to more amply screen the TPP-crosslinking conditions, we explored two parallel fabrication routes, one performed in plain water and the other in 85 mM NaCl, a salt concentration previously used in our lab^{57,58}. In previous studies, we determined that the final pH attained by similar NP formulations prepared with TPP in 85 mM NaCl (CS:TPP mass ratio 6:1) was 5.89 ± 0.06 ⁵⁸. While this pH is not far off the pK_o of chitosan in HCl ($\sim 6.0 \pm 0.1$), it has been shown that the nanoparticles remain colloidally stable^{58,59}.

When IC-NPs were prepared in water, a clear solution was observed when CS concentrations ranged from 1.5-2.25 mg/mL at a TPP concentration of ≤ 0.3 mg/mL. Aggregation was evident when the concentrations of CS and TPP were between 1.5-2 mg/mL and 0.4-0.5 mg/mL, respectively (see **Table S1** and **Figure S2A**). In the case of the systems prepared in NaCl, clear solutions were observed at CS concentrations below 2.25 mg/mL and TPP concentrations below 0.3 mg/mL. No aggregation occurred at any of the concentrations tested (see **Table S1** and **Figure S2B**). Following Dmour & Taha⁵⁰, we

searched for relative concentrations of CS and TPP yielding the typical opalescence of colloidal particles in suspension (Tyndall effect). The concentration ranges at which the Tyndall effect was obvious both in water and 85 mM NaCl is shown in **Table S1** and **Figure S2**.

Next, we confirmed the presence of NPs within these concentration ranges by DLS-NIBS with the Zetasizer NanoZS. According to the manufacturer, the size detection limit of the instrument ranges from 0.3 nm to 10 μm , thus providing a broad detection range for these experiments. The contour plots of **Figure 1** illustrate the dependence of the NP size (panels A and B) and polydispersity (panels C and D) on the composition of IC-NPs prepared in water (panels A and C) and in 85 mM NaCl (panels B and D). The plot can be considered as a landscape with hills and valleys representing NP sizes (panels A and B) or PdI values (panels C and D). In this view, the green-to-red colour range represents hills with high NP sizes (panels A and B) or PdI values (panels C and D), whereas the purple-to-blue colour range corresponds to valleys with sub-micron sizes (panels A and B) and low-to-medium PdI values (panels C and D). Comparison of the contour plots obtained in water and in 85 mM NaCl revealed that the presence of salt played an important role in determining the final size and polydispersity of IC-NPs. Specifically, it was possible to obtain NPs with a size of ~ 200 nm and a fairly low PdI, ~ 0.2 - 0.3 , under a narrow range of CS:TPP mass ratios, namely 3:1-4:1 in 85 mM NaCl (dashed lines in panels B and D of **Figure 1**). In water and under an identical range of composition, NP sizes and PdI values were much larger (dashed lines in panels A and C of **Figure 1**). These findings are in general accordance with previous studies^{13,54,56}, reporting that the addition of adequate amounts of monovalent ions to NP solutions aids in the optimization of the NP hydrodynamic radius and screens the electrostatic repulsion of the charged amino groups present at the pH of the batch CS solution (pH ~ 5.0), leading to increased flexibility, larger degree of compaction of the CS backbone, superior colloidal stability, and lower polydispersity^{13,54,56}.

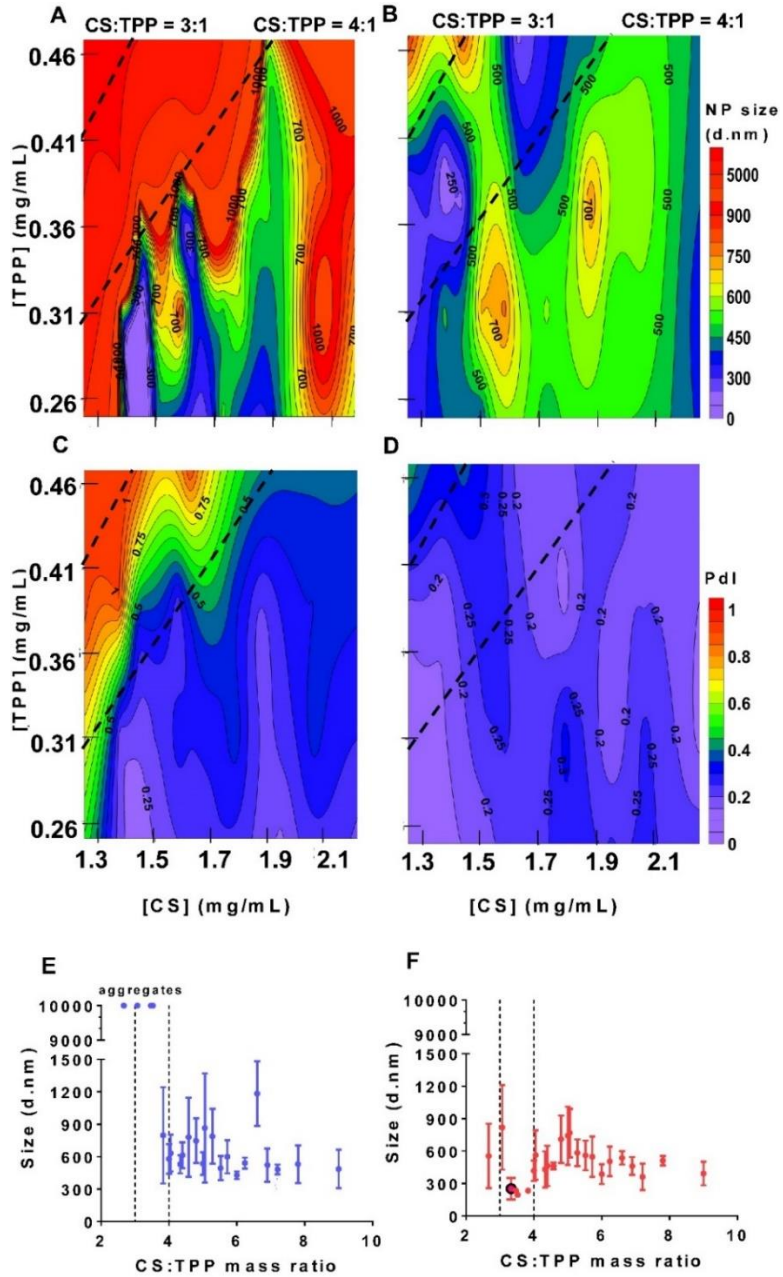


Figure 1. Dependence of IC-NP size (diameter) and Pdl on the CS:TPP mass ratio, as determined by DLS-NIBS.

Legend Figure 1: Dependence of IC-NP size (diameter) and Pdl on the CS:TPP mass ratio, as determined by DLS-NIBS. A-D. Contour plots showing the dependence of the size (A, B) and Pdl (C, D) of IC-NPs on the concentration of CS and TPP in water (A, C) and in 85 mM NaCl (B, D), respectively. X-axes, CS concentration in mg/mL (for the sake of clarity only shown in panels C and D). Y-axes, TPP concentration in mg/mL (for the sake of clarity only shown in panels A and C). Dashed lines in A-D delimit the area contained within the CS:TPP mass ratio range of 3:1 to 4:1. The identity of the line is indicated on top of the panels A and B. **E-F.** Variation of NP size in water (E) and in 85 mM NaCl (F) as a function of the CS:TPP mass ratio. X-axis, CS:TPP mass ratio obtained by dividing the relative CS and TPP concentrations in all the systems tested. Y axis, NP size (diameter) in nm. Dotted lines in E and F indicate the CS:TPP mass ratio ranges of 3:1 and 4:1. Data represent the mean and standard deviation of three replicates. The CS:TPP mass ratio of 3.33:1 in 85 mM NaCl is highlighted in black in F. All measurements were conducted at 25 ± 0.2 °C.

Figure 1E and F summarize the dependence of the average NP diameter on the CS:TPP mass ratios in water and in 85 mM NaCl, respectively. Among the CS:TPP mass ratios lying within the area of the contour plot representing optimal NP size and PdI values in 85 mM NaCl (area within dotted lines in panel F), we chose the 3.33:1 mass ratio for further analysis.

The size of the NPs chosen for the fabrication of CC-NPs was 251 ± 99 nm, as determined by DLS-NIBS. None of the IC-NP batches fabricated in plain water were used to make CC-NPs.

5.4.2. Covalent co-crosslinking of IC-NPs produces a defined core-shell structure

To elucidate whether TPP-crosslinked CS NPs could be co-crosslinked with GNP, salt-prepared IC-NPs with a CS:TPP mass ratio of 3.33:1 (**Figure 1F**) were covalently co-crosslinked with GNP (GNP:CS mass ratios 0.06:1-1.70:10.3) at 37 °C. UV-VIS spectroscopy performed during the incubation provided clear evidence that CC-NPs were indeed co-crosslinked with GNP (**Figure S3**).

To gain further insight into the structural modifications that take place within CC-NPs during co-crosslinking with GNP, synchrotron SAXS studies were conducted to probe the ultrastructure of our NPs in the 1-50 nm resolution range. This range would allow us to ascertain, for example, whether there might exist differentially structured regions in our NPs, as opposed to having structurally homogeneous particles. In **Figure 2A-C** we plotted the scattering patterns $I(q)$ against the

scattering vector q (in log-log scales) for CC-NPs at various GNP:CS mass ratios and at different incubation times. Given that significant structural modification of nanogel systems at the molecular scale occurs during stepwise increases of temperature⁶⁰, the time-zero plots were deliberately omitted, because the samples were set at room temperature at this time point. The patterns were also characterized with Kratky plots ($I(q) \cdot q^2$ vs. q)⁶¹ (**Figure 2D-F**). The scattering patterns showed a bell-shaped curve typical of compact nanoparticles, with a prominent peak centred at $q^* \sim 0.01 \text{ \AA}^{-1}$ in all cases. The $q^* \sim 0.01 \text{ \AA}^{-1}$ peak is absent in the case of uncrosslinked CS solutions, although these solutions exhibit an alternative, weak correlation peak due to polyelectrolyte ordering⁶². The value of q^* is related to the radius of gyration (R_g) as follows. For a monodisperse collection of particles, R_g is given by $R_g = \frac{\sqrt{3}}{q^*}$ ⁶¹. Therefore, in our hands, $R_g \sim 17 \text{ nm}$ (**Figure 2D-F**).

Interestingly, the intensity of the peak is reduced in Kratky plots as GNP:CS mass ratios increased (panels **D-F** in **Figure 2**), except for the lowest GNP:CS mass ratio, 0.06. The trend shown in Kratky plots was robust, as it was obtained at the three different incubation times shown in **Figure 2D-F**. This also indicated that NPs were stable and did not sediment throughout the experiment. The reduced peak intensity observed in Kratky plots at GNP:CS mass ratios higher than 0.06 might stem from a change of the electron-density contrast factor due to increased levels of chemical crosslinking with GNP. Indeed, such crosslinking process could compete with CS/TPP physical interactions and induce TPP release which, in turn, would decrease the mean electron density within the particles.

To further examine the effect of GNP on the physical structure of the surface-solvent boundary of CC-NPs, we analysed the scattering patterns with a modified Porod law accounting for a core-shell or diffuse interface structure⁶³.

$$I(q) \cdot q^2 = -B + \frac{C}{q^2} \quad \text{Eq. 5}$$

This model allowed us to evaluate the thickness of the interface of the transition layer (i.e., the shell thickness, L_i) using Equation 6:

$$L_i = \sqrt{\frac{12\pi B}{C}} \quad \text{Eq. 6}$$

where C and $-B$ are respectively the slope and intercept of the best linear fit parameters obtained with the modified Porod equation (Equation 5)

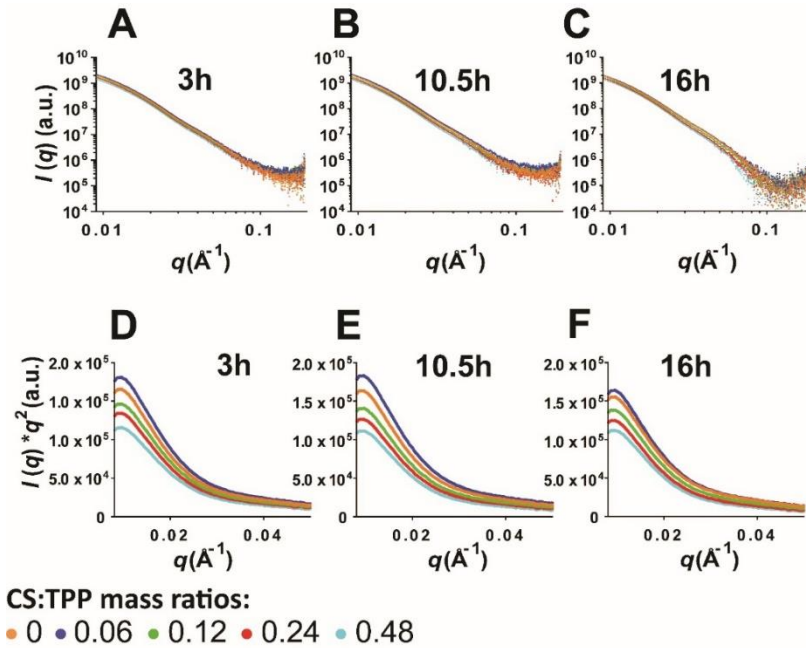


Figure 2. Kratky plots. A-C. SAXS intensity patterns of CC-NPs (1 mg/mL) at varying GNP:CS mass ratios after 3 (A), 10.5 (B) and 16 (C) h of incubation at 37 °C. Data represent the mean of three triplicated treatments in each condition. For the sake of clarity, no error bars are shown. X-axes, q in \AA^{-1} . Y-axes, $I(q)$ in arbitrary units (only shown on the left panel for clarity). D-F. Kratky plots for the curves shown in A-C. Data represent the mean of three replicates. For the sake of clarity, no error bars are shown. X-axes, q in \AA^{-1} . Y-axes, $I(q) \cdot q^2$ in arbitrary units (only shown on the left panel for clarity). GNP:CS mass ratios for panels A-F are colour coded as shown at the bottom of the figure.

Figure 3A-C shows the $I(q) \cdot q^2$ vs. $1/q^2$ plots for CC-NPs with different degrees of GNP crosslinking, after 3, 10.5 and 16 h of incubation, respectively (see also **Figure S4**). We performed regression analysis in the $1/q^2$ range from 2130 to 879 \AA^2 , i.e. in the q range from $2.1 \cdot 10^{-2}$ to $3.4 \cdot 10^{-2} \text{\AA}^{-1}$. Dashed black lines in **Figure 3 A-C** show the fitted $I(q) \cdot q^2$ vs. $1/q^2$ values yielding negative y-axis intercepts, hence suitable to adjustment to the core-shell model (see also **Figure S4**).

Figure 3D represents the evolution of shell thickness over time for the various systems after incubation at 37 °C, as deduced from Equation 6. As shown in the bar diagram, at early incubation times, all the systems, including the one in the absence of GNP, could be fitted adequately to the core-shell model, with estimated average values of shell thickness ranging from ~40 to 55 Å. However, from 10.5 h of incubation onwards and until the end of the experiment, it was only possible to unambiguously apply the core-shell model to CC-NPs with GNP:CS mass ratios between 0.12 and 0.48 (see **Figure S4** and **Table S2**). Interestingly, low GNP:CS mass ratios (i.e. at or below 0.06) ageing for at least 10.5 h at 37 °C, neither induced the formation of diffuse interphase nor a reduction in the intensity of the peak in the Kratky plots (panels **D-F** in **Figure 2**). Thus, there appears to be two steps in NP shell structuration. In the absence of GNP stabilization by crosslinking, an initially present particle shell vanished after extended incubation times (dashed lines in **Figure 3D**. See also **Table S2**). In presence of higher amounts of GNP, however, the thickness of the initial shell increased with incubation time (green and yellow bars in **Figure 3D**). This second phase was both time- and GNP-dependent, reaching a maximum shell thickness of 75.9 ± 20.3 Å after a 16-h incubation, in the case of the 0.48 GNP:CS mass ratio. In addition, for GNP:CS mass ratios greater than 0.06, the intensity of the associated Kratky peaks (**Figure 2D-F**) decreased relative to the no-GNP control, while shell thickness increased (**Figure 3D**). Thus, the results presented in **Figures 2D-F** and **3D** might reflect two sides of the same process of structural evolution, in that the reduced contrast factors caused by higher levels of GNP crosslinking could also be linked to the formation of thicker shells during extended incubation, as deduced by the modified Porod law.

5.4.3. Physicochemical characterization of prototype IC-NPs and CC-NPs

NP isolation via centrifugation followed by resuspension in glycerol has been reported as a critical step in the fabrication of CS-TPP NPs⁶⁵. Prior to isolation, the parent batch of IC-NPs had an average diameter of 150 ± 50 nm and a low PDI of ~0.1-0.2 (**Figure 4A**

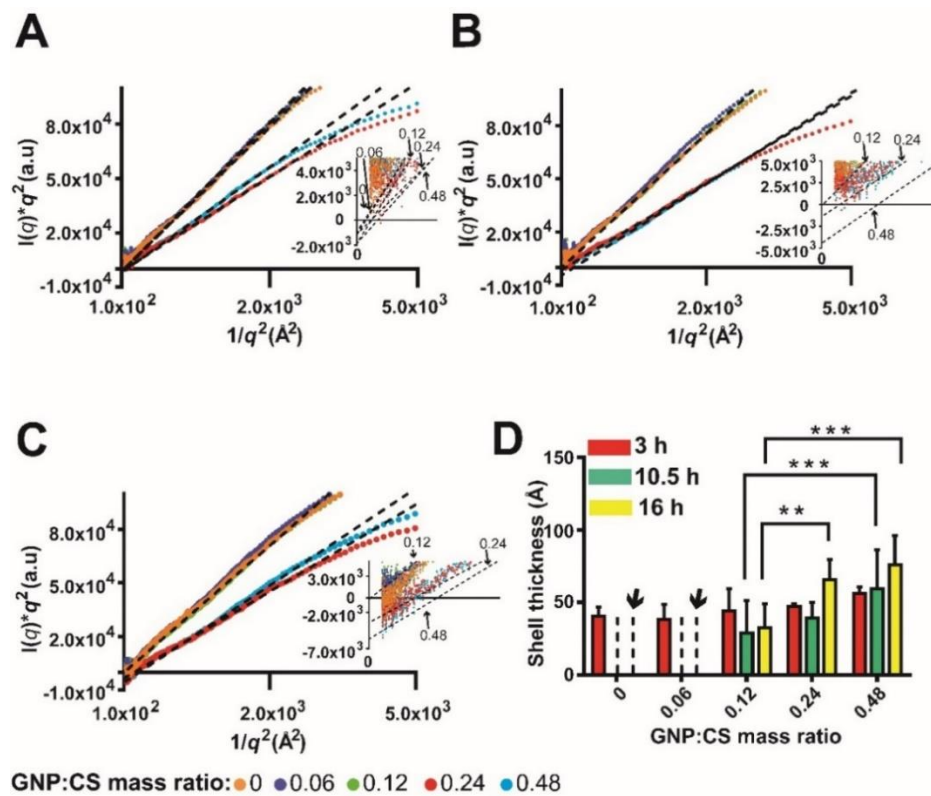


Figure 3. Determination of the width of the diffuse interface of CC-NPs at varying GNP:CS mass ratios

Legend Figure 3: Determination of the width of the diffuse interface of CC-NPs at varying GNP:CS mass ratios. A-C. $I(q)q^2$ vs. $1/q^2$ plots (dotted lines) obtained at the GNP:CS mass ratios indicated by colour key shown at the figure bottom. X-axes, $1/q^2$ in \AA^2 . Y-axes, $I(q)*q^2$ in arbitrary units. NPs were incubated for 3 (A), 10.5 (B) and 16 (C) h at 37 °C. To estimate the width of the transition layer, the Porod's asymptotic behavior was studied according to Equation 5⁶⁴, where C and -B are the intercept and slope of the linear, best-fit parameters of the modified Porod treatment (see Equation 5 and 6), respectively. Dashed black lines show the best linear fits from which the slopes were calculated. Data represent the values of a single, representative experiment out of a total of three replicates (but see **Figure S4**). Only data with linear fits yielding Y-axis intercepts at negative $I(q)*q^2$ values, hence suitable to be described by Equation 6, are shown (but see **Table S2** and **Figure S4**). The $1/q^2$ region ranging from 0 to $1 \times 10^2 \text{\AA}^2$ was not shown in main plot for clarity. The insets show a zoomed-in view of the Y-intercept region. Data points lying in the $1/q^2$ region ranging from 0 to 50 were omitted in insets for clarity. The identity of the linear fits is indicated in insets. D. Calculated shell thickness after incubation at 37 °C according to Equation 6⁶⁴. Arrowheads indicate ambiguities due to insufficient experimental data (see **Table S2** and **Figure S4**). In such cases, the clear trend displayed by the data represented in **Table S2** was used to infer the behavior displayed in this figure. X-axis, GNP:CS mass ratio values, Y-axis: shell thickness in \AA . Data represent the average value and standard deviation of the three replicates mentioned above. Statistical comparisons between treatments at different incubation times were made with GraphPad Prism 6 using two-way ANOVA with multiple-comparison Tukey test (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

and B). Following isolation, IC-NPs were highly sensitive to the process of resuspension and tended to aggregate. This behavior resulted in important differences in the Z-average sizes and PDI values of isolated IC-NPs, relative to their parental counterparts (**Figure 4A** and **B**). As a result, isolated IC-NPs were characterized by wider DLS-NIBS size distribution plots, indicating that they possessed much larger average hydrodynamic diameters than those of their parental NPs, cf. $\sim 334 \text{ nm}$ vs. $150 \pm 50 \text{ nm}$ (lower left panel in **Figure 4C**). The PDI values increased from ~ 0.1 - 0.2 to ~ 0.3 - 0.7 (**Figure 4B**). Notably, the size distribution was highly batch dependent, often displaying multimodal character and signals of the presence of extremely large particles of unresolvable size (lower right panel in **Figure 4C**, see also **Figure S5**). On the contrary, isolated CC-NPs systematically retained the original average diameter and PDI values of their parental NPs (size: 151 ± 7 , PDI: 0.1 - 0.2) (**Figure 4A-C**). When the average diameter of the individual preparations was considered, isolated CC-NPs were found to be even better behaved than parental IC-NPs (cf. panels **A** and **B** in **Figure S5**). Thus, GNP co-crosslinking provides an avenue to

circumvent the tendency of IC-NPs to aggregate after isolation, effectively resulting in NPs with a narrow diameter range. The ζ -potential of isolated IC-NPs and CC-NPs was estimated in two different saline environments, namely 1 mM KCl and 85 mM NaCl. The first saline environment, with low ionic strength and neutral pH, is customarily employed by our group^{66–71} and others^{72–74} to compare the ζ -potential values of CS-based NPs. The second saline environment, 85 mM NaCl, is the one chosen for the fabrication of IC-NPs and CC-NPs, as described above. **Figure 4D** shows the mean ζ -potential of the isolated IC-NPs and CC-NPs in both environments. In 1 mM KCl, IC-NPs displayed a ζ -potential of $+25.4 \pm 5.5$ mV. Under these conditions, covalent crosslinking with GNP slightly reduced the surface charge, yielding a ζ -potential value of $+20.1 \pm 2.3$ mV. The overall reduction in ζ -potential after GNP co-crosslinking of CS-TPP NPs was the expected consequence of the covalent interaction of GNP with CS, yielding secondary amines in the neutral state⁷⁵. The same trend was observed in 85 mM NaCl, although the measured ζ -potential values were considerably lower in this medium, namely $+16.4 \pm 0.8$ mV and $+10.5 \pm 0.9$ mV for IC-NPs and CC-NPs, respectively. Reduction of the ζ -potential at 85 mM NaCl was expected due to increased salt-induced screening of charges at higher ionic strength, together with the known strong dependence of surface charge densities on ionic strength (Debye-Hückel prediction)^{13,56,76}. Along these lines, Huang and Lapitsky⁵⁶ showed that despite the lower ζ -potential observed at higher ionic strength, increased colloidal stability can be achieved, likely due to salt-mediated inhibition of bridging flocculation.

5.4.4. CC-NPs remain stable during incubation in biological medium

To evaluate the physical stability of IC-NPs and CC-NPs in microbiological assays, we followed the evolution of particle size during incubation in biological medium. To this end, we prepared 1/50 dilutions of IC-NPs and CC-NPs in supplemented M9 minimal medium, pH 6.9 ± 0.05 (see Materials and Methods), incubated the samples at 37 °C, and recorded the DLS size distributions at specific

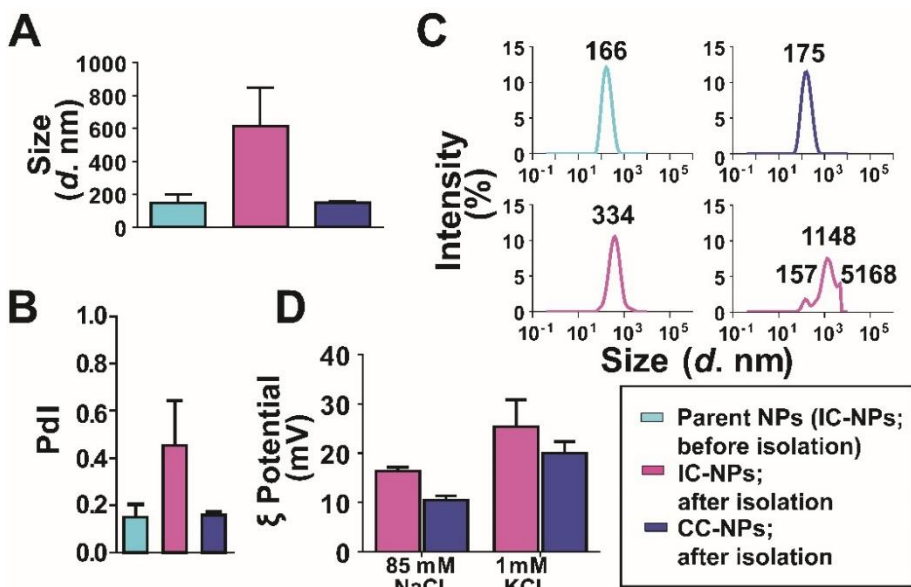


Figure 4. Physico-chemical characterization by DLS-NIBS of the parent IC-NP batch (before isolation) and of isolated IC-NPs and CC-NPs. **A.** Z-average size (diameter) of NPs. Data represent the average value and standard deviation of six (parent NPs) to nine (isolated IC-NPs and CC-NPs) replicates. For simplicity, labeling has been omitted on X axis but the plotted bars NPs are colour coded as indicated in box. Y-axis, Z-average, NP diameter in nm. **B.** Mean Pdl for the three NP systems of A. X axis and colour coding as in A. Y-axis, average Pdl values. Colour coded as in A. **C.** Representative DLS intensity size (diameter) distribution plots for the three NP systems of A (see also **Figure S5**). In the case of isolated IC-NPs, two representative plots are shown. Colour coded as in A. X-axis, average diameter in nm. Y-axis DLS intensity in percentage. **D.** Mean ζ -potential for isolated IC-NPs and CC-NPs in 85 mM NaCl and in 1 mM KCl. Y-axis, average ζ -potential values in mV. X axis and colour coding as in A. All measurements were conducted at 25 ± 0.2 °C.

time points, namely 0, 2, 4 and 6 h. The medium and the incubation conditions were not arbitrary, as they mimic the conditions of a typical bioassay with the *E. coli* biosensor. Our previous experience with IC-NPs had revealed that these NPs are rather unstable in most biological media²⁷. In addition, other authors have reported precipitation of CS NPs upon mixing with bacterial broth⁷⁷. Not surprisingly, DLS-NIBS analysis revealed that IC-NPs were highly unstable in supplemented M9 minimal medium, as shown by the impossibility of obtaining satisfactory intensity-based size distributions, even at time zero (**Figure**

5A). However, we did not detect any visible aggregation upon inoculation and incubation of IC-NPs in bacterial broth. Of note, the DLS-NIBS correlograms of IC-NPs in the culture medium showed a delayed decay in the correlation curves characteristic of large particles (Figure 5C). By contrast, CC-NPs were completely stable in M9 minimal medium throughout the duration of the experiment and they showed monomodal size distributions, and monotonic intensity correlation functions up to $\sim 10^3 \mu\text{s}$ (Figure 5B and D, respectively).

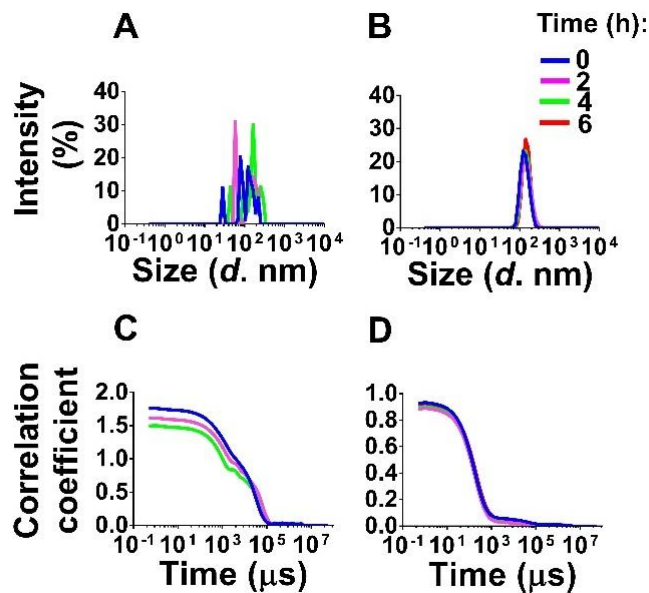


Figure 5. Stability of IC-NPs and CC-NPs in M9 minimal medium. A-B. DLS size distribution plots for IC-NPs (A) and CC-NPs (B). Colour key indicates the incubation time in supplemented M9 minimal medium at 37 °C. X-axes, average diameter in nm. Y-axes, DLS intensity in percentage. C-D. DLS correlograms of IC-NPs (C) and CC-NPs (D) at different incubation times. X-axes, time in μs . Y-axes, average correlation coefficient. Colour coded as in A-B. Data represent de mean DLS values of three replicates. For the sake of clarity, error bars are not included.

5.4.5. Microbiological assays

The *E. coli* reporter strain carrying the genetic device BbaT9009 (see Experimental Section) functions as an AHL receiver whose response (GFP expression) can be measured by the emitted fluorescence (**Chapter 1** and ⁵²). We used this strain as a biosensor to analyze the antimicrobial and QQ activity of IC-NPs and CC-NPs.

5.4.5.1. Evaluation of the antimicrobial and QQ activity of the IC-NPs and CC-NPs:

As a first approach to characterize the bioactivity of IC-NPs and CC-NPs with the *E. coli* fluorescent QS biosensor, we tested the effects of fixed NP concentrations on cell growth kinetics. When growth rates values are considered (**Figure 6A** and **B**), a clear antimicrobial effect of both types of NPs is observed. In both cases, dose dependence is conspicuous at low to medium NP concentrations and peters out at higher dosages. The growth curves of **Figure 6C** and **D** show that for the two treatments, low NP concentrations (IC-NPs: up to 12.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$; and CC-NPs: up to 13.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), yielded growth kinetics that were similar to those of controls, despite the clear existence of a slight NP effect (see below). In contrast, treatment with higher NP concentrations resulted in significantly decreased growth rates. Significant experiment-to-experiment variation was evident in these assays, as indicated by the large standard deviations shown in **Figure 6C** and **D**. Additional anomalies in the form of “shoulders” were also apparent in some of the curves (downward arrows in **Figure 6C** and **D**). For clarity, we show the individual time/OD₆₀₀ traces in **Figures S6-S9** (main panels). In the case of IC-NPs, an initial phase of growth can be observed at which the behavior of the treated biosensor cultures was indistinguishable from that of the untreated controls at all IC-NP concentrations (first 100-150 min) (main panels in **Figures S6** and **S7**). Following this phase, OD₆₀₀ traces from treated cultures deviate from those of controls towards lower growth rates (main panels in **Figures S6** and **S7**). At the two lowest IC-NP concentrations, the three biological replicates deviated from the controls to different degrees and displayed sharp anomalies (main panels **B** and **C** in **Figures S6** and **S7**),

resulting in the shoulders shown in **Figure 6C**. The presence of anomalies was much more accused in the case of CC-NPs (main panels

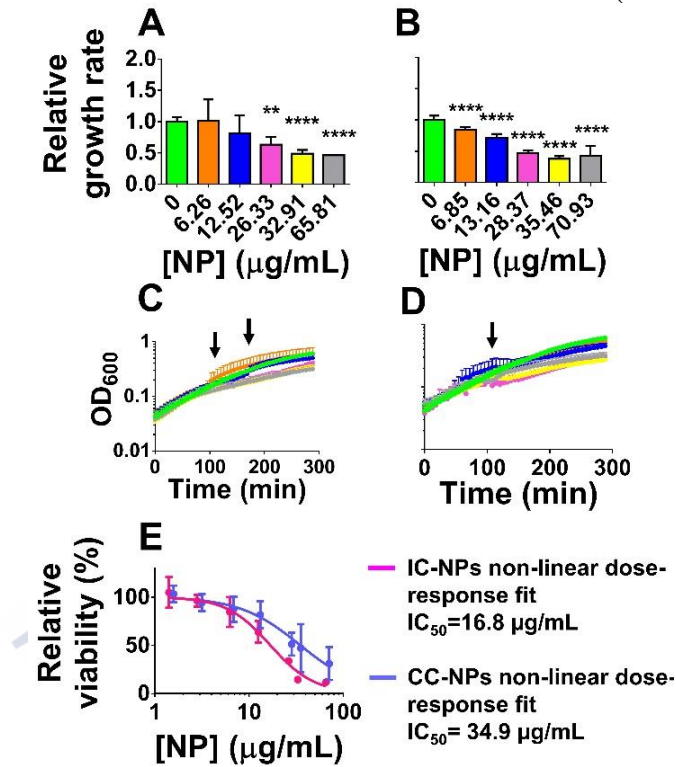


Figure 6. Effect of NP treatment on the growth of the *E. coli* biosensor. A-B. Effect of treatment with IC-NPs (A) and CC-NPs (B) on the biosensor's growth rate, relative to untreated controls. X-axes, NP concentration in $\mu\text{g/mL}$, determined as described in Materials and Methods. Y-axes, average relative growth rate values. P values are labeled as follows: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p \leq 0.0001$. C-D. OD_{600} plots of the *E. coli* biosensor treated for 300 min with varying doses of IC-NPs (C) and CC-NPs (D). Downward arrows in C and D show growth anomalies in the form of "shoulders" observed at some NP concentrations. Data represent the mean and standard deviation of two independent experiments with three biological replicates each. For the sake of clarity, only one-sided error bars are shown. Curves are colour coded to the NP concentrations shown in A and B. X-axis, time in minutes. Y-axis, average OD_{600} values in log scale. E. Viability (%) of *E. coli* cultures pre-treated with IC-NPs and CC-NPs relative to that of control cells, as a function of NP concentration (see Experimental Section). Dots represent the experimental data, and solid lines represent the best-fit to the non-linear dose-response function (GraphPad version 6.00, GraphPad Software, La Jolla California USA), used to calculate the IC_{50} values for the two types of NPs (see Experimental Section). Data represent the mean and

standard deviation of two independent experiments with three biological replicates each. X-axis: NP concentration in $\mu\text{g/mL}$. Y-axis: average relative viability in percentage.

in **Figures S8** and **S9**). This, together with a much higher degree of experimental variability (cf. main panels in **Figures S8** and **S9**), made these growth results much harder to interpret than those of IC-NPs.

Next, we attempted to monitor the toxicity of our NPs by means of a survival assay. Since our previous experience with CS nanocapsules showed that they could bind to bacterial cells and promote cell aggregation⁴⁹, we decided that a simple colony-counting method could fail to provide a reliable estimate of the fraction of viable cells after treatment with our NPs. Instead, we decided to monitor the growth of the fraction of viable cells remaining after exposure to the NPs^{78,79}. With this in mind, we pre-treated the cells for 5 h with various doses of IC-NPs and CC-NPs in M9 minimal medium, after which the cells were diluted 1:10 in NP-free, fresh broth and incubated for a further 5 h. We then plotted the OD_{600} values in terms of percentage of cell viability vs. NP concentration and fitted the resulting curves to a non-linear dose-response function to estimate the IC_{50} values for both IC-NPs and CC-NPs. As shown in **Figure 6E**, IC-NPs showed an IC_{50} value ($\text{IC}_{50} = 16.8 \mu\text{g/mL}$) that was two-fold lower than that of CC-NPs ($\text{IC}_{50} = 34.9 \mu\text{g/mL}$). The higher toxicity of IC-NPs relative to CC-NPs indicates that GNP co-crosslinking reduces the antimicrobial activity of the former NPs.

Next, we analyzed the QQ activity of our NPs by measuring their ability to interfere with the biosensor's QS-induced fluorescence (see Materials and Methods). Despite the noted differences in the apparent growth rates, an overall strong reduction of end-point, OD_{600} -normalized fluorescence ($\text{FI}/\text{OD}_{600}$) was clear for most NP concentrations (**Figure 7A** and **B**). The effect was significantly more pronounced for IC-NPs than for CC-NPs (cf. **Figure 7A** and **B**). Panels **C-F** of **Figure 7** show the average $\text{FI}/\text{OD}_{600}$ traces from two independent experiments for both IC-NPs and CC-NPs (the individual traces are shown in insets in **Figures S6-S9**). In keeping with the endpoint results, a strong reduction of normalized fluorescence was observed at all concentrations of IC-NPs (**Figure 7C** and **D**). Notably,

maximal FI/OD₆₀₀ reduction was achieved at the lowest NP concentration, and no additional reduction could be afforded by higher concentrations (**Figures 7C and D**). Moreover, despite the noted presence of large standard deviations in OD₆₀₀ values, the error



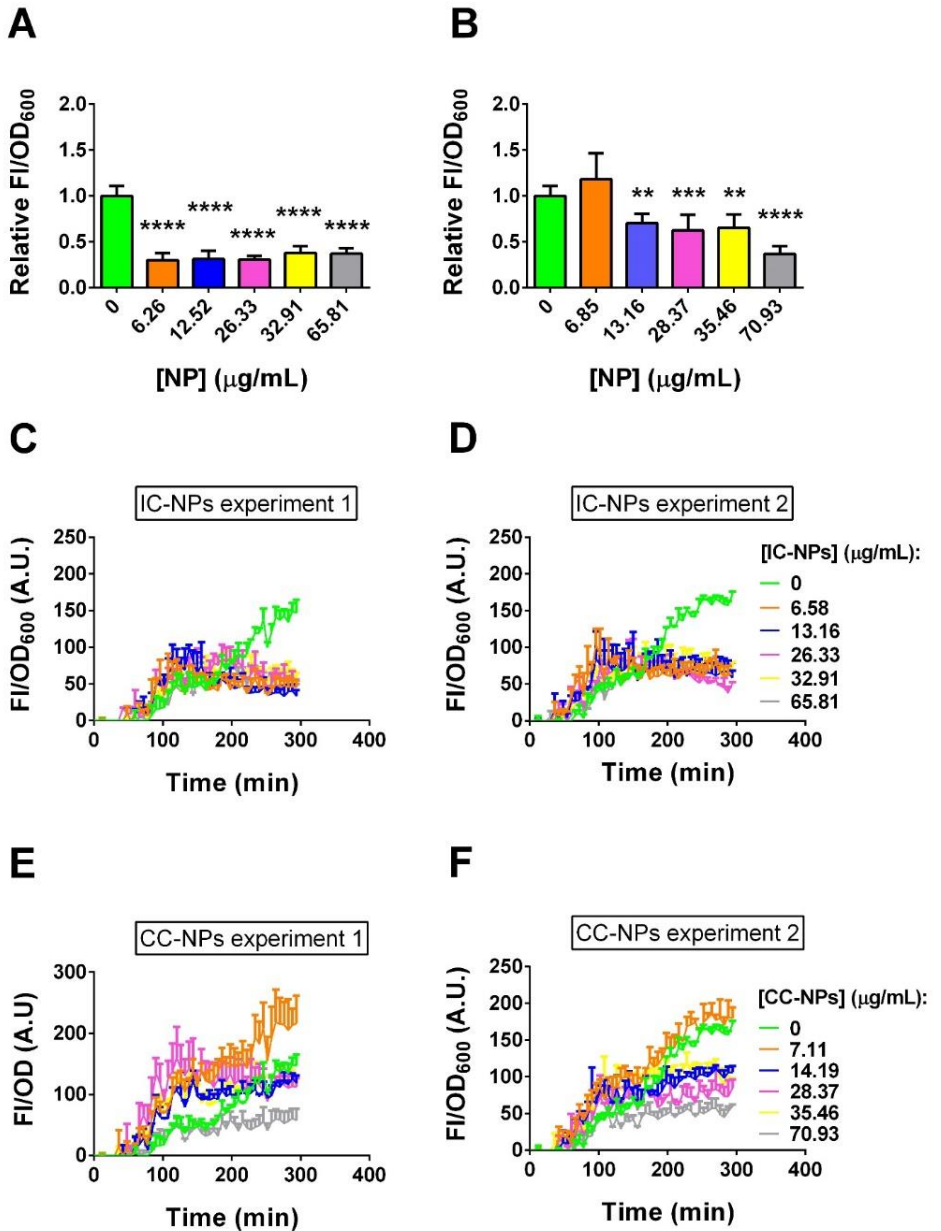


Figure 7. Effect of treatment with IC-NPs and CC-NPs on the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor.

Legend Figure 7: Effect of treatment with IC-NPs and CC-NPs on the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor. A-B. End-point FI/OD₆₀₀ response of the *E. coli* biosensor after treatment with various concentrations of IC-NPs (A) and CC-NPs (B), relative to that of control cells. Data represent the mean and standard deviation of two independent experiments with three biological replicates each. P values are labeled as follows: ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$. X-axes, NP concentration in $\mu\text{g/mL}$. Y-axes, average relative FI/OD₆₀₀ values. C-F. Effect of various concentrations of IC-NPs (C, D) and CC-NPs (E, F) on the FI/OD₆₀₀ response of the *E. coli* biosensor in two independent experiments (C, D and E, F, respectively). Data represent the average and standard deviations of three biological replicates per experiment. For the sake of clarity, only one-sided error bars are shown. The traces of C and E are colour coded as in D and F, respectively. X axes: Time in minutes. Y axes: FI/OD₆₀₀ in arbitrary units.

associated to FI/OD₆₀₀ in the same experiments was much lower (cf. **Figure 6C** to panels **C** and **D** of **Figure 7**), supporting the existence of a strong QQ effect mediated by these NPs. Again, large experimental differences in the case of CC-NPs, made it difficult to interpret the FI/OD₆₀₀ results at all NP concentrations, except for the highest (**Figure 7E** and **F**). These results prompted us to disregard CC-NPs as reliable QQ-promoting NPs.

Importantly, the fluorescence measurements used in the QQ bioassays have been normalized to cell density (FI/OD₆₀₀)^{80,81}, meaning that a simple interpretation in which the observed antimicrobial effect might be responsible for the fluorescence decrease cannot hold. To explain the sharp reduction of normalized FI/OD₆₀₀ observed at all concentrations of IC-NPs, one must claim that the decrease in fluorescence must be of greater magnitude than the OD₆₀₀ drop.

The presence of anomalies in the form of “shoulders” in some of the growth curves (downward arrows in **Figure 6C** and **D** and **Figures S6-S9**) is also relevant in this regard. While we have not explored further these growth anomalies in the context of the NPs described in this manuscript, similar irregularities were described by our group in the case of CS nanocapsules⁴⁹. The effect was due to the so called “stoichiometric ratio” of nanocapsules/bacteria, i.e. a particular time during growth in the presence of these particles, at which the electrical charge of the bacterial cell wall was compensated by bound nanocapsules, resulting in bacterial aggregation⁴⁹. Hence, it is possible that part of what we interpreted here as growth reduction might have

been simply caused by anomalies in the OD₆₀₀ readings due to cell aggregation⁸² and that the antimicrobial effect measured in **Figure 6E** might have been overestimated.

5.5. DISCUSSION

Despite the initial high expectations for CS micro- and nano-particles crosslinked with TPP, their colloidal stability under biologically relevant conditions remains a major shortcoming towards their wider use as broad-spectrum bio-nanomaterials^{16,83–86}. Indeed, in this study, IC-NPs had a tendency to increase in size and polydispersity after isolation by centrifugation (**Figure 4**). This undesired attribute of IC-NPs was further complicated by their batch-dependent behavior (**Figure S5**). The tendency of TPP-crosslinked CS NPs to aggregate after centrifugation is well known⁶⁵. For this reason, the standard fabrication method used in our group and by others includes the use of a glycerol bed during centrifugation to avoid aggregation^{87,88}. Other laboratories have resolved this issue by resorting to aggressive methods of aggregate disruption, such as ultrasonication^{89,90}. Aggregation could be due to the reported tendency of unmodified chitosan particles to produce vortex-resistant aggregates as a result of strong inter- and intramolecular hydrogen bonding^{54,91}. Tanaka et al.⁵⁴ also mentioned the existence of strong hydrophobic interactions responsible for the aggregation of CS. In contrast to IC-NPs, CC-NPs tolerated well their manipulation during the process of centrifugation and resuspension (**Figure 4**). Covalent crosslinking with GNP could prevent the formation of undesired hydrogen bonds and/or hydrophobic interactions, thus, reducing the tendency of IC-NPs to aggregate. Regardless of the mechanism, GNP crosslinking succeeded in providing a formulation capable of producing robust NPs that can be used as a chassis for down-the-line applications.

We examined the effect of GNP on the physical structure of the CC-NPs at the particle's surface-solvent boundary by using a modified Porod law accounting for the existence of a core-shell structure⁶³. This made it possible to evaluate the shell thickness of our NPs in the 1-50 nm resolution range (**Figure 3**). We observed that the behaviour of all the NP systems, even the ones lacking GNP, could be adequately fitted

to the core-shell model at early incubation times at 37 °C (**Figure 3D**). This is in agreement with previous reports on the core-shell structure of TPP-crosslinked NPs imaged by transmission electron microscopy (TEM), showing differential structure density between the outer and inner NP boundaries^{16,92}. In contrast, at 37 °C and at incubation times longer than 10.5 h, only NPs formed with GNP:CS mass ratios between 0.12 and 0.48 were successfully modelled by the core-shell model (**Figure 3D**). This effect was clearly dependent on the incubation step, as IC-NPs are stable at the storage temperature (5 °C)¹⁶. The disruption of the GNP-independent core-shell structure of IC-NPs at physiological temperature might imply that the organization of the external boundaries of these NPs (and of insufficiently GNP-crosslinked CC-NPs, see 0.06 GNP:CS mass ratio in **Figure 3D**), either fluctuates more extensively or suffers from instability upon long incubation at 37 °C. Indeed, we have shown evidence of noticeable reduction in shell thickness at short to medium incubation times, followed by a consistent increase in thickness at longer times (**Figure 3D**). The shrinkage at low incubation times might be related to restructuring, upon covalent crosslinking with GNP, of the initially swollen and loose, outermost CS strands, into a more compacted conformation. On the other hand, the increase in shell thickness observed at longer times appears to be consistent with additional macromolecular organization of the multi-bridged CS-GNP crosslinked networks, a process that is known to occur at a slow rate in the later stages of chemical crosslinking with GNP^{43,44}. In such scenario for the evolution of the structure of CS:TPP crosslinked nanoparticles, it becomes clear that the crosslinking reaction of GNP strongly impacts the surface of CC-NPs, relative to their GNP-non-crosslinked counterparts. Other authors have also reported evidence of enhanced mechanical strength, improved chemical stability and reduced swelling behaviour of core-shelled, CS-based microcapsules covalently crosslinked at GNP:CS mass ratios around 0.1³⁸. Our discovery that GNP co-crosslinking of IC-NPs led to the stabilization of a pre-existing, but labile, core-shell structure, likely explains the improved physico-chemical properties displayed by CC-NPs.

An unexpected result during the characterization of our NPs was the discrepancy between DLS-NIBS analysis, which resulted in particles with hydrodynamic diameters of ~ 200 nm (**Figure 1F**), and Kratky-plot and Porod-Debye plot analysis of SAXS data, which yielded an R_g of ~ 17 nm (**Figure 2D-F**). While there might exist a subset of CC-NPs in our preparations with diameters significantly smaller than the DLS-determined value of ~ 200 nm, the consistent behaviour displayed during DLS-NIBS (**Figure 5**) indicates that smaller particles, if existing, are expected to be minoritarian. We prefer to explain the apparent discrepancy between SAXS and DLS-NIBS in the context of the “raspberry-like” model of NP ultrastructure proposed by Huang and Lapitsky for TPP-crosslinked CS-NPs⁹³. Accordingly, we propose that the size of our NPs results from the aggregation of primary, smaller nanoparticles into larger objects with sizes ~ 200 nm.

The superior physico-chemical features of CC-NPs, together with their higher stability under biological conditions (**Figure 5**) and lower toxicity (**Figure 6**) makes these NPs better suited for microbiological work than IC-NPs. For example, CC-NPs constitute a promising chassis for the design of smart drug delivery nanocarriers under conditions in which QQ is not desired. Since the suitability of GNP crosslinked, CS-based matrices for drug delivery and controlled release has been amply demonstrated^{32,35–39,75,94–96}, the results presented here are in line with the existence of a high potential for our CC-NPs to bear multifunctional structures, respond to external stimuli, and/or to be combined with adjuvant biomolecules.

CS has recently been proposed as a new generation antimicrobial with the capacity to control a broad spectrum of microorganisms, including antibiotic resistant pathogens^{47,48,97}. Raw CS has been shown to interfere with QS responses and biofilm formation in various bacterial pathogens^{47,48}. However, the potential of CS-based nanomaterials to directly inhibit QS has only recently been studied. Our group has shown that CS nanocapsules can bind to bacterial cells, promote cell aggregation and attenuate the QS response of the *E. coli*-based biosensor⁴⁹. Here, we have also shown that both IC-NPs and CC-NPs exhibit antimicrobial and QQ-like properties, albeit in the case of CC-NPs, consistent QQ activity is only observed at high NP

concentrations (**Figures 6 and 7**). The results of **Figure 6 and 7** are in agreement with the existence of two different effects of low-to-medium concentrations of IC-NPs on the biosensor, namely a slight antimicrobial effect and a much stronger QQ effect. The surprisingly strong and stable QQ activity of IC-NPs stands in stark contrast to their erratic physicochemical properties. Thus, this work, together with our previous report ⁴⁹, indicate that certain CS-based nanomaterials, such as IC-NPs or CS nanocapsules, satisfactorily maintain the QQ activity of free CS. This occurs, despite the vast size of these nanomaterials, in comparison to CS, and the important structural differences arising from their formulations. Thus, IC-NPs could serve as the chassis for microbiologically relevant CS-NPs capable to interfere with QS. Further work will be required to fully separate the influence of bacterial aggregation resulting from the “stoichiometric effect” ⁴⁹ from the true antimicrobial and QQ activities of IC-NPs. This will likely require a deep understanding of the nature of the interaction between IC-NPs and the cell wall. The results presented here are also clear about the requirement of future efforts towards improving the physicochemical stability of IC-NPs. As such, IC-NPs can be considered as the starting point for the fabrication of NPs with the ability to combine QQ with other functions of interest, thus, providing these particles with the ability to directly alter the normal growth kinetics of bacterial populations in yet unforeseen manners.

Finally, the comparison of IC-NPs and CC-NPs presented here has far reaching consequences for the future design of CS-NPs. Our SAXS analysis indicating the stabilization of a labile core-shell structure upon GNP crosslinking, together with the widely different properties exhibited by IC-NPs and CC-NPs, strongly suggest that modulating the features of the shell during crosslinking could lead to new types of NPs with a variety of interesting properties.

5.6. SUPPORTING INFORMATION

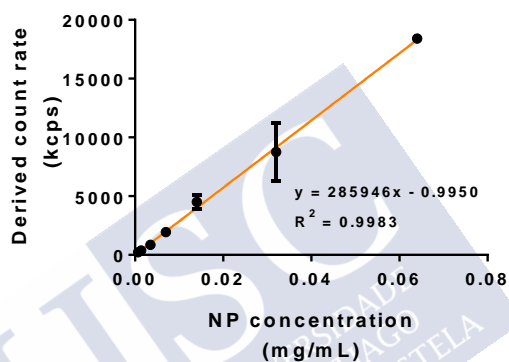


Figure S1. Determination of NP concentration. Calibration of derived count rate (Kcps) against known concentrations of the parent batch of non-isolated CS NPs. The solid dots and error bars represent the mean and standard deviation of three replicates. The solid line represents the best linear fit to the experimental data. X axis: NP concentration in mg/mL. Y axis: derived count rate in kilo counts per second.

Table S1. Microplate design for the fabrication of IC-NPs by ionotropic gelation in water and in 85 mM NaCl. IC-NPs were prepared according to the general ionotropic gelation protocol described by Calvo et al.¹⁵ with minor modifications. To assess the optimal composition required to obtain NPs of average size ≤ 200 nm and a low polydispersity (PDI $\sim 0.1-0.2$), different CS:TPP mass ratios were screened in water and in 85 mM NaCl. To this end, stock solutions of CS (2-3 mg/mL) and TPP (1-1.25 mg/mL) were prepared under both conditions and aliquots of the two components were mixed in a 96-well microplate in order to obtain IC-NPs with varying CS:TPP mass ratios (from 2.67:1 to 9.0:1). Visual appearance of the resulting formulations is coded as follows: S (blue key) = clear solution, O (green key) = Opalescence; A (pink key) = Aggregates.

Code	[CS stock]	[TPP stock]	CS volume	TPP volume	CS mass	TPP mass	Total volume	[CS] _{final}	[TPP] _{final}	CS:TPP	Visual appearance	
	(mg/mL)	(mg/mL)	(μ L)	(μ L)	(μ g)	(μ g)	(μ L)	(mg/mL)	(mg/mL)	mass ratio	in water	in NaCl
1IA	2	1	210	70	420	70	280	1,5	0,25	6,00	S	O
1IB	2	1	192,5	87,5	385	87,5	280	1,375	0,3125	4,40	O	O
1IC	2	1	175	105	350	105	280	1,25	0,375	3,33	A	O
1IIA	2	1,25	210	70	420	87,5	280	1,5	0,3125	4,80	S	O
1IIB	2	1,25	192,5	87,5	385	109,375	280	1,375	0,390625	3,52	A	O
1IIC	2	1,25	175	105	350	131,25	280	1,25	0,46875	2,67	A	A
2IA	2,3	1	210	70	483	70	280	1,725	0,25	6,90	S	O
2IB	2,3	1	192,5	87,5	442,75	87,5	280	1,58125	0,3125	5,06	O	O
2IC	2,3	1	175	105	402,5	105	280	1,4375	0,375	3,83	O	O
2IIA	2,3	1,25	210	70	483	87,5	280	1,725	0,3125	5,52	S	O
2IIB	2,3	1,25	192,5	87,5	442,75	109,375	280	1,58125	0,390625	4,05	O	O
2IIC	2,3	1,25	175	105	402,5	131,25	280	1,4375	0,46875	3,07	A	O
3IA	2,6	1	210	70	546	70	280	1,95	0,25	7,80	S	S
3IB	2,6	1	192,5	87,5	500,5	87,5	280	1,7875	0,3125	5,72	O	O
3IC	2,6	1	175	105	455	105	280	1,625	0,375	4,33	O	O
3IIA	2,6	1,25	210	70	546	87,5	280	1,95	0,3125	6,24	S	O
3IIB	2,6	1,25	192,5	87,5	500,5	109,375	280	1,7875	0,390625	4,58	O	O
3IIC	2,6	1,25	175	105	455	131,25	280	1,625	0,46875	3,47	A	O
4IA	3	1	210	70	630	70	280	2,25	0,25	9,00	S	S
4IB	3	1	192,5	87,5	577,5	87,5	280	2,0625	0,3125	6,60	O	O
4IC	3	1	175	105	525	105	280	1,875	0,375	5,00	O	O
4IIA	3	1,25	210	70	630	87,5	280	2,25	0,3125	7,20	S	S
4IIB	3	1,25	192,5	87,5	577,5	109,375	280	2,0625	0,390625	5,28	O	O
4IIC	3	1,25	175	105	525	131,25	280	1,875	0,46875	4,00	O	O

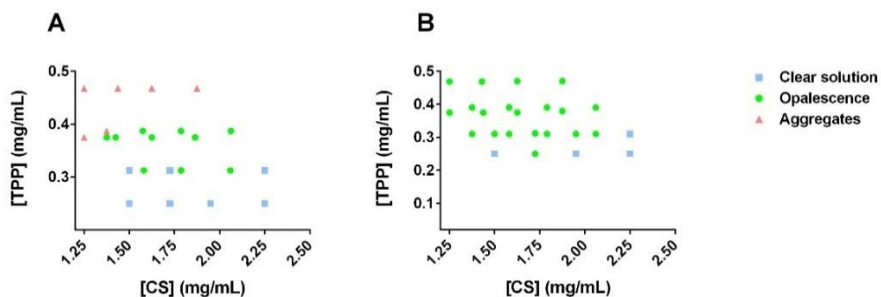


Figure S2. Visual appearance of the CS-TPP formulations, relative to the final concentration of CS and TPP. IC-NPs were prepared in a microplate, in water (A) and 85 mM NaCl (B). Cyan squares = clear solution; green circles = opalescence; pink triangles = aggregates. X axes, CS concentration in mg/mL. Y axes, TPP concentration in mg/mL.

5.6.1. Additional notes on the UV-VIS spectroscopy analysis of the crosslinking reaction between IC-NPs and GNP

The formation of blue pigment via CS crosslinking with GNP is attributed to the oxygen-radical-induced polymerization of GNP and the dehydrogenation of an intermediate compound that occurs once the first series of crosslinking reactions take place^{39,43,44,75}. **Figure S3A** illustrates the evolution of the intensity of blue color at increasing GNP:CS mass ratios during the formation of CC-NPs. **Figure S3B** shows the time-course evolution of the absorbance at $\lambda=570$ nm, which was proportional to the concentration of yellow-bluish pigment formed as a by-product of the crosslinking reaction of CS and GNP at a GNP:CS mass ratio of 0.24:1. This was the first evidence that the crosslinking reaction occurred during the conversion of IC-NPs to CC-NP structure. Notice in the plot that the A_{570} intensity increased linearly during the first 50 h and that no stationary state was observed up to 100 h of incubation, even though the slope of the curve was slightly reduced after 50 h. **Figure S3C** illustrates the full UV-VIS spectrum 48 h after the GNP-crosslinking reactions of CS in solution and the GNP-dependent conversion of IC-NPs into CC-NPs at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1. The crosslinking reaction of CS with GNP has been reported to exhibit a characteristic increase in the intensity of two absorbance peaks centered at $\lambda=240$ and 280 nm (denoted with red and black arrows, respectively in **Figure S3C**)^{43,44,75}. In **Figure S3C**, the intensity

of both peaks was significantly higher in the case of the newly formed CC-NPs than for the CS solution at identical GNP:CS mass ratios and CS concentrations. In principle, the contribution of uncrosslinked NPs to the absorbance in the wavelength range from 200 nm to 300 nm, could account for this overall increase. However, the peaks at 240 and 280 were replaced by a single peak at $\lambda=325$ nm in the UV-VIS spectrum of control, uncrosslinked IC-NPs, thus ruling out the idea that uncrosslinked NPs could contribute to the 240 and 280 peaks. **Figure S3D** shows the time-course evolution of the crosslinking reaction of CS in solution (dashed lines) and of IC-NPs (solid lines) upon addition of varying GNP concentrations. Again, the traces on the A_{300} -vs.-time plots show that the overall absorbance intensity was invariably higher during the conversion of IC-NPs into CC-NPs than during GNP-crosslinking of CS in solution at the different GNP:CS mass ratios tested. Clearly, as the GNP:CS mass ratio was increased, the reaction rate increased for both substrates, as could be deduced from the steeper slopes of the A_{300} -vs.-time plots during the first 50 h. The crosslinking reaction for systems with the lowest GNP:CS mass ratio seemed to reach equilibrium after ~ 175 h, whereas at higher GNP:CS mass ratios equilibrium had not been reached yet.

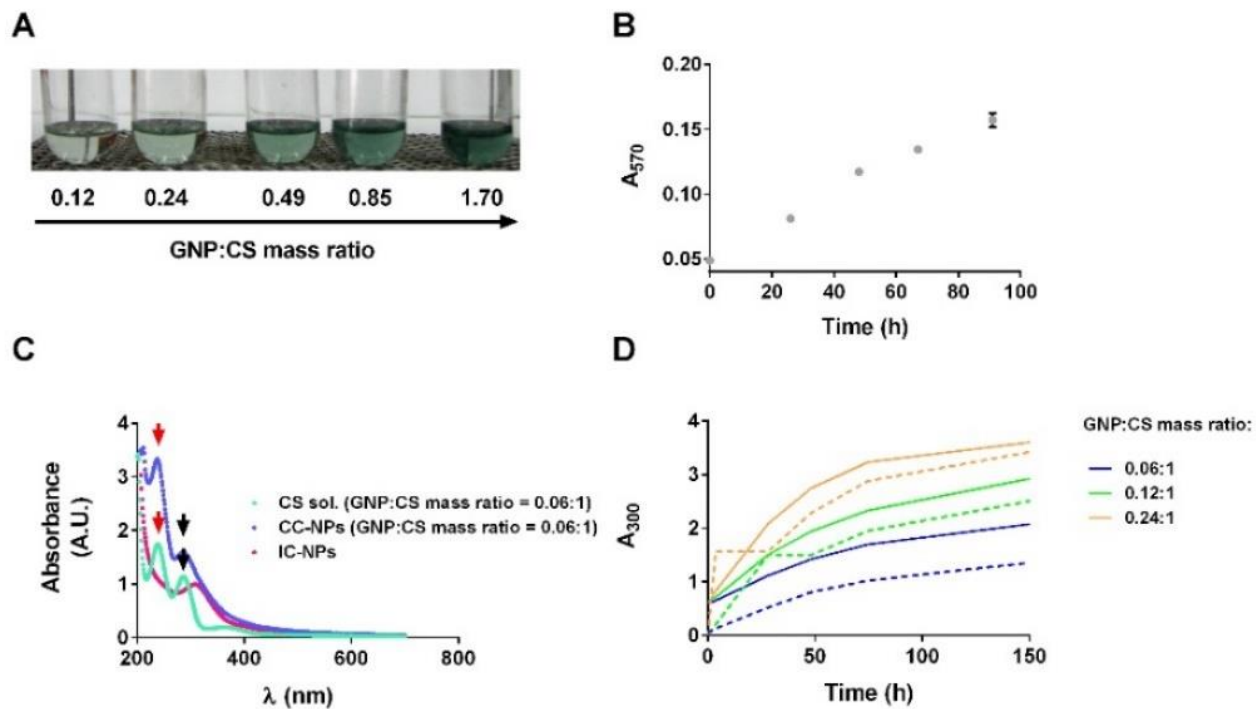


Figure S3. Characterization of the GNP crosslinking reaction

Legend of Figure S3: Characterization of the GNP crosslinking reaction. **A.** Representative images of the formation of blue color from secondary reaction products of the GNP-crosslinking reaction of CS at different GNP:CS mass ratios. **B.** Time-course of the GNP-dependent conversion of IC-NPs into CC-NPs at a GNP:CS mass ratio of 0.24:1. The reaction was monitored by the formation of yellow-bluish color at 37 °C ($\lambda = 570$ nm). X axis: time in hours. Y axis: A_{570} . **C.** UV-VIS scans of GNP-crosslinking of CS in solution (labeled as “CS sol”; GNP:CS mass ratio = 0.06:1) and of IC-NPs for their conversion in CC-NPs (labeled as “CC-NPs”; GNP:CS mass ratio = 0.06:1) after a 48 h incubation at 37 °C. IC-NPs were used as uncrosslinked controls. X axis: absorbance in arbitrary units. Y axis: wavelength in nm. **D.** Time-course evolution of GNP-crosslinking of CS in solution (dashed lines) and of the GNP-dependent conversion of IC-NPs into CC-NPs (solid lines) at various GNP:CS mass ratios. The crosslinking reactions were followed by measuring the absorbance at $\lambda=300$ nm. X axis: time in hours. Y axis: A_{300} . Data in B-D represent the mean and standard deviation of three replicates. For the sake of clarity, error bars are not shown in C and D.



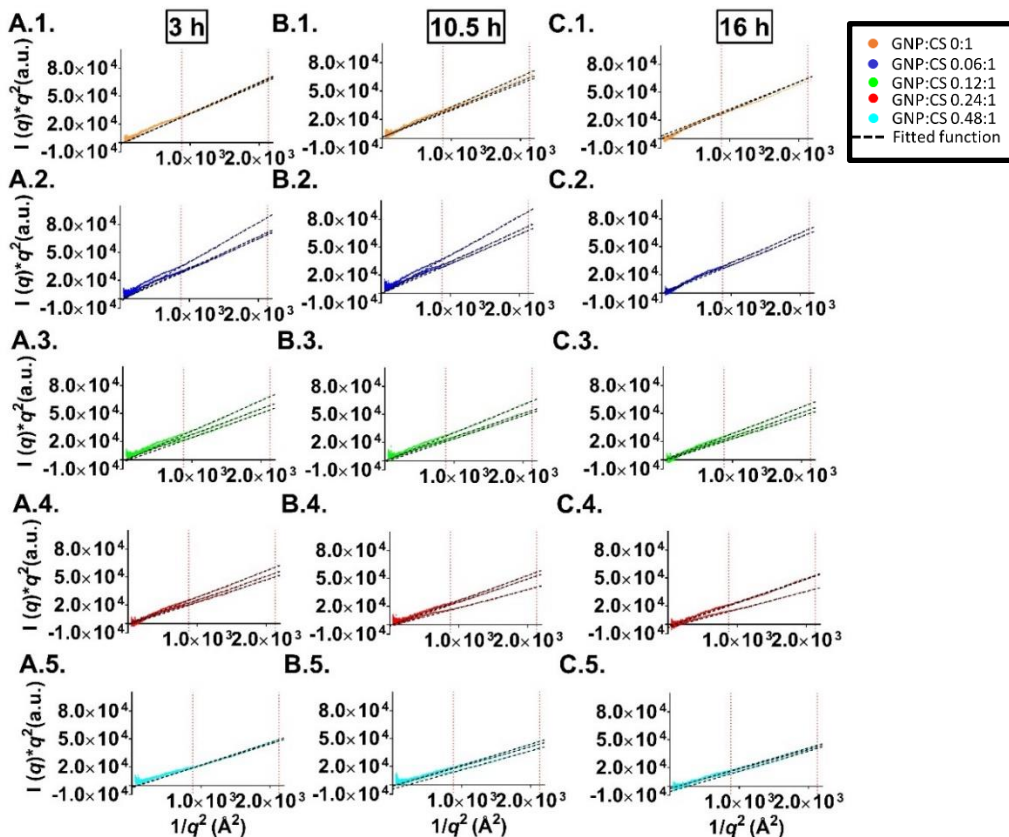


Figure S4. $I(q)q^2$ vs. $1/q^2$ plots used for the determination of the width of the diffuse interface or transition layer present in CC-NPs fabricated at varying GNP:CS mass ratios (coloured, dotted lines). NPs were incubated for 3 (A series), 10.5 (B series) and 16 (C series) h at 37 °C. All three replicates were included in the panels except in panels C.1. and C.2 (see Table S2). The data are color coded to the GNP:CS mass ratios indicated in the bottom box. To estimate the width of the transition layer, the Porod's asymptotic behavior was studied according to Equation 1⁶⁴, where C and -B are the intercept and slope of the linear, best-fit parameters of the modified Porod treatment, respectively (see Equations 4 and 5). Dashed black lines show the linear fits from which the slopes and intercepts were calculated (see Table S2). Vertical, dotted red lines show the data range used for the linear fittings.

Table S2. Main parameters obtained from our modified Porod treatment of SAXS data. The table summarizes the main parameters from the linear fits shown in Figure S4. NP preparations yielding Y-axis intercepts at positive $I(q) \cdot q^2$ values (hence negative B values) are not suitable for adjustment to the core-shell model (Equation 6) and are indicated in red. Dashes indicate the absence of relevant data. The existence of at least two replicates with similar behavior was required to decide whether or not the data could be adjusted to the core-shell model. At GNP:CS mass ratios of 0:1 and 0.06:1 after 16 h, the third replicate was lost.

GNP:CS mass ratio	Incubation time	Slope C	Intercept $-1 \times B$	Shell thickness (\AA) L_i
0.1	3 h			
	replicate 1	31.7	-914.8	33.0
	replicate 2	32.8	-1704.4	44.3
	replicate 3	33.2	-1699.2	43.9
	10 h			
	replicate 1	29.3	1535.0	—
	replicate 2	32.1	1071.3	—
	replicate 3	28.2	1465.0	—
	16 h			
	replicate 1	29.3	2775.3	—
	replicate 2	30.6	-139.3	13.1
	replicate 3	—	—	—
0.06:1	3 h			
	replicate 1	32.9	-1141.7	36.2
	replicate 2	33.7	-780.1	29.5
	replicate 3	42.4	-2753.9	49.5
	10 h			
	replicate 1	33.6	657.3	—
	replicate 2	31.8	32.5	—
	replicate 3	41.6	-459.8	20.4
	16 h			
	replicate 1	30.3	-538.6	25.9
	replicate 2	32.1	327.3	—
	replicate 3	—	—	—

GNP:CS mass ratio	Incubation time	Slope C	Intercept -1 x B	Shell thickness (Å) Li
0.12:1	3 h			
	replicate 1	27.7	-577.9	28.0
	replicate 2	32.8	-1843.6	46.0
	replicate 3	26.3	-2391.8	58.5
	10 h			
	replicate 1	25.3	289.8	—
	replicate 2	30.2	-141.7	13.3
	replicate 3	26.3	-1333.5	43.7
	16 h			
	replicate 1	25.8	-818.2	34.6
	replicate 2	28.4	-175.2	15.2
	replicate 3	24.2	-1472.0	47.9
0.24:1	3 h			
	replicate 1	20.8	-1122.7	45.1
	replicate 2	30.3	-1935.1	49.1
	replicate 3	27.5	-1659.1	47.7
	10 h			
	replicate 1	19.6	-1384.0	51.6
	replicate 2	26.9	-821.5	33.9
	replicate 3	25.0	-708.2	32.7
	16 h			
	replicate 1	19.4	-3414.0	81.4
	replicate 2	25.7	-2043.3	54.8
	replicate 3	25.5	-2514.2	60.9
0.48:1	3 h			
	replicate 1	23.2	-1860.9	54.9
	replicate 2	24.3	-2415.2	61.3
	replicate 3	23.1	-1741.4	53.3
	10 h			
	replicate 1	20.6	-4444.8	90.2
	replicate 2	22.6	-1321.6	47.0
	replicate 3	21.0	-948.9	41.2
	16 h			
	replicate 1	21.7	-5673.0	99.3
	replicate 2	21.8	-2512.4	65.8
	replicate 3	20.9	-2179.7	62.7

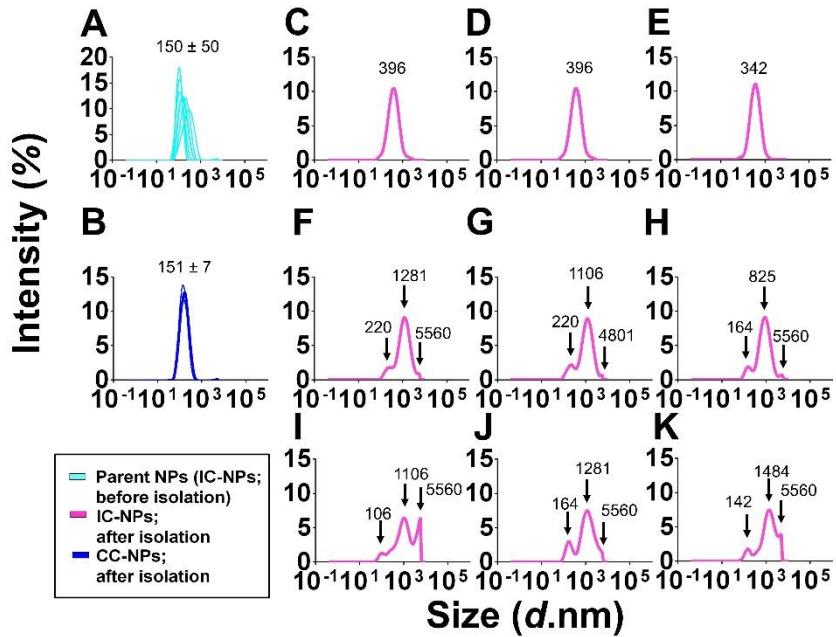


Figure S5. DLS-NIBS size distribution plots of NPs. A. Non-isolated, parent IC-NPs. B. Isolated CC-NPs. C-K., Isolated IC-NPs (C-K). The plots of six (A) and nine (B) replicates are superimposed due to the low variability observed and the average sizes and standard deviations are shown. In the case of isolated IC-NPs (C-K) the size distributions are highly batch-dependent, and replicates are shown independently. The size of the peaks is indicated. X axis: size in nm. Y axis: percentage of intensity.

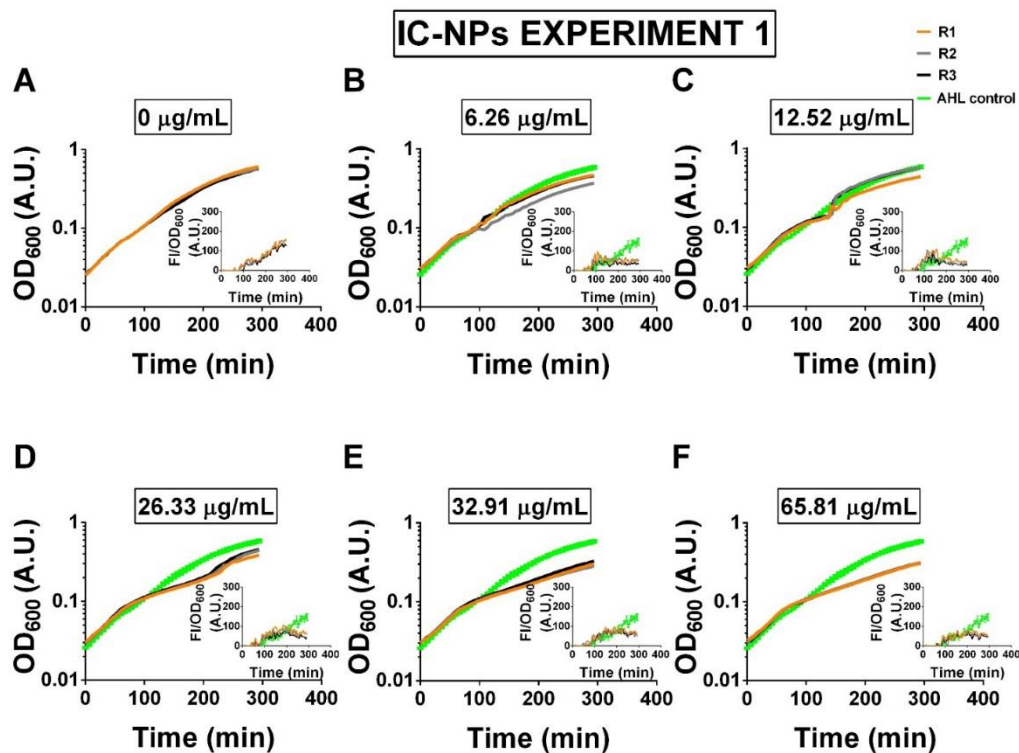


Figure S6. Effect of various concentrations of IC-NPs on the growth and the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor (Experiment 1). The individual traces of three biological replicates (R1, R2, R3) are shown. Main panel: OD₆₀₀ vs. time. Insets: FI/OD₆₀₀ vs. time. Traces are color-coded as indicated in upper-right corner. Green traces in panels B-F represent the mean and standard deviation of the control data shown in panel A and are included for clarity.

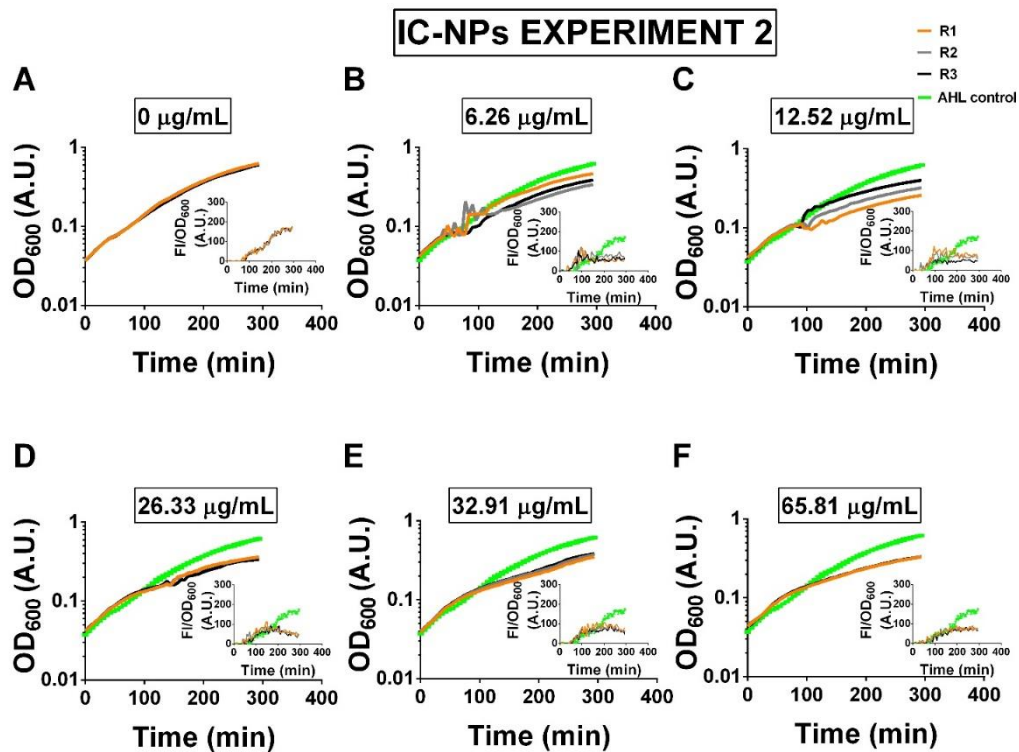


Figure S7. Effect of various concentrations of IC-NPs on the growth and the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor (Experiment 2). See legend to Figure S6 for details.

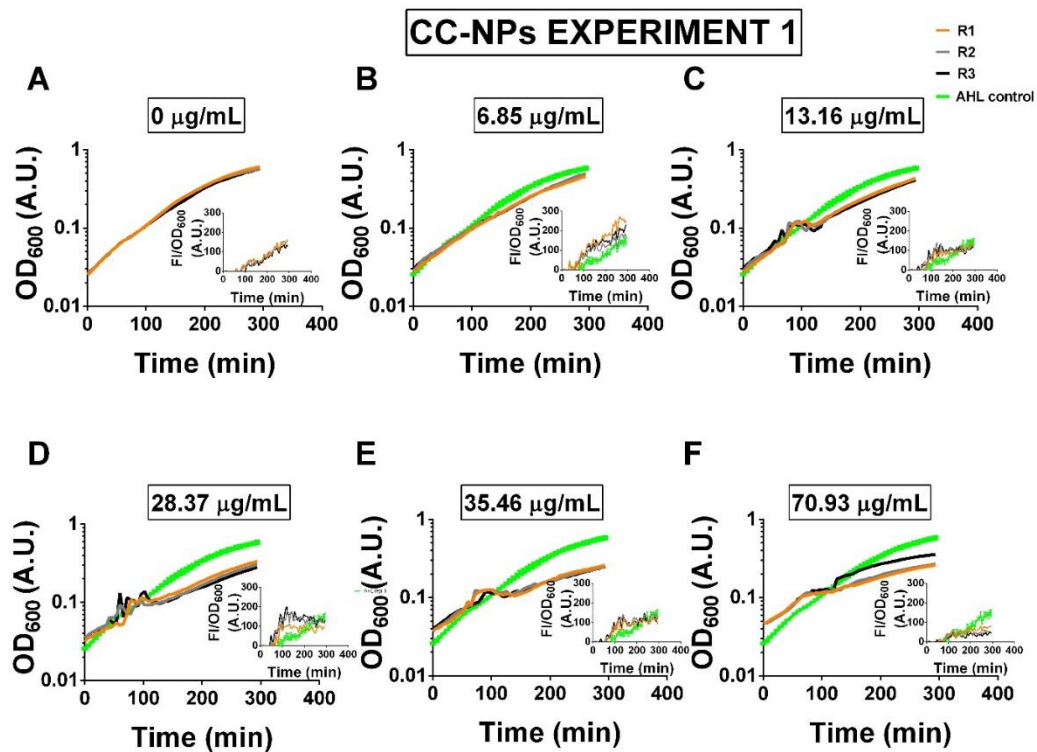


Figure S8. Effect of various concentrations of CC-NPs on the growth and the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor (Experiment 1). See legend to Figure S6 for details.

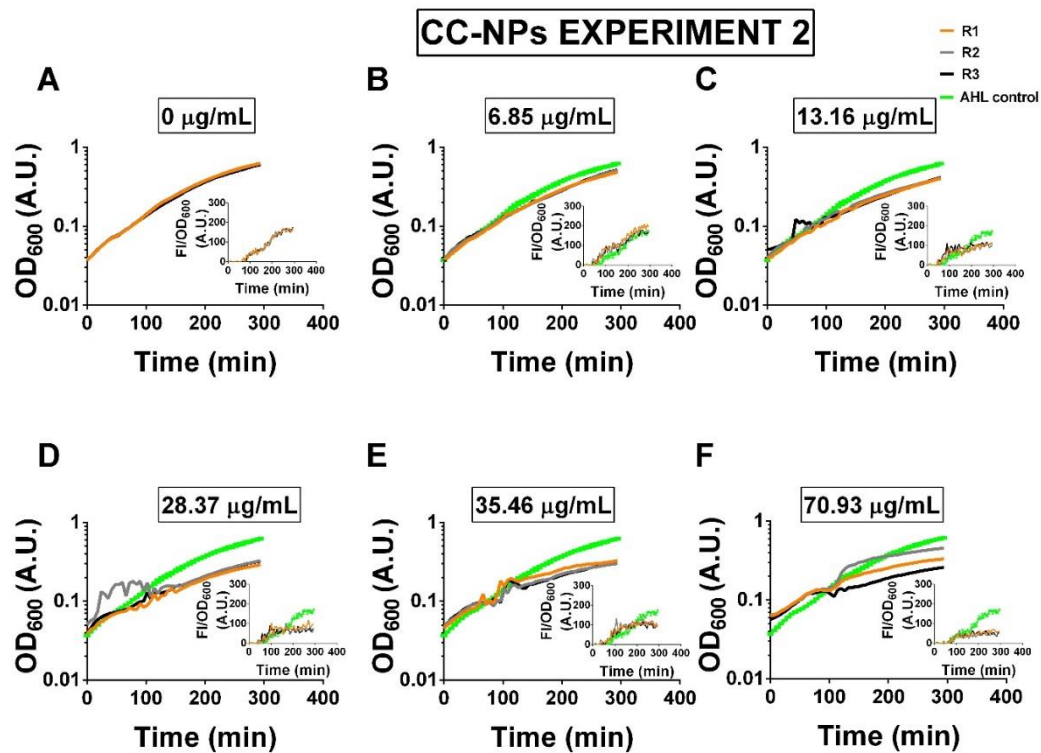


Figure S9. Effect of various concentrations of CC-NPs on the growth and the QS-based fluorescent response of the *E. coli* biosensor (Experiment 2). See legend to Figure S6 for details.

5.7. REFERENCES

- (1) Berkner, S.; Konradi, S.; Schönfeld, J. Antibiotic Resistance and the Environment? There and Back Again. *EMBO Rep.* **2014**, *15* (7), 740–744.
- (2) Payne, D. J.; Miller, L. F.; Findlay, D.; Anderson, J.; Marks, L. Time for a Change: Addressing R&D and Commercialization Challenges for Antibacterials. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2015**, *370*, 20140086.
- (3) Rutherford, S. T.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (11), a012427.
- (4) Mangwani, N.; Dash, H. R.; Chauhan, A.; Das, S. Bacterial Quorum Sensing: Functional Features and Potential Applications in Biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22* (4), 215–227.
- (5) Ng, W. L.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Ann Rev Genet* **2009**, *43*, 197–222.
- (6) Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (2), 269–275.
- (7) Fuqua, C.; Greenberg, E. P. Listening in on Bacteria: Acyl-Homoserine Lactone Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3* (9), 685–695.
- (8) Davies, D. G. The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **1998**, *280* (5361), 295–298.
- (9) Li, Y.-H.; Tian, X. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* **2012**, *12* (3), 2519–2538.
- (10) LaSarre, B.; Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77* (1), 73–111.
- (11) Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends Microbiol.* **2018**, *26* (4), 313–328.
- (12) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan—A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (8), 981–1014.
- (13) Jonassen, H.; Kjøniksen, A. L.; Hiorth, M. Effects of Ionic Strength on the Size and Compactness of Chitosan Nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **2012**, *290* (10), 919–929.
- (14) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19–34.
- (15) Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. ; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 125–132.
- (16) Liu, H.; Gao, C. Preparation and Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Nanoparticles. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20* (7), 613–619.
- (17) Zhang, X.; Malhotra, S.; Molina, M.; Haag, R. Micro- and Nanogels with Labile Crosslinks - from Synthesis to Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (7), 1948–1973.
- (18) Grenha, A. Chitosan Nanoparticles: A Survey of Preparation Methods. *J. Drug Target.* **2012**, *20* (4), 291.
- (19) Tavares, I. S.; Caroni, a. L. P. F.; Neto, a. a. D.; Pereira, M. R.; Fonseca, J. L. C. Surface Charging and Dimensions of Chitosan Coacervated Nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *90*, 254–258.

- (20) Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (15), 1650–1662.
- (21) Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (15), 1638–1649.
- (22) Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Chitosan-Based Drug Nanocarriers: Where Do We Stand? *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 496–504.
- (23) Elgadir, M. A.; Uddin, M. S.; Ferdosh, S.; Adam, A.; Chowdhury, A. J. K.; Sarker, M. Z. I. Impact of Chitosan Composites and Chitosan Nanoparticle Composites on Various Drug Delivery Systems: A Review. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23* (4), 619–629.
- (24) Liu, X. F.; Guan, Y. L.; Yang, D. Z.; Li, Z.; Yao, K. D. Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *79*, 1324–1335.
- (25) Gan, Q.; Wang, T.; Cochrane, C.; McCarron, P. Modulation of Surface Charge, Particle Size and Morphological Properties of Chitosan-TPP Nanoparticles Intended for Gene Delivery. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2005**, *44* (2–3), 65–73.
- (26) Kamat, V.; Bodas, D.; Paknikar, K. Chitosan Nanoparticles Synthesis Caught in Action Using Microdroplet Reactions. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22260.
- (27) Goycoolea, F. M.; Brunel, F.; Gueddari, N. E. El; Coggiola, A.; Lollo, G.; Moerschbacher, B. M.; Remuñán-López, C.; Delair, T.; Domard, A.; Alonso, M. J. Physical Properties and Stability of Soft Gelled Chitosan-Based Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2016**, *16* (12), 1873–1882.
- (28) Muzzarelli, R. A. A.; El Mehtedi, M.; Bottegoni, C.; Aquili, A.; Gigante, A. Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Mar. Drugs* **2015**, *13* (12), 7314–7338.
- (29) Bi, L.; Cao, Z.; Hu, Y.; Song, Y.; Yu, L.; Yang, B.; Mu, J.; Huang, Z.; Han, Y. Effects of Different Cross-Linking Conditions on the Properties of Genipin-Cross-Linked Chitosan/Collagen Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2011**, *22* (1), 51–62.
- (30) Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (12), 3823–3829.
- (31) Giri, T. K.; Thakur, A.; Alexander, A.; Badwaik, H.; Tripathi, D. K. Modified Chitosan Hydrogels as Drug Delivery and Tissue Engineering Systems: Present Status and Applications. *Acta Pharm. Sin. B* **2012**, *2* (5), 439–449.
- (32) Lin, Y.-H.; Tsai, S.-C.; Lai, C.-H.; Lee, C.-H.; He, Z. S.; Tseng, G.-C. Genipin-Cross-Linked Fucose-Chitosan/Heparin Nanoparticles for the Eradication of Helicobacter Pylori. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4466–4479.
- (33) Zhang, Y.; Thomas, Y.; Kim, E.; Payne, G. F. PH- and Voltage-Responsive Chitosan Hydrogel through Covalent Cross-Linking with Catechol. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (5), 1579–1585.
- (34) Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (9), 3275–3284.
- (35) Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.; Bumgardner, J. D. The Effect of Cross-Linking of Chitosan Microspheres with Genipin on Protein Release. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (3), 561–567.
- (36) Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and β -d-Galactosidase Immobilization. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190.

- (37) Song, X.; Wu, H.; Li, S.; Wang, Y.; Ma, X.; Tan, M. Ultrasmall Chitosan–Genipin Nanocarriers Fabricated from Reverse Microemulsion Process for Tumor Photothermal Therapy in Mice. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2080–2090.
- (38) Chen, H.; Wei, O.; Martoni, C.; Prakash, S. Genipin Cross-Linked Polymeric Alginate-Chitosan Microcapsules for Oral Delivery: In-Vitro Analysis. *Int. J. Polym. Sci.* **2009**, *Volume 200*, Article ID 617184.
- (39) Espinosa-García, B. M.; Argüelles-Monal, W. M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F. M. Molecularly Imprinted Chitosan-Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward o-Xylene. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3355–3364.
- (40) Pinto, C. A.; Saripella, K. K.; Loka, N. C.; Neau, S. H. Development and Characterization of Chitosan Cross-Linked With Tripolyphosphate as a Sustained Release Agent in Tablets, Part I: Design of Experiments and Optimization. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107* (4), 1063–1075.
- (41) Alonso, M. J.; Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciapara, I. Chitosan-Polysaccharide Blended Nanoparticles for Controlled Drug Delivery. In *Natural-Based Polymers for Biomedical Applications*; Elsevier, 2008; pp 644–679.
- (42) Shu, X. Z.; Zhu, K. J. A Novel Approach to Prepare Tripolyphosphate/Chitosan Complex Beads for Controlled Release Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2000**, *201* (1), 51–58.
- (43) Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2003**, *41* (24), 3941–3953.
- (44) Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S. Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38* (15), 2804–2814.
- (45) Muzzarelli, R. A. A. Genipin-Crosslinked Chitosan Hydrogels as Biomedical and Pharmaceutical Aids. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77* (1), 1–9.
- (46) Mikhailov, S. N.; Zakharova, A. N.; Drenichev, M. S.; Ershov, A. V.; Kasatkina, M. A.; Vladimirov, L. V.; Novikov, V. V.; Kildeeva, N. R. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Derivatives of Nucleosides and Nucleotides. Mechanism and Comparison with Glutaraldehyde. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2016**, *35* (3), 114–129.
- (47) Cobrado, L.; Azevedo, M. M.; Silva-Dias, A.; Ramos, J. P.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. G. Cerium, Chitosan and Hamamelitannin as Novel Biofilm Inhibitors? *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (5), 1159–1162.
- (48) Costa, E. M.; Silva, S.; Pina, C.; Tavaría, F. K.; Pintado, M. Antimicrobial Effect of Chitosan against Periodontal Pathogens Biofilms. *SOJ Microbiol Infect Dis* **2014**, *2* (1), 1–6.
- (49) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*, 358–368.
- (50) Dmour, I.; Taha, M. O. Novel Nanoparticles Based on Chitosan-Dicarboxylate Conjugates via Tandem Ionotropic/Covalent Crosslinking with Tripolyphosphate and Subsequent Evaluation as Drug Delivery Vehicles. *Int. J. Pharm.* **2017**, *529* (1–2), 15–31.
- (51) Shang, J.; Gao, X. Nanoparticle Counting: Towards Accurate Determination of the Molar Concentration. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (21), 7267–7278.
- (52) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.

- (53) Tjørve, K. M. C.; Tjørve, E. The Use of Gompertz Models in Growth Analyses, and New Gompertz-Model Approach: An Addition to the Unified-Richards Family. *PLoS One* **2017**, *12* (6), e0178691.
- (54) Tanaka, K.; Nishida, K.; Gabrys, B.; J. Lawrence, M.; Kanaya, T. Critical Dissolution Ionic Strength of Aqueous Solution of Chitosan Hydrochloride Salt. *Sen-i Gakkaishi (Journal Soc. Fiber Sci. Technol. Japan)* **2014**, *70*, 225–231.
- (55) Tsaih, M. L.; Chen, R. H. Effect of Molecular Weight and Urea on the Conformation of Chitosan Molecules in Dilute Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **1997**, *20* (3), 233–240.
- (56) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Monovalent Salt Enhances Colloidal Stability during the Formation of Chitosan/Tripolyphosphate Microgels. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 10392–10399.
- (57) Sreekumar, S.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Rivera-Rodriguez, G. R. Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano- and Microparticles. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 4695.
- (58) Goycoolea, F. M.; Lollo, G.; Remuñán-López, C.; Quaglia, F.; Alonso, M. J. Chitosan-Alginate Blended Nanoparticles as Carriers for the Transmucosal Delivery of Macromolecules. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (7), 1736–1743.
- (59) Rinaude, M.; Pavlov, G.; Desbrières, J. Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium So I u Bi I i Zat Ion of Chi Tosan i n Strong Acid Medium *. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **1998**, *5* (3), 267–276.
- (60) Chalal, M.; Ehrburger-Dolle, F.; Morfin, I.; Bley, F.; Aguilar de Armas, M.-R.; López Donaire, M.-L.; San Roman, J.; Bölggen, N.; Pişkin, E.; Ziane, O.; Casalegno, R. SAXS Investigation of the Effect of Temperature on the Multiscale Structure of a Macroporous Poly(N-Isopropylacrylamide) Gel. *Macromolecules* **2010**, *43* (4), 2009–2017.
- (61) Qazvini, N. T.; Bolisetty, S.; Adamcik, J.; Mezzenga, R. Self-Healing Fish Gelatin/Sodium Montmorillonite Biohybrid Coacervates: Structural and Rheological Characterization. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2136–2147.
- (62) Popa-Nita, S.; Rochas, C.; David, L.; Domard, A. Structure of Natural Polyelectrolyte Solutions: Role of the Hydrophilic/Hydrophobic Interaction Balance. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6460–6468.
- (63) Kim, M.-H. Modified Porod's Law Estimate of the Transition-Layer Thickness between Two Phases: Test of Triangular Smoothing Function. *J. Appl. Crystallogr.* **2004**, *37* (4), 643–651.
- (64) Drogoz, A.; Munier, S.; Verrier, B.; David, L.; Domard, A.; Delair, T. Towards Biocompatible Vaccine Delivery Systems: Interactions of Colloidal PECs Based on Polysaccharides with HIV-1 P24 Antigen. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (2), 583–591.
- (65) Carvalho, E. L. S.; Grenha, A.; Remuñán-López, C.; Alonso, M. J.; Seijo, B. Mucosal Delivery of Liposome–Chitosan Nanoparticle Complexes. *Methods Enzymol.* **2009**, *465*, 289–312.
- (66) Mengoni, T.; Adrian, M.; Pereira, S.; Santos-Carballeda, B.; Kaiser, M.; Goycoolea, F. M. A Chitosan-Based Liposome Formulation Enhances the In Vitro Wound Healing Efficacy of Substance P Neuropeptide. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4).
- (67) Kaiser, M.; Kirsch, B.; Hauser, H.; Schneider, D.; Seub-Baum, I.; Goycoolea, F. M. In Vitro and Sensory Evaluation of Capsaicin-Loaded Nanoformulations. *PLoS One* **2015**, *10* (10).
- (68) Alonso-Sande, M.; Cuña, M.; Remuñán-López, C.; Teijeiro-Osorio, D.; Alonso-Lebrero, J. L.; Alonso, M. J. Formation of New Glucomannan - Chitosan

- Nanoparticles and Study of Their Ability to Associate and Deliver Proteins. *Macromolecules* **2006**.
- (69) Thanh Nguyen, H.; Goycoolea, F. Chitosan/Cyclodextrin/TPP Nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* **2017**, *22* (11), 1975.
- (70) Parajó, Y.; D'Angelo, I.; Welle, A.; García-Fuentes, M.; Alonso, M. J. Hyaluronic Acid/Chitosan Nanoparticles as Delivery Vehicles for VEGF and PDGF-BB. *Drug Deliv.* **2010**.
- (71) Peleteiro, M.; Presas, E.; González-Aramundiz, J. V.; Sánchez-Correa, B.; Simón-Vázquez, R.; Csaba, N.; Alonso, M. J.; González-Fernández, Á. Polymeric Nanocapsules for Vaccine Delivery: Influence of the Polymeric Shell on the Interaction with the Immune System. *Front. Immunol.* **2018**.
- (72) Prado, L. B.; Huber, S. C.; Barnabé, A.; Bassora, F. D. S.; Paixão, D. S.; Duran, N.; Annichino-Bizzacchi, J. M. Characterization of PCL and Chitosan Nanoparticles as Carriers of Enoxaparin and Its Antithrombotic Effect in Animal Models of Venous Thrombosis. *J. Nanotechnol.* **2017**, 2017.
- (73) Boonyo, W.; Junginger, H. E.; Waranuch, N.; Polnok, A.; Pitaksuteepong, T. Preparation and Characterization of Particles from Chitosan with Different Molecular Weights and Their Trimethyl Chitosan Derivatives for Nasal Immunization. *J. Met. Mater. Miner.* **2008**, *18* (2), 59–65.
- (74) Bucarey, S. A.; Pujol, M.; Poblete, J.; Nuñez, I.; Tapia, C. V; Neira-Carrillo, A.; Martínez, J.; Bassa, O. Chitosan Microparticles Loaded with Yeast-Derived PCV2 Virus-like Particles Elicit Antigen-Specific Cellular Immune Response in Mice after Oral Administration. *Virol. J.* **2014**, *11*, 149. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-149>.
- (75) Harris, R.; Lecumberri, E.; Heras, A. Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (6), 1750–1762.
- (76) Waggett, F.; Shafiq, M.; Bartlett, P. Failure of Debye-Hückel Screening in Low-Charge Colloidal Suspensions. *Colloids and Interfaces* **2018**, *2* (4), 51.
- (77) Qi, L.; Xu, Z.; Jiang, X.; Hu, C.; Zou, X. Preparation and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (16), 2693–2700.
- (78) Helander, I. ; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71* (2–3), 235–244.
- (79) Ferro, M.; Doyle, A. Standardisation for in Vitro Toxicity Tests. *Cell Biol Toxicol* **2001**, *17* (4–5), 205–212.
- (80) Oslizlo, A.; Stefanic, P.; Dogsa, I.; Mandic-Mulec, I. Private Link between Signal and Response in Bacillus Subtilis Quorum Sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (4), 1586–1591.
- (81) Tan, S. Y.-Y.; Chua, S.-L.; Chen, Y.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S.; Nielsen, T. E.; Yang, L.; Givskov, M. Identification of Five Structurally Unrelated Quorum-Sensing Inhibitors of Pseudomonas Aeruginosa from a Natural-Derivative Database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (11), 5629–5641.
- (82) Moreira, C. G.; Palmer, K.; Whiteley, M.; Sircili, M. P.; Trabelsi, L. R.; Castro, A. F. P.; Sperandio, V. Bundle-Forming Pili and EspA Are Involved in Biofilm Formation by Enteropathogenic Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (11), 3952–3961.
- (83) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle Colloidal Stability

- in Cell Culture Media and Impact on Cellular Interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287–6305.
- (84) Huang, Y.; Cai, Y.; Lapitsky, Y. Factors Affecting the Stability of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogels: Resolving the Opposing Findings. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (29), 5957–5970.
- (85) Lazzari, S.; Moscatelli, D.; Codari, F.; Salmona, M.; Morbidelli, M.; Diomedea, L. Colloidal Stability of Polymeric Nanoparticles in Biological Fluids. *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14* (6), 1–10.
- (86) López-León, T.; Carvalho, E. L. S.; Seijo, B.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D. Physicochemical Characterization of Chitosan Nanoparticles: Electrokinetic and Stability Behavior. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *283* (2), 344–351.
- (87) Cetin, M.; Aktas, Y.; Vural, I.; Capan, Y.; Dogan, L. A.; Duman, M.; Dalkara, T. Preparation and In Vitro Evaluation of BFGF-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Drug Deliv.* **2007**, *14* (8), 525–529.
- (88) de Salamanca, A. E.; Diebold, Y.; Calonge, M.; Garcí a-Vazquez, C.; Callejo, S.; Vila, A.; Alonso, M. J. Chitosan Nanoparticles as a Potential Drug Delivery System for the Ocular Surface: Toxicity, Uptake Mechanism and In Vivo Tolerance. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2006**, *47* (4), 1416.
- (89) OH, J.-W.; Chun, S. C.; Chandrasekaran, M.; OH, J.-W.; Chun, S. C.; Chandrasekaran, M. Preparation and In Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles and Their Broad-Spectrum Antifungal Action Compared to Antibacterial Activities against Phytopathogens of Tomato. *Agronomy* **2019**, *9* (1), 21.
- (90) Saha, P.; Goyal, A.; Rath, G. Formulation and Evaluation of Chitosan-Based Ampicillin Trihydrate Nanoparticles. *Trop. J. Pharm. Res.* **2010**, *9* (5).
- (91) El-Aziz, A. R. M. A.; Al-Othman, M. R.; Mahmoud, M.; Shehata, S.; Abdelazim, N. S. Chitosan Nanoparticles as a Carrier for Mentha Longifolia Extract: Synthesis, Characterization and Antifungal Activity. *Curr. Sci.* **2018**, *114*, 2116–2122.
- (92) Fan, W.; Yan, W.; Xu, Z.; Ni, H. Formation Mechanism of Monodisperse, Low Molecular Weight Chitosan Nanoparticles by Ionic Gelation Technique. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *90*, 21–27.
- (93) Huang, Y.; Lapitsky, Y. On the Kinetics of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Aggregation and Their Effects on Particle Polydispersity. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *486*, 27–37.
- (94) Artech Pujana, M.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros Iturbe, L. C.; Katime, I. Biodegradable Chitosan Nanogels Crosslinked with Genipin. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (2), 836–842.
- (95) Kumar, G. V.; Su, C.-H.; Velusamy, P. Ciprofloxacin Loaded Genipin Cross-Linked Chitosan/Heparin Nanoparticles for Drug Delivery Application. *Mater. Lett.* **2016**, *180*, 119–122.
- (96) Razi, M. A.; Wakabayashi, R.; Tahara, Y.; Goto, M.; Kamiya, N. Genipin-Stabilized Caseinate-Chitosan Nanoparticles for Enhanced Stability and Anti-Cancer Activity of Curcumin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *164*, 308–315.
- (97) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.



**6. CHAPTER 3.
COVALENTLY AND IONICALLY,
DUALY CROSSLINKED
CHITOSAN NANOPARTICLES
BLOCK QUORUM SENSING
AND AFFECT CELL GROWTH
ON A CELL-DENSITY
DEPENDENT MANNER***

* The results from this chapter have already been published as Vila-Sanjurjo, C. ^{a,b}, Hembach, L. ^a, Netzer, J. ^a, Remuñán-López, C. ^b, Vila-Sanjurjo, A. ^c and F.M.Goycoolea ^{a,d}. Covalently and Ionically, Dually Crosslinked Chitosan Nanoparticles Block Quorum Sensing and Affect Bacterial Cell Growth on a Cell-Density Dependent Manner. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, *578*, 171–183.

<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.05.075>., ISSN: 0021-9797

^a Westfälische Wilhelms Universität Münster. IBBP, Laboratory of Nanobiotechnology, Schlossplatz 8, Münster 48143, Germany

^b Nanobiofar Group. Department of Pharmacology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Vida, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^c Grupo GIBE. Departamento de Biología e Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Universidade da Coruña (UDC). Campus Zapateira, s/n, 15071 A Coruña, Spain

^d School of Food Science and Nutrition. University of Leeds, Leeds LS2 9JT, United Kingdom



6.1. ABSTRACT

In our efforts to improve the quality and stability of chitosan nanoparticles (NPs), we describe here a new type of chitosan NPs dually crosslinked with genipin and sodium tripolyphosphate (TPP) that display quorum quenching activity. These NPs were created using a simplified and robust procedure that resulted in improved physicochemical properties and enhanced stability. This procedure involves the covalent crosslinking of chitosan with genipin, followed by the formation of chitosan NPs by ionic gelation with TPP. We have optimized the conditions to obtain genipin *pre*-crosslinked nanoparticles (PC-NPs) with positive ζ potential ($\sim +30$ mV), small diameter (~ 130 nm), and low size distributions (PdI = 0.1 - 0.2). PC-NPs present physicochemical properties that are comparable to those of other dually crosslinked chitosan NPs fabricated with different protocols. In contrast to previously characterized NPs, however, we found that PC-NPs strongly reduce the AHL-mediated quorum sensing response of an *Escherichia coli* fluorescent biosensor. Thus, PC-NPs combine, in a single design, the stability of dually crosslinked chitosan NPs and the quorum quenching activity of ionically crosslinked NPs. Similar to other chitosan NPs, the mode of action of PC-NPs is consistent with the existence of a “stoichiometric ratio” of NP/bacterium, at which the positive charge of the NPs counteracts the negative ζ potential of the bacterial envelope. Notably, we found that the time of the establishment of the “stoichiometric ratio” is a function of the NP concentration, implying that these NPs could be ideal for applications aiming to target of bacterial populations at specific cell densities. We are confident that our PC-NPs are up-and-coming candidates for the design of efficient anti-quorum sensing and a new-generation antimicrobial strategies.

6.2. INTRODUCTION

Chitosan (CS) is a family of cationic and biodegradable aminopolysaccharide polymers derived from partial deacetylation of chitin. The physical and chemical properties of CS are mainly determined by the relative abundance of deacetylated units and by their molecular weight. This versatility makes CS a strong candidate for

applications in the food, cosmetic, pharmaceutical and biomedical fields¹. Physical or chemical crosslinking is frequently applied to improve the physicochemical properties of CS towards the design of efficient CS-based biopharmaceuticals²⁻⁴. Ionic crosslinking normally involves polyanions, such as sodium tripolyphosphate (TPP), which interact with the protonated amine-groups of CS⁵⁻⁹. Chemical crosslinking of CS has been reported to increase its stability against pH, temperature, and degradation, both biological and mechanical^{3,4,10-12}. Genipin (GNP) is a natural covalent crosslinker derived from the geniposide compound found in the fruits of *Gardenia spp.* GNP is receiving intense attention as it constitutes a more compatible and less cytotoxic alternative to covalent crosslinkers such as glutaraldehyde¹³⁻¹⁶. The crosslinking reaction between GNP and CS occurs in two steps. First, a nucleophilic attack of a CS primary amine group to the GNP C3 carbon atom leads to the formation of a heterocyclic compound linked to a glucosamine residue. This reaction is followed by a slower nucleophilic substitution of the GNP ester group (C11), the formation of a secondary amide linkage with CS, and the formation of crosslinking bridges¹⁵. The degree of covalent crosslinking with GNP can be controlled to modulate specific properties of CS-based materials, such as the release of biomolecules, the stability against pH and temperature variations, or the structure of the CS gel network. Due to all these properties, GNP-based crosslinking of CS is the subject of an increasing number of applications in the fields of Material Sciences, Biotechnology and Pharmaceutical Technology^{11,13,17-21}.

Quorum sensing (QS) is a cell-to-cell signaling mechanism mediated by exocellular chemical compounds that act as autoinducers. QS is reported to control many bacterial phenotypes, from bioluminescence to antibiotic production, biofilm formation, and secretion of virulence factors, among others²²⁻²⁵. In Gram-negative bacteria, the molecular family of the acyl-homoserine lactones (AHLs) constitute the most abundant species of autoinducers^{26,27}. AHLs are synthesized by LuxI-type enzymes and can freely diffuse in and out of the cell, where they bind to LuxR-type regulators of QS gene expression^{28,29}. Since QS is deeply involved in the development of pathogenicity in bacteria, the search for anti-QS strategies, or quorum quenching

(QQ), is a growing field of interest. QQ strategies typically include the use of agents capable of blocking QS molecular mechanisms. As such, QQ can occur by the inactivation of either the autoinducer, its receptor, or the AHL synthase^{23,30–37}. Research on the potential use of CS to interfere with QS has been gaining traction^{11,38–41}.

In **Chapter 2**, we reported the ability of ionically crosslinked CS nanoparticles (NPs) using TPP (IC-NPs), to interfere with QS. Despite their QQ activity, IC-NPs displayed high polydispersity and low colloidal stability in microbiological medium. As a first attempt to overcome this, we crosslinked IC-NPs with GNP and found that this treatment led to the formation of a core-shell ultrastructure that stabilized the system, albeit with a significant decrease of their QQ activity (**Chapter 2**). While the resulting NPs, hereafter named CC-NPs, were potentially useful in contexts in which QQ is not desired, we set out to find new formulations that combined the stability of CC-NPs with the QQ activity of IC-NPs. In the present work, we found that by reversing the preparation protocol to first crosslinking of CS with GNP close to the critical gelling condition, followed by ionotropic formation of NPs in the presence of TPP, resulted in NPs displaying improved physico-chemical features while retaining the QQ and antimicrobial activity. This, along with the fact that the uncovered fabrication process is faster and more robust, made us confident that these NPs could serve as the chassis for the development of CS-based nanomaterials intended for microbiological applications. We named these GNP *pre*-crosslinked NPs (PC-NPs). Besides, we show here that PC-NPs have the potential to target bacterial populations in a cell-density specific manner. This feature could be used for the targeting of bacterial populations at specific stages of growth.

6.3. MATERIALS AND METHODS

6.3.1. Materials

High-purity grade CS in its hydrochloride salt form (Protasan UP CL113) was purchased from Novamatrix (FMC-Biopolymer, Norway). CS's MW was ~92 kDa, *PD (M_w/M_n)* ~2.5, as determined by GPC-MALLS-DRI; and the degree of acetylation (DA) was ~14%, as

determined by ^1H NMR. GNP was purchased from Challenge Bioproducts Co. Ltd. (Touliu, Taiwan). TPP, N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL, named AHL hereafter), and other chemicals were purchased from Merck KGaA, (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was used throughout. All reagents were of analytical grade.

6.3.2. Chemical pre-crosslinking of CS with GNP

Before the preparation of the mixtures of CS- and GNP (CS/GNP), stock solutions of CS (2 mg/mL) and GNP (5 mg/mL), were prepared directly in 85 mM NaCl, sterile-filtered through a 0.22- μm membrane, and stored at 4 °C until use. CS hydrochloride salt dissolves directly in water ⁴². To assess the optimal composition and consistency of the CS/GNP mixture, we screened different GNP:CS mass ratios. To this end, working solutions of CS (2 mg/mL) and GNP (0.12, 0.24 and 0.48 mg/mL) were first prepared in 85 mM NaCl. Next, aliquots of the two components were mixed in a final volume of 30 mL to obtain CS/GNP mixtures with 0.06:1, 0.12:1 and 0.24:1 GNP:CS mass ratios. The mixtures were incubated for 72 h in capped, 100-mL Erlenmeyer flasks at 37 °C in an orbital shaker (100 rpm).

The kinetics of the crosslinking reaction was monitored by UV/VIS spectroscopy (V-630 UV-VIS Spectrophotometer, JASCO Corporation, Tokyo, Japan) ($\lambda=200\text{-}900$ nm) and by dynamic light scattering using non-invasive back scattering (DLS-NIBS) with a Malvern Zetasizer NanoZS ZEN 3600, (Malvern Panalytical, UK); equipped with a red 4 mW He/Ne laser output operating at $\lambda=633$ nm. In both cases, one mL-aliquots of the CS/GNP mixtures were transferred to measurement cuvettes at specific time points, spanning a total of 72 h of sample incubation. The samples were measured in triplicates, and each one of them was measured three times at 37 °C. After each measurement, the aliquots were returned to the batch solution.

To estimate the critical gel time, the DLS-NIBS intensity correlation data were approximated by percolation kinetics ⁴³. First, the intensity correlation function $g^{(2)}(t_D)-1$ was fitted to the modified exponential stretched KWW function, as explained in de Morais et al.

⁴⁴. Thus, the initial part of the DLS correlograms, expressed as the correlation coefficients vs. delay times (t_D), was fitted to the KWW-based stretched exponential equation (Equation 1) with Origin Pro 8 (OriginLab, Northampton, MA):

$$g^{(2)}(t_D) - 1 = 1 - \beta e^{-(2\Gamma_c t_D)} \quad (1)$$

where β is a constant that depends on the optical properties of the system, and Γ_c is the relaxation rate ⁴⁴.

The estimated Γ_c values were then corrected by subtracting the baseline, plotted against incubation time, and fitted to the percolation scaling law function (Equation 2).

$$P_\infty = K (p - p_c)^M \quad (2)$$

This equation is equivalent to the three-parameter power Behlraddek function (OriginLab, Northampton, MA), where P_∞ is the calculated evolution of the correlation coefficient Γ_c over time, K is a proportionality constant, t is time, M is the universal percolation exponent, and p_c becomes $t_{gel-DLS}$, i.e. the critical gelation time at which the response diverges from that in the sol state ⁴⁵. The use of the Behlraddek function to approximate percolation phenomena has been described (Chapter 1 and ^{46,47}).

The evolution of the viscoelastic properties for the CS:GNP mix (ratio 0.06:1) was further examined by small deformation oscillatory rheology using a stress-controlled rheometer Kinexus Ultra (Malvern Panalytical Ltd, UK) fitted with a truncated cone and plate geometry (gap 0.07 mm; diameter 50 mm). To this end, the CS/GNP mixture was prepared by mixing the corresponding amounts of CS and GNP stock solutions in a glass vial and incubated at 37 °C in quiescent conditions during 18 h. A 1.5 mL aliquot of the mixture was loaded to the plate of the rheometer and the rim of the cone was covered with low viscosity silicon oil to avoid evaporation. The critical rheological gel point was defined as the crossover point of the elastic (G') and viscous (G'') moduli ($\omega = 6.28$ rad/s), recorded at strain values, $\gamma = 1$ % over a period of up to 106 min), in line with previous studies ^{48,49}.

6.3.3. Preparation of PC-NPs

The GNP-pre-crosslinked CS-TPP NPs (PC-NPs) were prepared according to the general ionotropic gelation protocol described by Calvo et al. ⁶ with some modifications. First, GNP-pre-crosslinked CS was prepared at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1, as explained above. To assess the optimal formulation to obtain PC-NPs of an average size ~200 nm and low polydispersity index or PdI (PdI ~0.1), different CS:TPP mass ratios were screened. To do this, GNP-pre-crosslinked CS was sub-diluted with 85 mM NaCl to reach CS concentrations ranging from 1-2 mg/mL. Similarly, TPP was also prepared in 85 mM NaCl, achieving final concentrations ranging from 0.5-0.83 mg/mL. Aliquots of the two components were mixed in a 96-well microplate to obtain PC-NPs with CS:TPP mass ratios ranging from 1.60:1 to 9.00:1 (see **Table S1**).

Two PC-NP prototypes of optimal size and PdI, namely PC-A, PC-B, with CS:TPP mass ratios of 3.5:1 and 2.6:1, respectively, were prepared by upscaling the preparation technique. Briefly, 1.875 mL (PC-A) or 2.250 mL (PC-B) of a TPP solution (0.63 mg/mL in 85 mM NaCl) were poured onto 4.125 mL (PC-A) or 3.750 mL (PC-B) of GNP-pre-crosslinked CS (sub-diluted to a CS concentration of 1 mg/mL with 85 mM NaCl) under magnetic stirring (500 rpm). When necessary, PC-NPs were isolated by centrifugation (40 min at 10000 x g and at 25 °C) in 1.5 mL vials containing a glycerol bed ⁵⁰ and the pellets were re-suspended in 100 µL of water.

6.3.4. Physicochemical characterization of PC-NPs

The size distribution of NPs re-suspended in Milli-Q® water was determined by DLS-NIBS in Milli-Q® water (pH ≈ 7.0) at 25.0 ± 0.2 °C. The ζ-potential was determined by phase analysis light scattering with mixed mode measurements (M3-PALS) in the same instrument as for DLS-NIBS measurements, and diluting (1:50) the PC-NPs in 1 mM KCl (pH 5.89).

6.3.5. Determination of the PC-NP production yield and concentration

Batch PC-NP production yield was determined by centrifugation (40 min at 10000 x g and at 25 °C) of fixed volumes of freshly prepared PC-NPs in the absence of glycerol. After discarding the supernatants, the pellets were subjected to freeze-drying and the dry weight of the pellets was registered. The production yield was determined as follows (Equation 3):

$$Production\ yield\ (\%) = 100 \times \frac{m_{pellet} - m_{NaCl}(pellet)}{m_{total} \times V} \quad (3)$$

where: m_{pellet} is the dried mass of the pellet, $m_{NaCl}(pellet)$ is a corrective term that accounts for the mass of the residual NaCl present in the pellet (estimated as 0.075 mg NaCl in a 20- μ L pellet), V is the volume used for freeze-drying (4.5 mL) and m_{total} is the total mass of the PC-NP components (GNP-pre-crosslinked CS and TPP) in the batch, as expressed in Equation 4:

$$m_{total} = \frac{C_{CS} \times V_{CS} + C_{TPP} \times V_{TPP}}{V_{batch}} \quad (4)$$

where: C_{cs} is the concentration of CS in the GNP-pre-crosslinked CS gel (1 mg/mL), V_{cs} is the volume of the GNP-pre-crosslinked CS gel used for PC-NP preparation (4.125 mL or 3.750 mL in PC-A and PC-B, respectively), C_{TPP} is the concentration of the TPP solution (0.63 mg/mL), V_{TPP} is the volume of the TPP solution used for PC-NP preparation (1.875 mL or 2.250 mL in PC-A and PC-B, respectively) and V_{batch} is the total volume of the PC-NP batch (6 mL). Thus, m_{total} was estimated as 0.93 mg and 0.90 mg for PC-A and PC-B, respectively. PC-NP concentration was calculated during subsequent experimental steps (e.g., isolation, dilution, etc) by applying the corresponding concentration factor, f_c (i.e., volume of PC-NPs for isolation or dilution relative to batch volume), as follows (Equation 5):

$$[NP] \left(\frac{mg}{mL} \right) = m_{total} \times Production\ yield \times 10^{-2} \times f_c \quad (5)$$

Product yield determination was performed in triplicate.

6.3.6. Stability of PC-NPs in supplemented M9 minimal medium

60- μ L aliquots of the isolated PC-NPs (PC-A and PC-B) were diluted in M9 minimal medium supplemented with 0.5% casamino acids, 1 mM thiamine hydrochloride and ampicillin (200 μ g/mL), in a volume of 1 mL (final dilution = 1:17) and at a final concentration of \sim 0.15 mg/mL. The pH of the medium was 6.9 ± 0.05 . The PC-NPs were incubated for 335 min in M9 minimal medium at 37 °C under shaking (100 rpm), and size variation was monitored every ten minutes by DLS-NIBS at 37 °C.

6.3.7. Bacterial strains and culture conditions

The *Escherichia coli* strain Top10 was transformed with plasmid pSB1A3-BBa_T9002, carrying the BBa_T9002 genetic device (Registry of Standard Biological Parts: http://parts.igem.org/Part:BBa_T9002), kindly donated by Prof. John C. Anderson (UC Berkeley, USA). The transformed strain is a biosensor that can respond to AHL⁵¹. Cultures were prepared as per the protocol described in **Chapter 1**.

6.3.8. Evaluation of the ability of the PC-NPs to inhibit the QS response in a fluorescent *E. coli* biosensor of AHL-mediated QS

The QS inhibitory activity of the PC-NPs was evaluated in terms of their ability to decrease the AHL-mediated fluorescence response of the *E. coli* biosensor. Isolated PC-A and PC-B were serially diluted in water. Ten- μ L aliquots of these dilutions were pre-mixed with 180 μ L of the biosensor's culture and incubated for one hour at 37 °C with shaking (100 rpm) in a flat-bottom, 96-well plate. Blank (medium only) and control wells were inoculated with 10 μ L of water and incubated under the same conditions. After one hour, 10 μ L of 5×10^{-9} M AHL were added to the wells to a final AHL concentration of 2.5×10^{-10} M and incubated for 300 min in the microplate reader as described (ref to IC-NPs). The final PC-NP concentration in the plate ranged from 0.1 to 0.001 mg/mL.

Statistical comparisons between PC-NP treatments and controls were made with GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA) using one-way ANOVA with multiple comparisons Dunnett's Test (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$). For each experiment, fluorescence intensity (FI) and optical density (OD₆₀₀) were corrected by subtracting the values of absorbance and fluorescence background and expressed as the average of three biological replicates. FI was normalized to cell density (FI/OD₆₀₀)⁵².

6.3.9. Microscopy

Fluorescent imaging of the *E. coli* biosensor in the presence of AHL and PC-NPs was performed as follows. 180- μ L aliquots of the biosensor's cultures were pre-incubated with 10- μ L aliquots of PC-NPs, to a final NP concentration of 123 μ g/mL for 40 min at 37°C under shaking (100 rpm) in capped vials. The PC-NP pre-treated biosensor was then induced with 10 μ L of 5×10^{-9} M AHL. The cultures were then transferred to CytoCapture imaging dishes with 20- μ m hexagonal cavities (Zell-Kontakt GmbH, Nörten-Hardenberg, Germany), and incubated for a further 60 min at room temperature before imaging by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Images were recorded for a period of 70 min. Control cultures were prepared by adding equal aliquots of water instead of PC-NPs.

CLSM was performed using a Leica TCS SP2 spectral confocal scanner mounted on a Leica DM IRES inverted microscope. Images were acquired with the following settings: HCX PL APO 63.0x 1.20 W CORR UV water-immersion objective, argon excitation laser (488 nm), 134.1 μ m pinhole (1.0 Airy unit), standard Leica settings for GFP beam path, emission bandwidth equal to 500-600 nm, and voxel width and height equal to 51.0 nm. Images were acquired from single scans with a line average of 4.0, scan speed of 400 Hz, and 8-bit resolution. Images were processed with Leica LAS AF Lite software with contrast and brightness values set to -63 and 0, respectively. To quantify fluorescence intensity data from representative CLSM images, a number of regions of interest (ROIs) were drawn as lines spanning the length of a representative number of cells ($l = 1.9$ - 4.3 μ m) and used to measure pixel intensity across the cell. Every analysis included 3-7

images with 18-38 ROIs each. Three-dimensional analysis of the culture was performed by collecting z-series spanning a total thickness of 7-8 μm . A total of 22-27 frames were collected in each section, with 0.3- μm gaps between consecutive frames. Unpaired t-test comparisons between PC-NP treatments and controls were performed with GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

6.4. RESULTS

6.4.1. Chemical co-crosslinking of CS with GNP

Prior to the fabrication of PC-NPs, pre-crosslinked CS/GNP mixtures with optimized composition and rheological properties were prepared in 85 mM NaCl after screening various GNP:CS mass ratios (see Materials and Methods). We and others have previously reported that moderate amounts of NaCl enhance the colloidal stability of TPP crosslinked CS NPs during their formation (see **Chapter 2** for an extensive discussion on this issue). **Figure 1A** shows representative images of GNP-pre-crosslinked CS at GNP:CS mass ratios of 0.06:1, 0.12:1 and 0.24:1 after 72 h incubation at 37°C under shaking. Of note, the reaction between CS and GNP can be visually followed by the formation of a dark blue color, likely stemming from secondary products of the main reaction^{13,15}. Both color intensity and the apparent loss in fluidity increased with increasing GNP:CS mass ratios¹³. At the highest GNP:CS mass ratio, a gel-like consistency was visually apparent (0.24:1 GNP:CS mass ratio in **Figure 1A**). The crosslinking reaction between CS and GNP is well known, and its kinetics has been studied by UV, FTIR and ¹H NMR spectroscopy¹⁴. Here, we followed the kinetics of the crosslinking reaction by UV/VIS, DLS-NIBS and small deformation rheology. **Figure 1B** shows the UV/VIS spectra ($\lambda = 200\text{-}900\text{ nm}$) depicting the time-course evolution of the GNP crosslinking reaction for CS/GNP mixtures with a GNP:CS mass ratio of 0.06:1. As previously reported, a characteristic peak between 280-300 nm (dotted line in **Figure 1B**), increases concomitantly with the progression of the GNP crosslinking reaction²⁰. The inset in **Figure 1B**

represents the evolution of the peak at 280 nm over time. The height of the peak increases steeply during the first 80 h of incubation and reaches



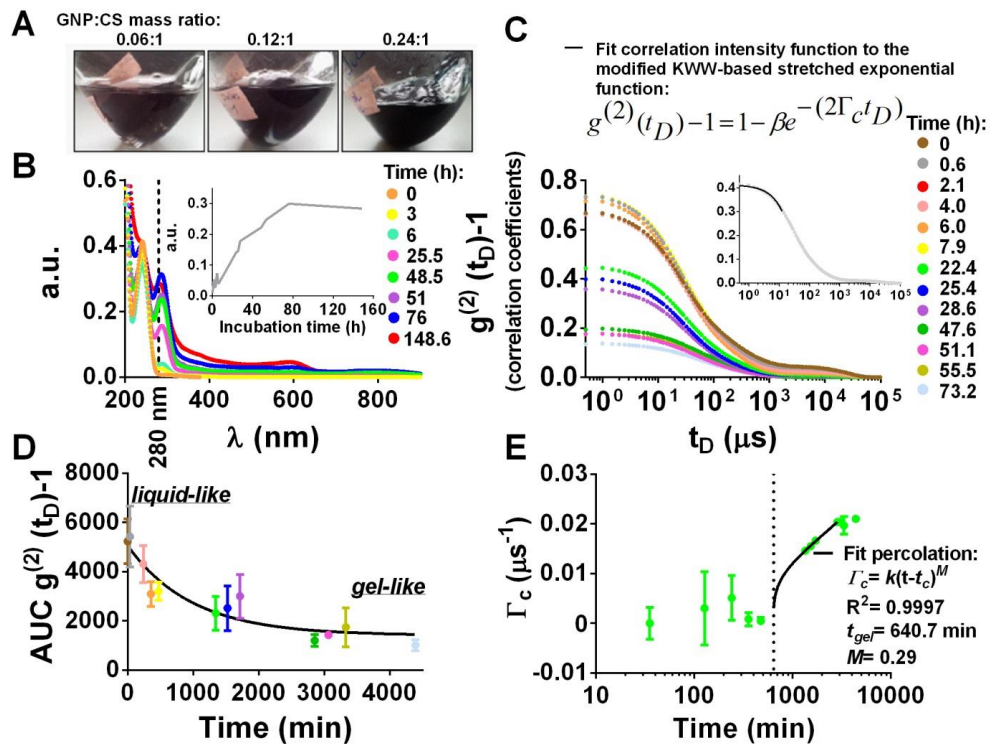


Figure 1. Monitoring of chemical crosslinking of CS with GNP over time

Legend Figure 1: Monitoring of chemical crosslinking of CS with GNP over time.

A. Representative snapshots of the gelation-like process after incubation during 72 h at 37°C with shaking. The images show the formation of blue color as a secondary product of the reaction of CS and GNP at different GNP:CS mass ratios; namely 0.06:1; 0.12:1 and 0.24:1. **B.** Time-course evolution of the crosslinking reaction for CS/GNP mixtures at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1, as monitored by UV-vis scanning ($\lambda = 200\text{-}900\text{ nm}$). Color key indicates reaction times (right). The dotted line indicates the characteristic peak of the CS/GNP gelation reaction at $\lambda = 280\text{ nm}$. The inset shows the magnitude variation of the characteristic peak ($\lambda = 280\text{ nm}$) over time. Data corresponding to a single representative reaction. **C.** DLS-NIBS intensity correlograms at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1. Color key indicates reaction times (right). The inset shows a representative plot at $t = 73.2\text{ h}$, where the solid black line represents the best-fit to the KWW-based stretched exponential function at early delay times. Data represent the mean of three technical replicates. For the sake of clarity, no error bars are shown. **D.** Evolution of the AUC from the plots in C with reaction time. Color-coded as in C. The solid line represents the best-fit of the data to the one-phase decay function (GraphPad Software, La Jolla California USA). Data represent the mean and standard deviations of three technical replicates. **E.** Evolution of the relaxation rate Γ_c , as estimated from the fits of the correlograms shown in C to the KWW-based function at different reaction times. The solid line corresponds to the best-fit of the data to the percolation function (Equation 2, see Materials and Methods). The dotted line indicates the estimated critical time of gelation ($t_{gel-DLS}$) at $\sim 640.7\text{ min}$. Data represent the mean and standard deviations of three technical replicates.

a plateau at later times. This evidence made us conclude that the covalent crosslinking reaction was completed after 80 h. The DLS-NIBS intensity correlation data, obtained with different reaction times, were fitted to the KWW-based stretched exponential function (Eq. 1, see Materials and Methods), as previously described^{44,49}. **Figure 1C** shows the DLS-derived correlograms, expressed as correlation coefficients vs. delay times for a GNP:CS mass ratio of 0.06:1 and at different incubation times. The inset shows a representative correlogram of this GNP:CS mixture after 0.6 h incubation. The best-fit of the experimental data to the KWW-based stretched exponential function is represented by a solid line. Noticeable from **Figure 1C** is the reduction in the magnitude of the intensity correlation coefficients at early delay times as incubation time increases. **Figure 1D** plots the area under the curve (AUC) from the correlograms of **Figure 1C** at different incubation times. A solid line depicts the monotonic decay of the magnitude of AUC with incubation time in **Figure 1D**. The strong decay in the initial amplitude of the correlation intensity, as depicted in

Figure 1D, has been proposed as a good indicator of the critical gelation time in previous studies with similar soft systems^{44,53}. **Figure 1E** shows a plot of the estimated Γ_c , as extracted from the fit shown in **Figure 1C**, vs. time. The estimated values of Γ_c remained noisy around the baseline during the first ~35-500 min of incubation. After this phase, a sharp increase of estimated Γ_c values is observed (“take-off phase”, from ~500-3000 min) that levels off late in the reaction (“plateau phase”, after ~3000 min). This profile correlates closely with the one described by de Moraes et al.⁴⁴ for the chemical crosslinking of CS with glutaraldehyde. As explained by these authors, the relaxation rate Γ_c , decreases at earlier reaction times due to an increase in viscous, hydrodynamic interactions between macromolecular CS coils and the solvent that result in longer macromolecular CS coils. At longer reaction times, further intermolecular crosslinking results in a decrease of the dimensions of the macromolecular coils in the gel structure and in loss of ergodicity, thus explaining the sharp Γ_c increase⁴⁴. Upon closer inspection, the profile of estimated Γ_c vs. reaction time in **Figure 1E** closely resembles the kinetics of a classical percolation process. The behavior of gels at the sol-gel phase transition has been extensively described in terms of percolation theory (PT)⁴³. Percolative gelation involves a sharp transition at some intermediate critical point ($p = p_c$, Eq. 2; see Materials and Methods), where an infinite cluster starts to appear: a gel for p above p_c ⁴³. This critical point, or gel point, $p = p_c$ becomes $t = t_{gel-DLS}$ in our system and determines the critical gelation time (see Materials and Methods). We fitted the Γ_c values between the “take-off phase” and the “plateau phase” to the three-parameter power Behehradek function^{46,47}. From this percolation fit, depicted by a solid line in **Figure 1E**, a $t_{gel-DLS}$ of 640.7 min and an M exponent of 0.29, were obtained. The value of the M is not too far from the universal exponent reported for a 3D classical percolation process, $M = 0.45$ ⁴³. From these results, we can infer that a gel-like state is achieved after 10.7 h of incubation of the GNP-CS mixture at 37°C and at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1.

To further confirm the formation of a gel network, we examined the evolution of the viscoelastic properties during the sol-gel transition at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1 by small deformation oscillatory

rheology. The results (**Figure S1**) revealed that an incipient gel network is formed at a rheological critical gel time ($t_{gel-rheo}$) of ~ 1118 min. This is evident from the crossover of the G' and G'' moduli, and the drop in $\tan \delta$. Also, a frequency sweep recorded after 1200 min, revealed all the hallmarks of a gel network, i.e. $G' > G''$, the dependence of η^* on the frequency and slope ~ -1.0 (**Figure S2**). Despite being at the limit of sensitivity of the rheometer, these determinations provided unequivocal evidence of the sol-gel transition in the system. It should be noted, however, that the magnitude of the critical gel time obtained by DLS-NIBS ($t_{gel-DLS} \sim 640.7$ min) was ~ 2 -fold lower than that determined by small deformation rheology ($t_{gel-rheo} \sim 1118$ min). The apparent large discrepancy between the two determined values could be the result of the different experimental resolution capacity of each technique, as we have shown in a previous study at low CS concentrations (< 2 mg/mL)⁴⁹. Indeed, we have been able to show that within experimental error, DLS-NIBS, microviscosimetry and small deformation rheology constitute robust methods to determine the critical sol-gel transition of CS-based systems⁴⁹.

6.4.2. Optimization of PC-NP size and polydispersity

To obtain PC-NPs, the GNP-pre-crosslinked CS mixtures, formed as explained above, were further crosslinked with the ionic crosslinker TPP by following the classical ionotropic gelation protocol⁶. To rapidly assess the composition of PC-NPs with the lowest average NP diameter and PDI, we adopted the criteria described by Calvo et al. and Dmour & Taha^{6,54}. Based on our previous and the work of others (**Chapter 2** and ^{5,55-57}), we used 85 mM NaCl as a solvent instead of water to better modulate the size and the polydispersity of PC-NPs over a range of CS:TPP mass ratios. It has been suggested that the addition of a low amount of monovalent ions to CS NP suspensions aids in the optimization of the hydrodynamic radius and screens the electrostatic repulsion of the charged amino groups in CS, thus adopting a more compact conformation increased flexibility and colloidal stability, and lower polydispersity^{5,55} (see also **Chapter 2**). Low Z-average hydrodynamic diameters and PDI values were attained with CS:TPP mass ratios in the range of 1.60:1 to 9.0:1 (See Materials

and Methods and **Table S1**). The dependence of the size and PDI of PC-NPs on the relative TPP and CS concentrations is shown in **Figures 2A** and **2B**, respectively. In both cases, regions with colors ranging from green to red can be interpreted as hills with high size (**Figure 2A**) or high PDI values (**Figure 2B**), whereas regions with colors ranging from purple to blue correspond to valleys with sub-micron sizes and low-to-medium PDI values. **Figure 2A** shows that it is possible to obtain PC-NPs with a Z-average diameter between ~ 200 and ~ 300 nm by using CS concentrations ranging from 0.5 to 1.5 mg/mL and TPP concentrations below 0.2 mg/mL. Close inspection of the contour plot also shows three conspicuous regions with sizes above ~ 600 nm, which correspond to specific compositions of CS and TPP, namely region 1, ≤ 0.9 mg/mL CS and ≥ 0.25 mg/mL TPP; region 2, 0.9-1.1 mg/mL CS and ~ 0.3 -0.4 mg/mL TPP; and region 3, ≥ 1.1 mg/mL CS and > 0.3 mg/mL TPP (white dotted lines in **Figure 1A**). **Figure 2B** shows that low polydispersity was achieved in the PDI range of 0.2-0.3 for CS concentrations of 0.5-1.5 mg/mL and TPP concentrations below 0.2 mg/mL. Similarly to **Figure 2A**, the contour plot in **Figure 2B** displays two main regions of high polydispersity, PDI between ~ 0.5 -1, which correspond to the following CS and TPP combinations: region 1, ≤ 0.7 mg/mL CS and ≥ 0.25 mg/mL TPP and region 2, ~ 0.7 -1.1 mg/mL CS and > 0.35 mg/mL TPP (white dotted lines in **Figure 1B**). **Figures 2C** and **2D** summarize the dependence of the size and PDI, respectively, on CS:TPP mass ratios. The figures show that it was possible to obtain PC-NPs with an average diameter ranging from 100-250 nm and a low PDI values, ~ 0.1 -0.2, under a wide range of CS:TPP mass ratios (2.6:1 to 9:1). PC-NPs could be easily dispersed in water, as has been reported for NPs prepared from CS of similar DA^{58,59}. Two PC-NP prototypes displaying optimal size and PDI (indicated by black circles in **Figures 2C** and **2D**) were obtained with CS:TPP mass ratios of 3.5:1 and 2.6:1, respectively. These prototypes were designated as PC-A and PC-B and were selected for further studies.

The PC-A and PC-B prototype formulations were prepared by upscaling the PC-NP preparation method to 10-mL batches with a production yield of 44.5 and 40.9%, respectively (see Materials and Methods). The physicochemical characteristics of the PC-NP batches

were analyzed by DLS-NIBS both before and after isolation (see Materials and Methods).



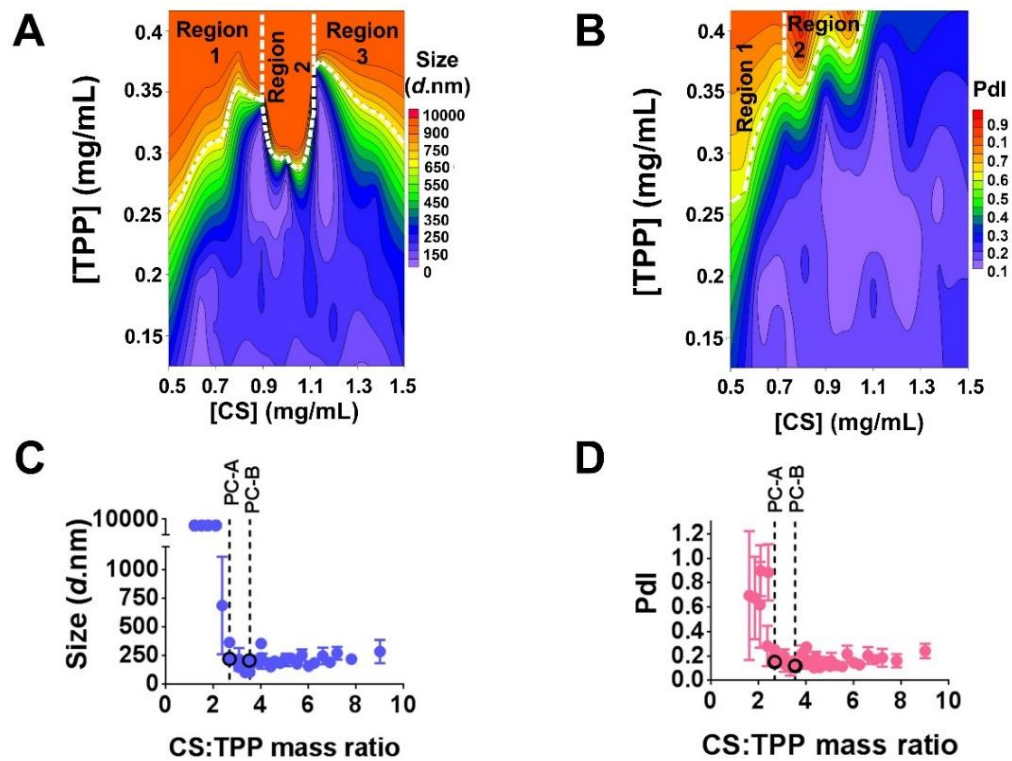


Figure 2. Dependence of the size and Pdl of PC-NPs on CS:TPP mass ratio

Legend Figure 2. Dependence of the size and Pdl of PC-NPs on CS:TPP mass ratio. A and B. Contour plots showing the dependence of the size (A) and Pdl (B) of PC-NPs on the CS and TPP concentrations. [CS] = 0.5 - 1.5 mg/mL; [TPP] = 0.1-0.4 mg/mL; CS:GNP mass ratio = 1:0.06. White dotted lines in panels A and B show representative size and Pdl regions (see text). C and D. Variation of PC-NP size (C) and polydispersity (D) as a function of the CS:TPP mass ratio. Dotted lines show the CS:TPP mass ratios 2.6:1 and 3.5:1, which correspond to the PC-NP prototypes PC-A and PC-B (black circles), respectively. Data represent the mean and standard deviation of three replicates. All measurements were conducted in water at 25±0.2 °C.

Figure 3 shows the polydispersity and the average diameter of PC-A (**Figure 3A**) and PC-B (**Figure 3B**), before and after their isolation (cyan and orange plots, respectively). As shown in **Figure 3A**, PC-A underwent a reduction in Pdl after isolation, going from ~0.1 to ~0.04 (upper left y-axis). Yet, the average diameter remained stable (average diameter = 123.4 ± 6.6 nm and 124.0 ± 4.0 nm, for the non-isolated parent batch and the isolated batch, respectively). The bottom panels in **Figure 3A** show a slight reduction in the width of the size distribution for isolated PC-NPs, relative to their parent batch. As shown in **Figure 3B**, the parent batch of non-isolated PC-B is characterized by a lower Pdl than that of PC-A, with a slight Pdl increase after isolation, namely from ~0.02 to ~0.04 (upper right y-axis). Parent PC-B NPs are, on the other hand, slightly larger than their PC-A counterparts, with an average diameter of 140.8 ± 3.2 nm before and 128.7 ± 2.5 nm after isolation. The bottom panels in **Figure 3B** reveal no important differences between the size distributions of parent and isolated PC-B batches. As expected, both PC-A and PC-B showed a marked positive ζ -potential (~+33 mV, data not shown), which is consistent with the presence of charged amine groups from CS exposed to the PC-NP surface^{60,61}.

6.4.3. PC-NP stability in M9 minimal medium

To evaluate the physical stability of PC-NPs designed for microbiological assays, we monitored particle size evolution during PC-NP incubation in our bioassay medium (see Materials and Methods). The chosen time range for these experiments, 335 min, was not arbitrary, as it spanned the duration of our typical bioassays with the *E. coli* biosensor (see below). Size and polydispersity plots in **Figure 4** revealed that both PC-A (**Figure 4A**) and PC-B (**Figure 4B**) remain fully stable during incubation in microbiological medium. The

low PDI values between 0.06-0.1 confirmed that no aggregation or particle-growth took place during the incubation. **Figures 4C** and **4D** show that DLS-NIBS size distributions remained changeless over time in both cases.

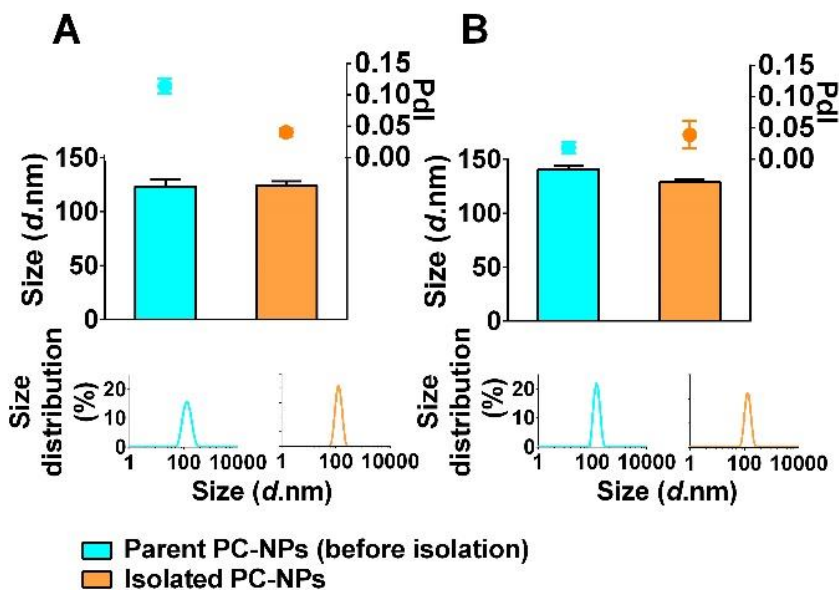


Figure 3. Physico-chemical characterization of PC-NPs. **A** and **B**. Size and polydispersity of the parent batch before (cyan) and after (orange) isolation of PC-A (**A**) and PC-B (**B**) NPs. Bars represent mean size (left y-axis), whereas dots represent PDI values (upper right y-axis). Data represent the mean and standard deviation of three replicates. Bottom panels show representative DLS-NIBS size distribution plots for both PC-NP prototypes before and after isolation. All measurements were conducted in water at 25 ± 0.2 °C.

6.4.4. Evaluation of the activity of PC-NPs using a fluorescence *E. coli* biosensor

To analyze the QQ activity of PC-NPs, we used an *E. coli* biosensor that displays GFP fluorescence in response to external AHL⁵¹, as we did in Chapter 2. When endpoint measurements are considered, both PC-A (**Figure 5A**) and PC-B (**Figure 5B**) promoted a significant reduction in the normalized fluorescence response of the biosensor, FI/OD_{600} . Comparison of **Figures 5A** and **5B** indicates that PC-B is

slightly more active than PC-A, with relative reductions of endpoint FI/OD₆₀₀ in the ranges of ~50-92% and ~35-85% of the control intensity, respectively. The endpoint measurements show the lack of a clear dose-dependent reduction of the response. **Figures 5C** and **5D** show the effect of PC-A and PC-B treatments on the growth rate of the *E. coli* biosensor (see also **Figure S3**). Both PC-NP prototypes promote

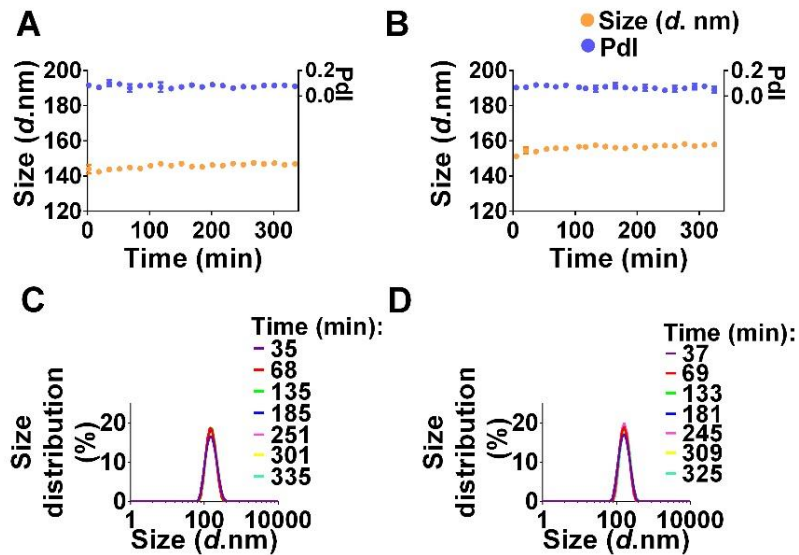


Figure 4. Stability of PC-NPs in bioassay medium. A and B. Variation in size (orange dots; left y-axis) and in PDI values (blue dots; right y-axis) of PC-A (A) and PC-B (B) upon incubation at 37 °C in bioassay medium. Data represent the mean and standard deviation of three replicates. C and D. Representative DLS-NIBS size distributions of PC-A (A) and PC-B (B) at different times of incubation. All measurements were conducted in supplemented M9 minimal medium at 37±0.1 °C.

a significant reduction in growth rate that, much like the reduction in normalized fluorescence, is not proportional to the administered dose. Comparison of **Figures 5A** and **5B** to **5C** and **5D** shows that the magnitude of the growth impairment exerted by PC-NPs is much smaller than their effect on normalized fluorescence. Notably, CLSM imaging of the biosensor was consistent with the notion that the PC-NP-dependent decrease in fluorescence was much more accused than

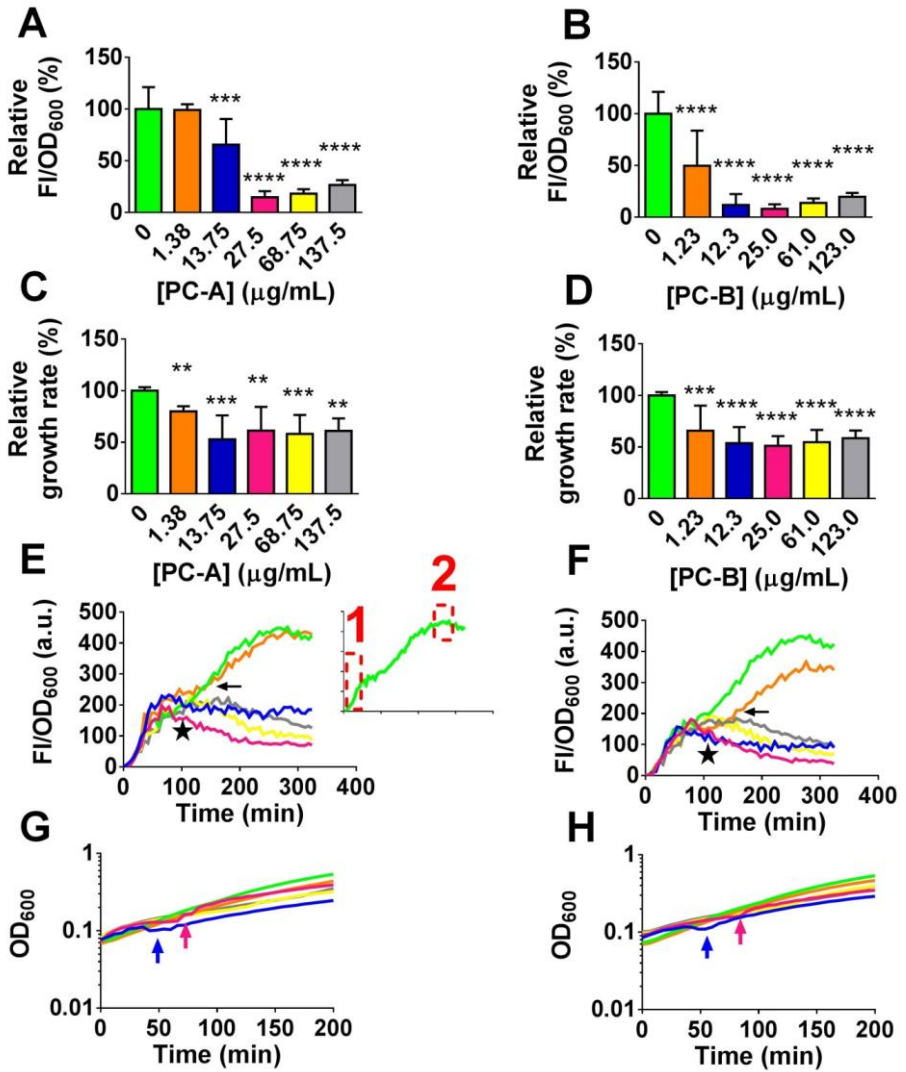


Figure 5. Effect of PC-NPs on the QS-based fluorescent response and the growth of the *E. coli* biosensor.

Legend Figure 5: Effect of PC-NPs on the QS-based fluorescent response and the growth of the *E. coli* biosensor. **A and B.** Endpoint FI/OD₆₀₀ responses of the biosensor after treatment with various doses of PC-A (A) and PC-B (B) for 60 min prior to the addition of AHL. Data represent the mean and standard deviation of two independent experiments with three biological replicates each. P values are indicated as follows: **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$. **C and D.** Endpoint effect of PC-A (C) and PC-B (D) treatments on the biosensor's growth rate. The mean and standard deviation of three independent experiments with three biological replicates each is shown. **E and F.** Representative FI/OD₆₀₀ average traces of cultures treated with PC-A (E) and PC-B (F). The averages were obtained from a single experiment with three biological replicates. The traces are color coded as in A and B. For the sake of clarity, no error bars are shown (but see insets in **Figure 6** and **Figure S6**). Inset in panel E shows the typical biphasic response of non-treated cells. Box "1", initial burst of fluorescence. Box "2", fluorescence maximum. Arrowheads indicate the fluorescence recovery phases described in the text. Stars in panels E and F show the fluorescence dilution phase described in the text. **G and H.** Average growth curves for biosensor cells pre-treated with PC-A (G) and PC-B (H) prior to the addition of AHL. Arrowheads indicate the PC-NP-induced "shoulders" described in the text. The traces represent the mean of a single experiment with three biological replicates and are colour coded as in E and F. For the sake of clarity, no error bars are shown (but see **Figure S3**). P values are indicated as follows: **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; ****, $p \leq 0.0001$.

the antimicrobial effect (cf. **Figure S4A and B**). The plots shown in **Figures 5A-D** fail to reveal the dynamics of the effect of PC-NPs on the growth and response of the biosensor. While we saw a significant degree of variation from experiment to experiment, careful inspection of the average FI/OD₆₀₀ traces (**Figures 5E and 5F**, see also **Figures S5-S7**), yields the following conclusions. First, in the absence of PC-NPs, the biosensor displays a biphasic response with a clear initial burst of fluorescence (see red-framed area "1" in inset in **Figure 5E** and also **Figures 5F, S5-S7**). Following this initial burst, the control response steadily grows to reach a maximum of fluorescence at about ~250 min (see red-framed area "2" in the inset in **Figure 5E** and also **Figures 5F, S5-S7**). The burst was followed by a phase of fluorescence dilution at most of the PC-NP concentrations tested (black star in **Figures 5E and 5F**). At low PC-NP concentrations, a recovery phase is sometimes visible (horizontal arrow in **Figures 5E and 5F**, but see also **Figures S5-S7**). **Figures 5G and 5H** show the average OD₆₀₀ traces during the initial 200 min of incubation after AHL addition. Starting at a concentration of 13.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubation of the biosensor with PC-NPs resulted in curves displaying "shoulders" (arrows in **Figures 5G and**

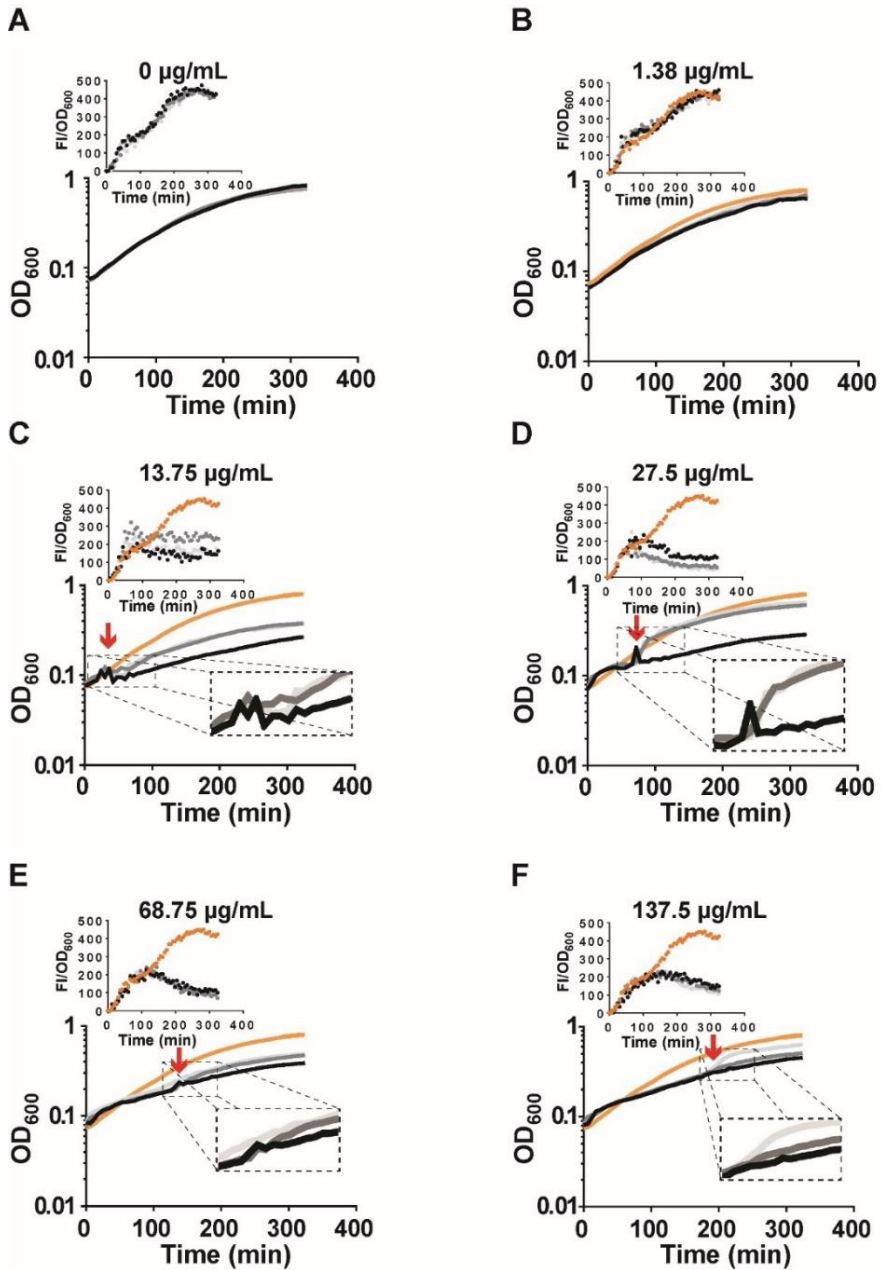


Figure 6. Growth of the biosensor in the presence of increasing PC-A concentrations

Legend Figure 6: Growth of the biosensor in the presence of increasing PC-A concentrations (A-F). The individual traces corresponding to the three replicates from a single experiment are shown with shades of gray. Orange traces: no NP controls. Boxes show enlarged views of the “shoulders”. X axis: time in min. Y axis: OD₆₀₀. Insets show the corresponding plots of FI/OD₆₀₀ vs. time for each treatment.

5H, Figure 6). To better illustrate the nature of the PC-NP-induced “shoulders”, in **Figure 6** we show the individual traces from all the three biological replicates, together with the average control trace. The boxes in **Figure 6** show that the “shoulders” observed in the average OD₆₀₀ traces are related to the existence of PC-NP-dependent anomalies in the OD₆₀₀ readings at certain times during growth (**Figures 6C-F** see also **Figure S5**). While there existed a significant degree of experiment-to-experiment variation regarding the magnitude of the anomalies in the growth kinetics of the PC-NP-treated cultures, the dose-dependence in the timing of the anomalies was very reproducible (**Figure 6**; see also **Figure S5-S7**). This dose dependence is more clearly illustrated in **Figure 7**, which shows the relationship between the time of onset of OD₆₀₀ anomalies and the concentration of PC-NPs. Strikingly, the data for both PC-A and PC-B can be easily fitted to hyperbolic curves, typical of dose-response relationships. The slightly steeper curve of PC-B is consistent with the higher inhibition of FI/OD₆₀₀ displayed by these NPs in endpoint QQ measurements (cf. **Figure 5A** and **5B**). Of note, in the same assays, we also observed cell aggregates in the presence of the NPs (**Figure S8**), in agreement with previous studies (Chapter 2 and 62,63).

6.5. DISCUSSION

In Chapter 2, we have reported that TPP-crosslinked NPs (ionically crosslinked; IC-NPs) displayed substantial QQ activity despite their inherent colloidal instability in microbiological medium. We also showed that additional GNP-crosslinking of IC-NPs resulted in more stable NPs (co-crosslinked; CC-NPs), albeit with a substantial loss of their QQ activity. This has motivated us to explore novel strategies to improve the physicochemical properties of IC-NPs while maintaining their QQ activity. In this Chapter, we have addressed a new method for the fabrication of TPP-crosslinked NPs in which the pre-crosslinking of

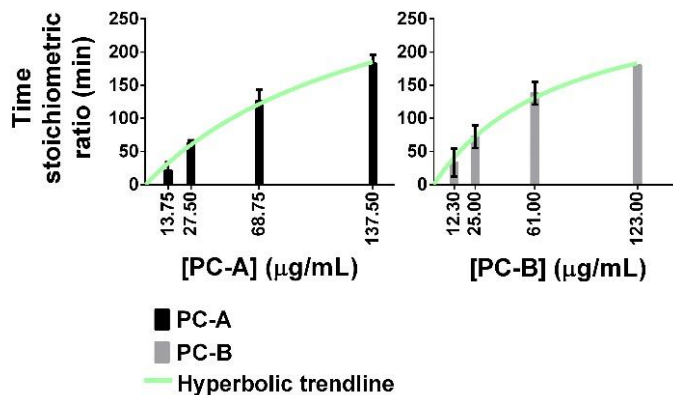


Figure 7. Dose dependence of the OD_{600} anomalies. The time (in min) needed to reach the “shoulder region” at increasing PC-NP concentrations is shown for PC-A (black bars) and PC-B (gray bars). The times were estimated from visual examination of the OD_{600} vs. time plots shown in Figures 6 and S5-S7, considering that the “shoulder region” was reached once the individual traces diverged from one another (close-up boxes in Figures 6 and S5-S7). Data represent the mean and standard deviation of two independent experiments with three replicates each. The green line shows the approximation of the data to a hyperbolic curve (GraphPad Prism version 6.0).

CS with GNP was followed by NP formation by conventional ionotropic gelation in the presence of TPP.

The most surprising aspect of the observed data of our study is that when the pre-gelled GNP/CS mix (GNP:CS mass ratio 0.06:1.0) was further ionotropically crosslinked by controlled addition of TPP (over a wide CS:TPP mass ratio of 2.6:1 to 9:1), the system turned into NPs of small conserved diameters (~100-150 nm) and low polydispersity (~0.1-0.2). To account for this phenomenon, we suggest the following. NP formation is the consequence of two separate physicochemical processes. Firstly, gelling by the creation of small nanoclusters resulting from the crosslinking of CS by GNP. Given the fact that the reaction was left to proceed to near equilibrium (72 h, Fig 1D), we can regard the gelling process to be under thermodynamic control⁴⁹. The entropic cost due to the loss of CS conformational mobility, as a result of the introduction of covalent “knots” between the polymer chains during the crosslinking process, is compensated by an overall gain in enthalpy

from the formation of new chemical bonds and the favorable solvation of $-\text{NH}_3^+$ groups, preferentially oriented at the surface of the GNP-driven nanoclusters. As a result, a net decrease in surface free energy is obtained during gelling. Secondly, the addition of TPP to the incipiently gelled solution results in the shielding of the positively charged free amino groups in CS, leading to the condensation of the pre-gelled clusters into small discrete particles. The addition of TPP likely displaces the equilibrium and further contributes to the loss of polymer conformational mobility and the entropically unfavorable uneven partitioning of TPP within the CS-GNP pre-gelled clusters and the solvent. This could potentially drive the system into phase segregation of the clusters, as recently argued⁴⁹. However, the vast entropy loss due to the tendency of a limiting amount of TPP ions to partition into the CS phase is counteracted by an overall reduction in particle size and, consequently, lower surface free energy, thus maintaining the system as a one-phase suspension. This overall hypothesis is consistent with results observed in CS-dextran sulfate nanocomplexes, where decreasing the kinetic control of the particle formation while favoring a thermodynamically (i.e., equilibrium) controlled process is required to achieve NPs of high colloidal stability⁶⁴.

In summary, we assume that the process described here for the fabrication of CC-NPs leads to the formation of dense small colloidal particles stabilized by the presence of surface positive charges and by conformationally “frozen” polymer loops. Both features contribute concomitantly to electrostatic repulsion and steric stabilization of the system. A schematic view of the proposed model is shown in **Figure 8**. Future biophysical studies such as TEM and AFM imaging, synchrotron SAXS, and asymmetric-flow field flow fractionation studies, will help deepen our understanding of the structure of these materials. Even when the precise chemical mechanism at play during PC-NP synthesis remains to be fully elucidated, one practical implication of our new protocol was to uncover a new fabrication protocol of physicochemically stable NPs.

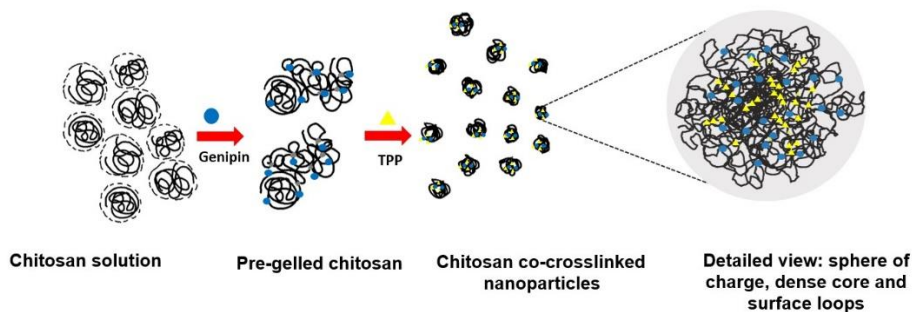


Figure 8. Model of formation of PC-NPs showing the two steps of crosslinking with GNP and TPP and details of the structure and surface topology of the furnished NPs.

When compared to our previous fabrication method (**Chapter 2**), our new strategy offers a simplified and highly reproducible procedure to obtain PC-NPs with a satisfactory yield and improved physicochemical properties such as size, ζ -potential, and stability in biological medium (summarized in **Table 1**). The resulting PC-NPs had overall small diameter (~ 150 nm) and low PDI values (~ 0.1 - 0.3) from a wide range of relative CS:TPP mass ratios. GNP pre-crosslinking also makes the fabrication protocol much more straightforward and reliable. Crucially, the new protocol reduces the centrifugation steps used to isolate NPs from non-crosslinked CS (**Chapter 2** and ^{50,65}). As a result, the reproducibility of the fabrication method was greatly improved. We believe that the improved characteristics of PC-NPs, relative to related NPs (**Chapter 2**), are likely due to a minimization of TPP induced aggregation ^{55,57}. The notable stability of PC-NPs in bacterial culture medium (pH 6.9) also coincides with that of core-shell CC-NPs, which also contain GNP and TPP but that underwent a different fabrication process, leading to distinct properties (see **Chapter 2** and below). This stability, we argue, is the result of the combination of the covalent crosslinking and the ionotropic gelation used to fabricate these NPs as explained above. Altogether, the furnished PC-NPs (and CC-NPs) resist the tendency to disassemble and to inexorably aggregate that is observed with classical CS NPs (IC-NPs) in physiological media (pH ~ 7.0 ; see **Chapter 2** and ⁶⁵). Undoubtedly, to be stable in bacterial

medium is a major asset of PC-NPs, also shared by CC-NPs (**Chapter 2**). Future work and microscopic analysis should explore whether the tow-step, raspberry-like organization of NPs described by Huang and Lapitsky⁵⁵ and proposed for the related CC-NPs (**Chapter 2**) also applies to PC-NPs. On the same note, the possibility that PC-NPs may have a core-shell structure, as described for CC-NPs (**Chapter 2**), should also be explored.

We showed that PC-NPs display moderate antimicrobial activity, as judged by decreased OD₆₀₀ readings, and strongly interfere with the QS-based fluorescence activity of the *E. coli* biosensor (**Figures 5-6**). Since the fluorescence measurements have been normalized to cell density (FI/OD₆₀₀), the simple idea that the antimicrobial effect of our NPs might be responsible for the fluorescence decrease does not hold. On the contrary, the results show that the decrease in fluorescence was of greater magnitude than the OD₆₀₀ drop caused by the antimicrobial effect. Preliminary CLSM trials confirmed the existence of a drastic decrease in per-cell fluorescence at the single-cell level (cf. **Figure S4A** and **S4B** and **Figure S4C** and **S4D**) that was not accompanied by a parallel reduction in cell numbers (**Figure S4E**). This observation is in good agreement with the idea that the decreased OD₆₀₀ values and reduced fluorescence are separate effects of PC-NP treatment. Indeed, it is even possible that the magnitude of the antimicrobial effect is an artifact caused by PC-NP-induced bacterial aggregation, as suggested in **Chapter 2**. Qin et al. have previously shown that the addition of CS NPs and nanocapsules (NCs) to bacterial cultures often results in growth anomalies (**Chapter 2** and ⁶²), such as those observed here (**Figure 6**). In the case of CS NCs, Qin et al. were able to show that only a limited number of NCs could electrostatically bind per bacterial cell, leading to the concept of the *stoichiometric ratio* (SR) of NC/bacterium⁶². At this NC/bacterium ratio, the negative ζ -potential of the bacterial envelope is compensated by the positive charge of the NPs⁶². Increasing the NC concentration beyond the SR resulted in no further NP binding⁶². They have also shown that the SR is accompanied by maximal, NC-induced cell aggregation⁶². We believe that the OD₆₀₀ growth anomalies in the form of “shoulders”, observed in the presence

Table 1. Physico-chemical characteristics of our CS-NPs (this and our previous work in Chapter 2)

	IC-NPs (Chapter 2)	CC-NPs (Chapter 2)	PC-NPs (PC-A) (this Chapter)
Size in water (<i>d</i> .nm)	617 ± 232	151 ± 8	124 ± 4
Size in M9 medium ³ (<i>d</i> .nm)	N/A ⁴	226 ± 19	147 ± 1
ζ (mV)	+25 ± 6	+20 ± 2	+33 ⁵
Pdl	0.1 - 0.2	0.1 - 0.2	0.03 - 0.05
Production yield (%)	40 ± 8 ⁶	40 ± 8 ⁴	50 ± 1
QQ activity	High	Moderate	High
Antimicrobial activity	Yes	Yes	Yes
Cell-density dependent activity	N/A	N/A	Yes
Fabrication steps	2	4	3

³ After 6 h incubation in M9 minimal medium at 37 °C.

⁴ IC-NPs were unstable in M9 minimal medium at 37 °C, and there is no reliable DLS data available.

⁵ The measurement was performed only once.

⁶ Production yield was estimated for the parent-non-isolated batch of IC-NPs before obtaining isolated IC- and CC-NPs (Chapter 2).

Data, excepting ⁽³⁾ represent the mean and standard deviation of 3 (this Chapter) to 9 replicates (Chapter 2).

of intermediate concentrations of PC-NPs (**Figures 5G and 5H, Figure 6, and Figures S5-S7**), are likely related to cell aggregation and to the concept of SR, as described by Qin et al.⁶². Indeed, we have observed bacterial aggregation in the presence of PC-NPs (**Figure S8**), further lending support to the hypothesis that our OD₆₀₀ readings might not accurately reflect the actual cell density of the treated cultures. This interpretation would shed some light on the conspicuous lack of dose-dependence during PC-NP treatment of biosensor cells, that was already noted in **Chapter 2**, and that is clearly illustrated by the endpoint results of **Figure 5**. Here, we have further investigated these growth anomalies by timing their onset at different NP concentrations. When this was done, dose dependence relative to NP concentration became apparent, as shown in **Figure 7**. While we have observed relatively high levels of experimental variation (see **Figure 6 and Figures S5-S7**), a trend is evident in which “shoulder” formation occurs at longer times as NP concentration increases. To explain this dose dependence at the onset of the growth anomalies, we will return to the SR concept. Since at constant NP concentrations, growing bacteria will find themselves at decreasing NP/bacterium ratios⁶², we reasoned that PC-NP-induced aggregates produced at NP/bacterium ratios higher than the SR (early during growth) would be disrupted as these ratios became smaller than the SR. The dependence of the SR on cell density, together with its potential involvement in the appearance of OD₆₀₀ anomalies, implies that the time at which a growing bacterial population encounters its SR must increase with NP concentration (i.e., strictly, on the number of particles per unit volume). This prediction is fulfilled by the results of **Figure 7**, which open up the possibility of targeting bacteria at different stages of growth by carefully tuning the concentration of PC-NPs to the desired bacterial density. For example, PC-NPs could be engineered for the precise release of bioactive molecules at a certain stage of bacterial growth. A full understanding of the role of cell aggregation in the appearance of the growth anomalies is required before this possibility can be developed into a new technological approach for density-dependent bacterial manipulation.

PC-NPs displayed a QQ activity that is comparable to those of the ionically crosslinked IC-NPs and raw CS preparations (**Table 1**, see

also **Chapter 2** and ^{62,63}). Interestingly, the QQ activity of the dually crosslinked CC-NPs was much lower (**Table 1**), further attesting to the significance of the new fabrication method reported here. While the actual mechanism of QS inhibition has not been described for any of these CS-based materials, it is reasonable to think that a mode of action common to the three types of systems could explain their QQ activity. Using the PC-NPs described here as a representative example for all these materials, one could argue that NP binding to the bacterial envelope may affect the uptake of nutrients and, as a result, the apparent QQ activity would merely be the consequence of a general metabolic impairment. As discussed above, the reduced OD₆₀₀ values obtained in the presence of PC-NPs might not reflect decreased growth, at least not to the levels suggested by the plots of **Figure 5**. Strikingly, the initial slope of the burst in the fluorescence response curve (first 100 min after induction with AHL) obtained in the presence of PC-NPs is not different from those obtained in the absence of NPs. This is despite the fact that treated cells had been pre-incubated with PC-NPs for an hour before induction (see **Figures 5E-F** and insets of **Figures 6** and **S5-S7**). This observation is in clear disagreement with the idea that metabolic arrest was the main cause of the observed PC-NP-induced, endpoint reduction in FI/OD₆₀₀, as one would expect to see slower fluorescence accumulation immediately after AHL induction in metabolically arrested cells. In an alternative QQ mechanism, NPs could act as “chemical abductors”, by sequestering AHL from the medium. However, the absence of dose-dependence associated with the QQ activity displayed by PC-NPs is in clear disagreement with their potential “AHL abducting” ability. This very lack of dose dependence, especially during the initial burst phase, also rules out a simple mechanism in which the coating of the external envelope with CS-NPs made the cells impermeable to AHLs. Perhaps the explanation of the QQ activity of PC-NPs might have to do with the direct perturbation of the QS machinery of the biosensor by the binding of CS-NPs to the bacterial envelope ^{62,66–68}. Kolibachuck and Greenberg published in 1993 a report in which they described LuxR as a membrane-associated protein in its native *Aliivibrio fischeri* host ⁶⁹. This result was later confirmed for other related QS activators ^{69,70}. Considering these

observations, the idea that a potential interference of envelope-bound, CS-based NPs with the membrane localization of LuxR could provide a reasonable explanation to our results. Despite the intrinsic appeal of this hypothesis, many issues remain to be elucidated, not the least of which is whether LuxR membrane localization holds true in the *E. coli* biosensor. Finally, while this and our previous work in **Chapter 2** demonstrate the QQ potential of CS-based NPs, it remains to be seen whether this potential is applicable only to *luxR*-based systems or, by the contrary, if it could be expanded to other types of QS networks. Testing the QQ activity of both PC-NPs and CC-NPs against bacterial pathogenic Gram-positive strains such as *Staphylococcus aureus*⁷¹ and *Streptococcus mutants*⁷², for which QS is known to be regulated by signaling peptides and membrane-associated receptors, could be considered in future studies. The possibility to inhibit biofilm formation in these type of bacteria could hold great promise. Also, CS-based NPs could bear an enormous potential as biodegradable, antibiotic-free and antibacterial strategies that can be used against pathogenic multidrug resistant pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, among other^{76,77}.

6.6. SUPPORTING INFORMATION

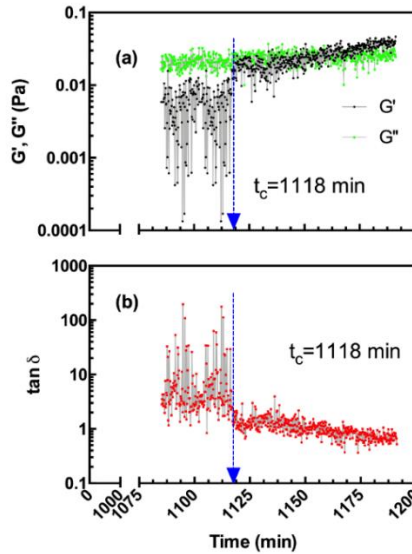


Figure S1. Variation of the viscoelastic moduli, G' and G'' (a), $\tan \delta$ (b), during the crosslinking reaction of chitosan with genipin at 37 °C in 85 mM NaCl. Genipin: Chitosan mass ratio 0.06:1.0; chitosan concentration 2 mg/m; $\omega = 1$ Hz, $\gamma = 1\%$. The arrow in both plots indicates the rheological critical gel time ($t_{gel-rheo}$).

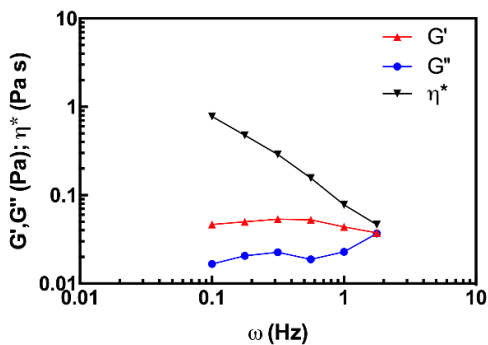


Figure S2. Variation of the viscoelastic moduli, G' and G'' and η^* with frequency after 1191 h of chitosan crosslinking with genipin at 37 °C in 85 mM NaCl. Genipin: Chitosan mass ratio 0.06:1.0; chitosan concentration 2 mg/m; $\gamma = 1\%$.

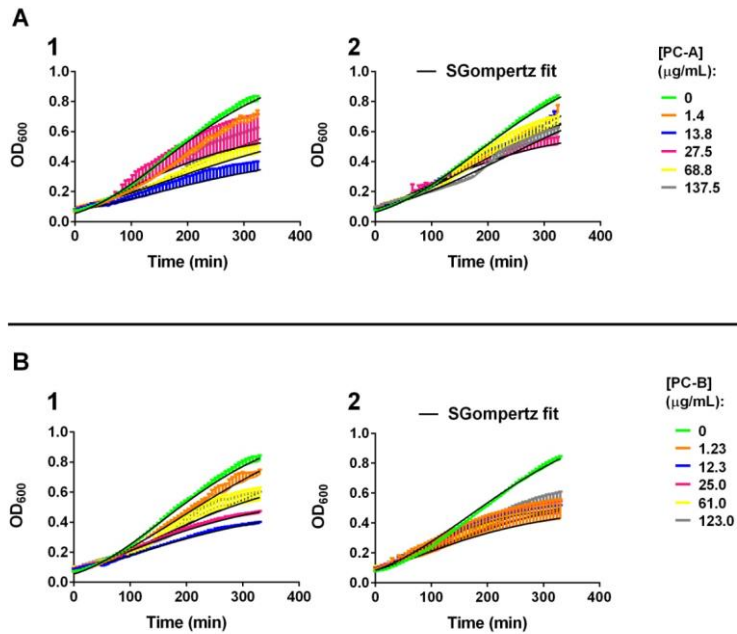


Figure S3. Growth of the biosensor in the presence of various doses of PC-A (A) and PC-B (B). The results of two independent experiments are shown (1-2). X axis: Time in min. Y axis: OD_{600} . Data represent the mean and standard deviation of three biological replicates per experiment. For the sake of clarity, only one-sided error bars are shown. Solid line shows the best-fit of the experimental data to the SGompertz function (see Materials and Methods)

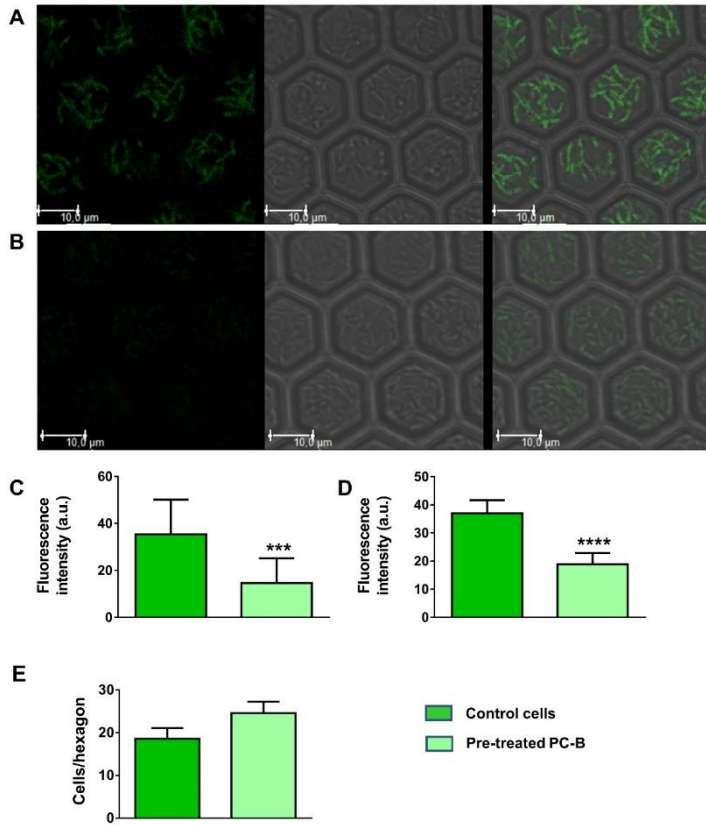


Figure S4. Fluorescence imaging of the *E. coli* biosensor in the presence of AHL and PC-NPs. **A** and **B**. Representative CLSM micrographs showing the fluorescent response of control biosensor cells (**A**) and of cells incubated with PC-B (**B**). Left panels: GFP-channel ($\lambda_{ex}= 488$ nm and $\lambda_{em}= 500-600$ nm), middle panels: bright field channel, right panels: overlay. **C**. Quantification of the PC-B effect in cells present at the bottom of the imaging dishes. The plot shows the mean and standard deviation of the fluorescence intensity from 102 ROIs (control cells) and from 119 ROIs (treated cells). **D**. Quantification of the PC-B effect as observed in z-series spanning the whole width of the culture (See also Movies S1 and S2). The plot shows the mean and standard deviation of the fluorescence intensity from single cells from 7 z-series with 20-33 ROIs each (control cells) and 7 z-series with 20-24 ROIs each (treated cells). **E**. Quantification of the PC-B effect on cell numbers. The plotted data represent the average cell number and its associated standard deviation in control and NP-treated cultures. 15 control and 31 NP-treated hexagonal wells were measured. A single experiment is shown.

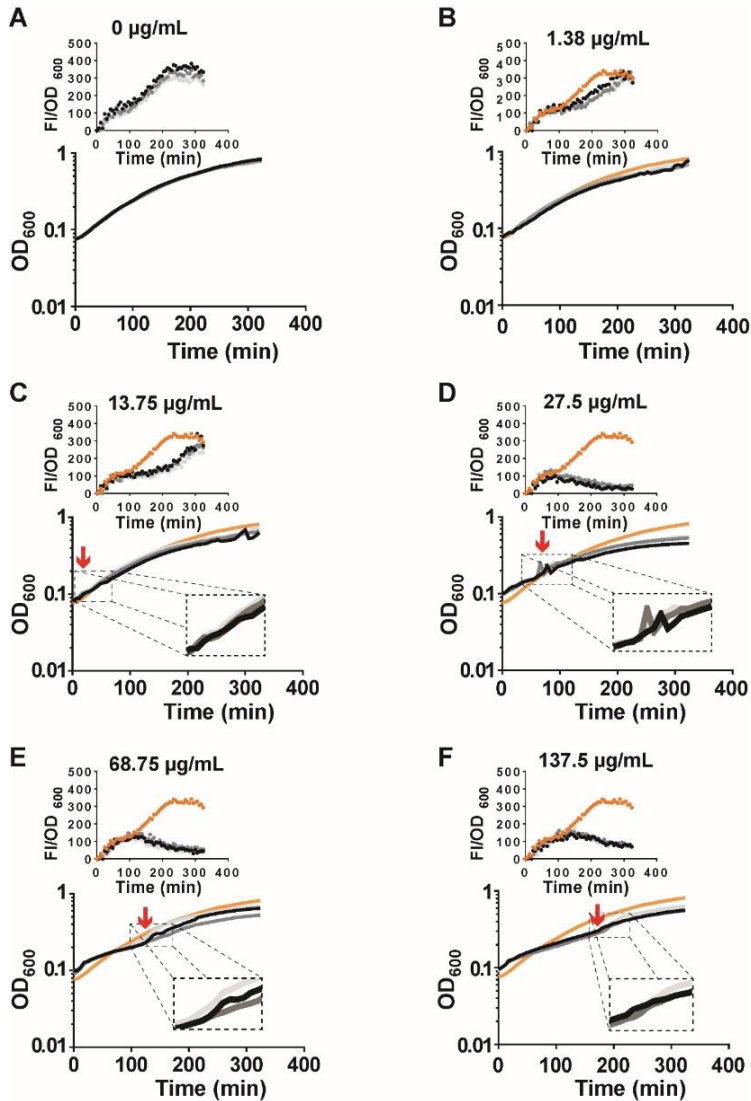


Figure S5. Growth of the biosensor in the presence of increasing PC-A concentrations (A-F). The results shown here are from a similar, but independent, experiment to that of **Figure 6** in main text. The individual traces corresponding to the three replicates from a single experiment are shown with shades of gray. Orange traces: no NP controls. Boxes show enlarged views of the “shoulder regions”. X axis: time in min. Y axis: OD_{600} . Insets show the corresponding plots of FI/OD_{600} vs. time for each treatment. Solid dots: average FI/OD_{600} . Shadowed areas: standard deviation.

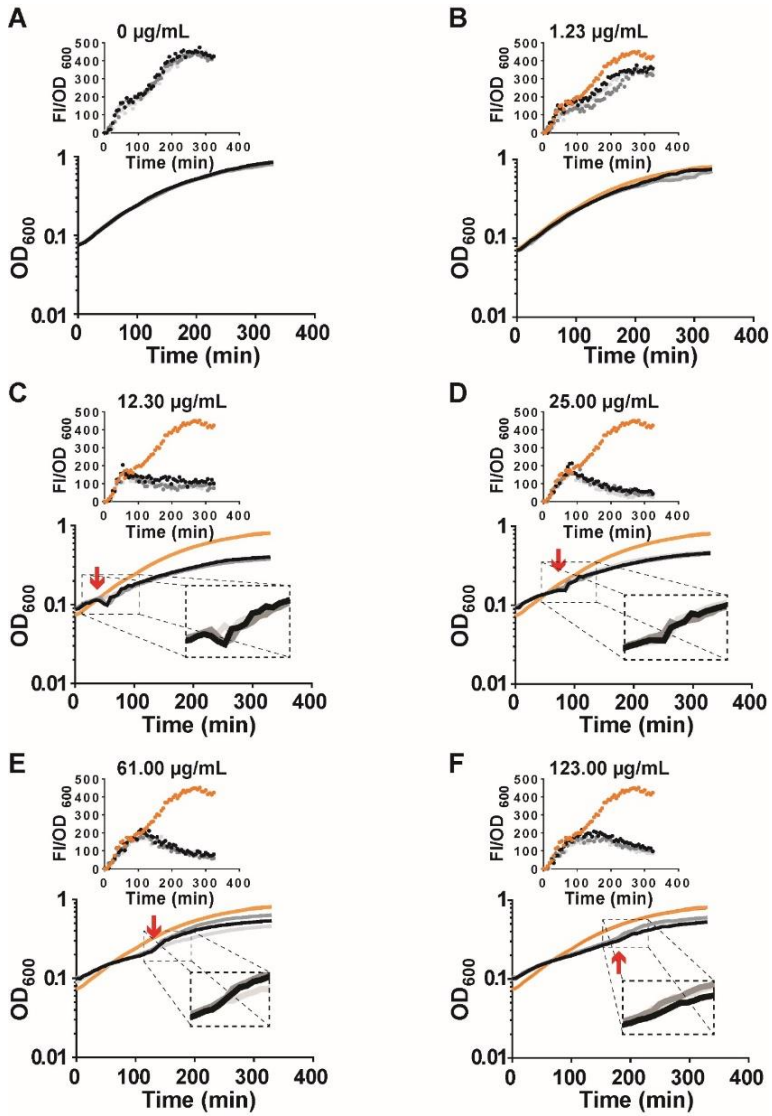


Figure S6. Growth of the biosensor in the presence of increasing PC-B concentrations (A-F). The results shown here are from a similar, but independent, experiment to that of Figure S5. See legend to Figure S5 for more details.

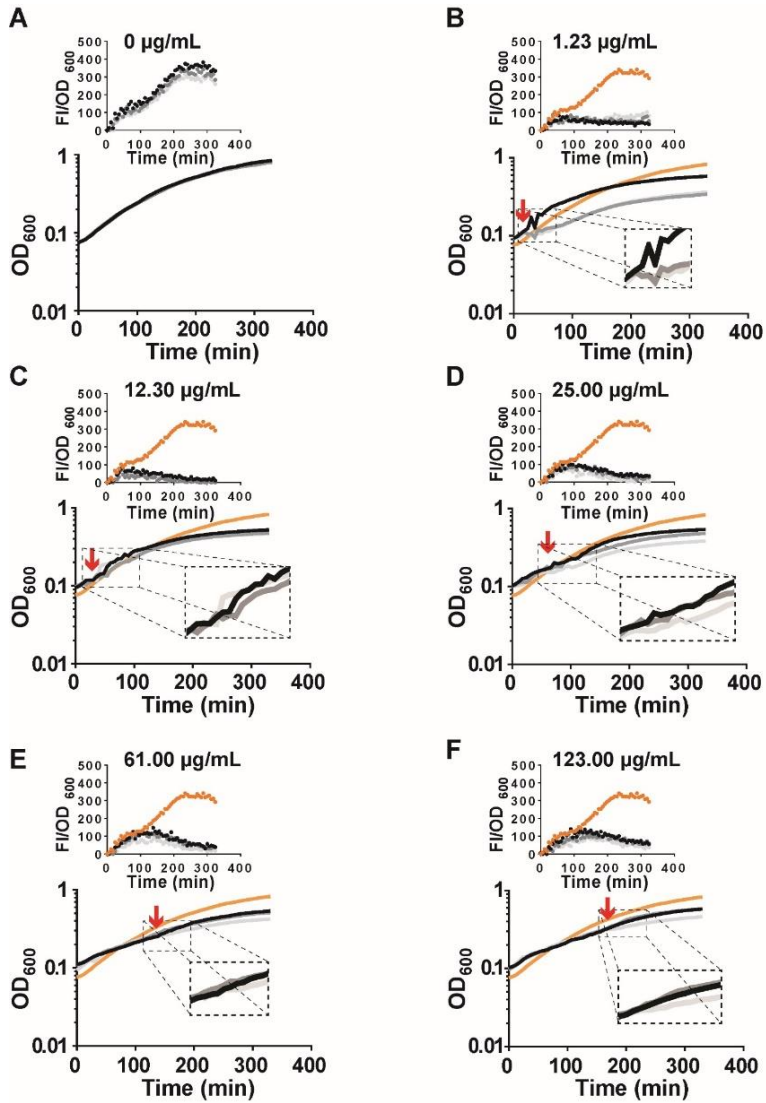


Figure S7. Growth of the biosensor in the presence of increasing PC-B concentrations (A-F). The results shown here are from a similar, but independent, experiment to that of Figures S5 and S6. See legend to Figure S5 for more details.

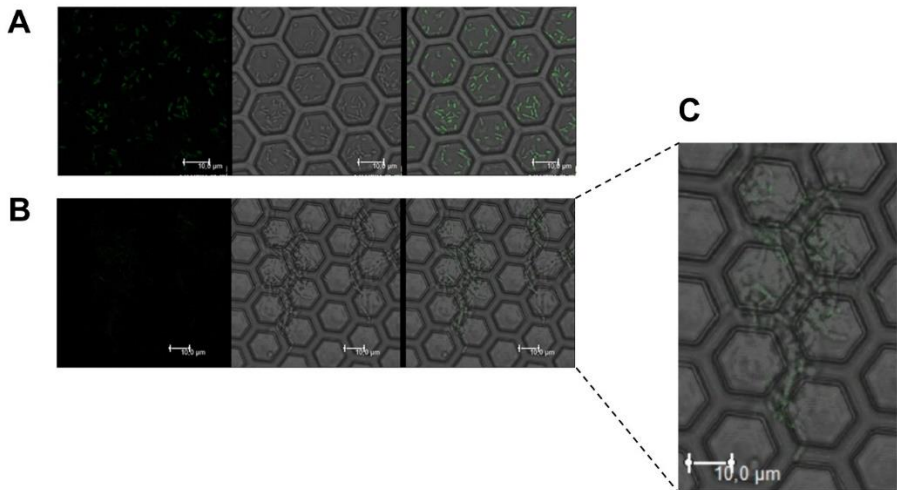


Figure S8. PC-NP-promoted cell aggregation. A. Control cells. B. PC-B treated cells. C. Enlarged view of B showing a typical cell aggregate observed in cultures treated with PC-B NPs.

USM
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Table S1. Microplate design for the fabrication of GNP-pre-crosslinked CS-TPP NPs (PC-NPs) by ionotropic gelation. The PC-NPs were prepared according to the general ionotropic gelation protocol described by Calvo et al. ⁶ with some modifications. First, a GNP-crosslinked CS pre-gel was prepared at a GNP:CS mass ratio of 0.06:1, as explained in Materials and Methods. The GNP-crosslinked CS pre-gel was sub-diluted with 85 mM NaCl at CS concentrations ranging from 1-2 mg/mL and working solutions of TPP were also prepared in 85 mM NaCl (0.5-0.83 mg/mL). Aliquots of the two components were mixed in a 96-well micro plate in order to obtain PC-NPs with CS:TPP mass ratios ranging from 1.60:1 to 9.00:1.

Code	[CS-GNP stock] (mg/mL)	[TPP stock] (mg/mL)	CS volume (μ L)	TPP volume (μ L)	CS mass (mg)	TPP mass (mg)	Total volume (μ L)	Final [CS] (mg/mL)	Final [TPP] (mg/mL)	CS:TPP mass ratio
1IA	1,00	0,50	210,00	70,00	0,21	0,04	280,00	0,75	0,13	6.00:1
1IB	1,00	0,50	192,50	87,50	0,19	0,04	280,00	0,69	0,16	4.40:1
1IC	1,00	0,50	175,00	105,00	0,18	0,05	280,00	0,63	0,19	3.33:1
1IIA	1,00	0,63	210,00	70,00	0,21	0,04	280,00	0,75	0,16	4.80:1
1IIB	1,00	0,63	192,50	87,50	0,19	0,05	280,00	0,69	0,20	3.52:1
1IIC	1,00	0,63	175,00	105,00	0,18	0,07	280,00	0,63	0,23	2.67:1
2IA	1,30	0,57	210,00	70,00	0,27	0,04	280,00	0,98	0,14	6.90:1
2IB	1,30	0,57	192,50	87,50	0,25	0,05	280,00	0,89	0,18	5.06:1
2IC	1,30	0,57	175,00	105,00	0,23	0,06	280,00	0,81	0,21	3.83:1
2IIA	1,30	0,71	210,00	70,00	0,27	0,05	280,00	0,98	0,18	5.52:1
2IIB	1,30	0,71	192,50	87,50	0,25	0,06	280,00	0,89	0,22	4.05:1
2IIC	1,30	0,71	175,00	105,00	0,23	0,07	280,00	0,81	0,26	3.07:1
3IA	1,60	0,62	210,00	70,00	0,34	0,04	280,00	1,20	0,15	7.80:1
3IB	1,60	0,62	192,50	87,50	0,31	0,05	280,00	1,10	0,19	5.72:1
3IC	1,60	0,62	175,00	105,00	0,28	0,06	280,00	1,00	0,23	4.33:1
3IIA	1,60	0,77	210,00	70,00	0,34	0,05	280,00	1,20	0,19	6.24:1
3IIB	1,60	0,77	192,50	87,50	0,31	0,07	280,00	1,10	0,24	4.58:1
3IIC	1,60	0,77	175,00	105,00	0,28	0,08	280,00	1,00	0,29	3.47:1
4IA	2,00	0,67	210,00	70,00	0,42	0,05	280,00	1,50	0,17	9.00:1
4IB	2,00	0,67	192,50	87,50	0,39	0,06	280,00	1,38	0,21	6.60:1
4IC	2,00	0,67	175,00	105,00	0,35	0,07	280,00	1,25	0,25	5.00:1
4IIA	2,00	0,83	210,00	70,00	0,42	0,06	280,00	1,50	0,21	7.20:1
4IIB	2,00	0,83	192,50	87,50	0,39	0,07	280,00	1,38	0,26	5.28:1
4IIC	2,00	0,83	175,00	105,00	0,35	0,09	280,00	1,25	0,31	4.00:1

6.7. REFERENCES

- (1) Rinaudo, M. Chitin and Chitosan: Properties and Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (7), 603–632.
- (2) Dash, M.; Chiellini, F.; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan—A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36* (8), 981–1014.
- (3) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19–34.
- (4) Moura, M. J.; Faneca, H.; Lima, M. P.; Gil, M. H.; Figueiredo, M. M. In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (9), 3275–3284.
- (5) Jonassen, H.; Kjøniksen, A. L.; Hiorth, M. Effects of Ionic Strength on the Size and Compactness of Chitosan Nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **2012**, *290* (10), 919–929.
- (6) Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. .; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 125–132.
- (7) Liu, H.; Gao, C. Preparation and Properties of Ionically Cross-Linked Chitosan Nanoparticles. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20* (7), 613–619.
- (8) Zhang, X.; Malhotra, S.; Molina, M.; Haag, R. Micro- and Nanogels with Labile Crosslinks - from Synthesis to Biomedical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (7), 1948–1973.
- (9) Kawashima, Y.; Handa, T.; Kasai, A.; Takenaka, H.; Lin, S. Y.; Ando, Y. Novel Method for the Preparation of Controlled-Release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74* (3), 264–268.
- (10) Giri, T. K.; Thakur, A.; Alexander, A.; Badwaik, H.; Tripathi, D. K. Modified Chitosan Hydrogels as Drug Delivery and Tissue Engineering Systems: Present Status and Applications. *Acta Pharm. Sin. B* **2012**, *2* (5), 439–449.
- (11) Lin, Y.-H.; Tsai, S.-C.; Lai, C.-H.; Lee, C.-H.; He, Z. S.; Tseng, G.-C. Genipin-Cross-Linked Fucose-Chitosan/Heparin Nanoparticles for the Eradication of Helicobacter Pylori. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4466–4479.
- (12) Zhang, Y.; Thomas, Y.; Kim, E.; Payne, G. F. PH- and Voltage-Responsive Chitosan Hydrogel through Covalent Cross-Linking with Catechol. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (5), 1579–1585.
- (13) Espinosa-García, B. M.; Argüelles-Monal, W. M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F. M. Molecularly Imprinted Chitosan-Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward o-Xylene. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3355–3364.
- (14) Butler, M. F.; Ng, Y.-F.; Pudney, P. D. A. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2003**, *41* (24), 3941–3953.
- (15) Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S. Synthesis and Characterization of a Novel Chitosan-Based Network Prepared Using Naturally Occurring Crosslinker. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38* (15), 2804–2814.
- (16) Muzzarelli, R. A. A. Genipin-Crosslinked Chitosan Hydrogels as Biomedical and Pharmaceutical Aids. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77* (1), 1–9.
- (17) Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.;

- Bumgardner, J. D. The Effect of Cross-Linking of Chitosan Microspheres with Genipin on Protein Release. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (3), 561–567.
- (18) Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and β -d-Galactosidase Immobilization. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190.
- (19) Song, X.; Wu, H.; Li, S.; Wang, Y.; Ma, X.; Tan, M. Ultrasmall Chitosan–Genipin Nanocarriers Fabricated from Reverse Microemulsion Process for Tumor Photothermal Therapy in Mice. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2080–2090.
- (20) Harris, R.; Lecumberri, E.; Heras, A. Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (6), 1750–1762.
- (21) Chen, H.; Wei, O.; Martoni, C.; Prakash, S. Genipin Cross-Linked Polymeric Alginate-Chitosan Microcapsules for Oral Delivery: In-Vitro Analysis. *Int. J. Polym. Sci.* **2009**, *Volume 200*, Article ID 617184.
- (22) Bassler, B. L.; Losick, R. Bacterially Speaking. *Cell* **2006**, *125* (2), 237–246.
- (23) Rutherford, S. T.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (11), a012427.
- (24) Ng, W. L.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Ann Rev Genet* **2009**, *43*, 197–222.
- (25) Taga, M. E.; Bassler, B. L. Chemical Communication among Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (2), 14549–14554.
- (26) Churchill, M. E. A.; Chen, L. Structural Basis of Acyl-Homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 68–85.
- (27) Fuqua, C.; Greenberg, E. P. Listening in on Bacteria: Acyl-Homoserine Lactone Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3* (9), 685–695.
- (28) Koch, B.; Liljefors, T.; Persson, T.; Nielsen, J.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. The LuxR Receptor: The Sites of Interaction with Quorum-Sensing Signals and Inhibitors. *Microbiology* **2005**, *151* (11), 3589–3602.
- (29) Qin, N.; Callahan, S. M.; Dunlap, P. V.; Stevens, A. M. Analysis of LuxR Regulon Gene Expression during Quorum Sensing in *Vibrio Fischeri*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (11), 4127–4134.
- (30) LaSarre, B.; Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77* (1), 73–111.
- (31) Gonzalez, J. E.; Keshavan, N. D. Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70* (4), 859–875.
- (32) Christensen, Q. H.; Grove, T. L.; Booker, S. J.; Greenberg, E. P. A High-Throughput Screen for Quorum-Sensing Inhibitors That Target Acyl-Homoserine Lactone Synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (34), 13815–13820.
- (33) Romero, M.; Acuña, L.; Otero, A. Patents on Quorum Quenching: Interfering with Bacterial Communication as a Strategy to Fight Infections. *Recent Pat. Biotechnol.* **2012**, *6* (1), 2–12.
- (34) Manefield, M.; Rasmussen, T. B.; Henzter, M.; Andersen, J. B.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Givskov, M. Halogenated Furanones Inhibit Quorum Sensing through Accelerated LuxR Turnover. *Microbiology* **2002**, *148* (Pt 4), 1119–1127.
- (35) Mayer, C.; Romero, M.; Muras, A.; Otero, A. Aii20J, a Wide-Spectrum Thermostable N-Acylhomoserine Lactonase from the Marine Bacterium *Tenacibaculum* Sp. 20J, Can Quench AHL-Mediated Acid Resistance in *Escherichia Coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (22), 9523–9539.

- (36) Piletska, E. V.; Stavroulakis, G.; Larcombe, L. D.; Whitcombe, M. J.; Sharma, A.; Primrose, S.; Robinson, G. K.; Piletsky, S. A. Passive Control of Quorum Sensing: Prevention of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation by Imprinted Polymers. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (4), 1067–1071.
- (37) Cavaleiro, E.; Chianella, I.; Whitcombe, M. J.; Piletsky, S. A.; Correia, A.; Duarte, A. S. Synthetic Polymers Capable of Suppressing Virulence of Bacterial Fish Pathogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, S79–S79.
- (38) Piras, A. M.; Maisetta, G.; Sandreschi, S.; Gazzarri, M.; Bartoli, C.; Grassi, L.; Esin, S.; Chiellini, F.; Batoni, G. Chitosan Nanoparticles Loaded with the Antimicrobial Peptide Temporin B Exert a Long-Term Antibacterial Activity in Vitro against Clinical Isolates of *Staphylococcus Epidermidis*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 372.
- (39) Gupta, A.; Terrell, J. L.; Fernandes, R.; Dowling, M. B.; Payne, G. F.; Raghavan, S. R.; Bentley, W. E. Encapsulated Fusion Protein Confers “Sense and Respond” Activity to Chitosan-Alginate Capsules to Manipulate Bacterial Quorum Sensing. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110* (2), 552–562.
- (40) Cobrado, L.; Azevedo, M. M.; Silva-Dias, A.; Ramos, J. P.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. G. Cerium, Chitosan and Hamamelitannin as Novel Biofilm Inhibitors? *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67* (5), 1159–1162.
- (41) Costa, E. M.; Silva, S.; Pina, C.; Tavaría, F. K.; Pintado, M. Antimicrobial Effect of Chitosan against Periodontal Pathogens Biofilms. *SOJ Microbiol Infect Dis* **2014**, *2* (1), 1–6.
- (42) Tanaka, K.; Nishida, K.; Gabrys, B.; J. Lawrence, M.; Kanaya, T. Critical Dissolution Ionic Strength of Aqueous Solution of Chitosan Hydrochloride Salt. *Sen-i Gakkaishi (Journal Soc. Fiber Sci. Technol. Japan)* **2014**, *70*, 225–231.
- (43) Stauffer, D.; Coniglio, A.; Adam, M. Gelation and Critical Phenomena. In *Polymer Networks*; Dušek, K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1982; pp 103–158.
- (44) de Moraes, W. A.; Pereira, M. R.; Fonseca, J. L. C. Characterization of Gelification of Chitosan Solutions by Dynamic Light Scattering. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *87* (4), 2376–2380.
- (45) Stauffer, D.; Aharony, A. Cluster Numbers. In *Introduction to Percolation Theory.*; Stauffer, D., Aharony, A., Eds.; London: UK Taylor & Francis Ltd., 1994; pp 15–59.
- (46) Sauerwald, T.; Hennemann, J.; Kohl, C.-D.; Wagner, T.; Russ, S. H2S Detection Utilizing Percolation Effects in Copper Oxide. In *Proc Sens 2013*; 2013; pp 656–660.
- (47) Kurselis, K.; Kiyani, R.; Bagratashvili, V. N.; Popov, V. K.; Chichkov, B. N. 3D Fabrication of All-Polymer Conductive Microstructures by Two Photon Polymerization. *Opt. Express* **2013**, *21* (25), 31029–31035.
- (48) Tung, C.-Y. M.; Dynes, P. J. Relationship between Viscoelastic Properties and Gelation in Thermosetting Systems. *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27* (2), 569–574.
- (49) Engwer, C.; Loy, R.; Chronakis, I. S.; Mendes, C.; Francisco, M. Mesoscopic Gelation of Chitosan and Genipin at below Critical Concentrations. *ChemRxiv* **2017**, 1–10.
- (50) Carvalho, E. L. S.; Grenha, A.; Remuñán-López, C.; Alonso, M. J.; Seijo, B. Mucosal Delivery of Liposome–Chitosan Nanoparticle Complexes. *Methods Enzymol.* **2009**, *465*, 289–312.
- (51) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.
- (52) Oslizlo, A.; Stefanic, P.; Dogsa, I.; Mandic-Mulec, I. Private Link between Signal and Response in *Bacillus Subtilis* Quorum Sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (4), 1586–1591.

- (53) Shibayama, M. Universality and Specificity of Polymer Gels Viewed by Scattering Methods. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, 79 (12), 1799–1819.
- (54) Dmour, I.; Taha, M. O. Novel Nanoparticles Based on Chitosan-Dicarboxylate Conjugates via Tandem Ionotropic/Covalent Crosslinking with Tripolyphosphate and Subsequent Evaluation as Drug Delivery Vehicles. *Int. J. Pharm.* **2017**, 529 (1–2), 15–31.
- (55) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Salt-Assisted Mechanistic Analysis of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Formation. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (11), 3868–3876.
- (56) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Monovalent Salt Enhances Colloidal Stability during the Formation of Chitosan/Tripolyphosphate Microgels. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 10392–10399.
- (57) Huang, Y.; Lapitsky, Y. On the Kinetics of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Aggregation and Their Effects on Particle Polydispersity. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, 486, 27–37.
- (58) Yang, H.-C.; Hon, M.-H. The Effect of the Degree of Deacetylation of Chitosan Nanoparticles and Its Characterization and Encapsulation Efficiency on Drug Delivery. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2010**, 49 (12), 1292–1296.
- (59) Sreekumar, S.; Goycoolea, F. M.; Moerschbacher, B. M.; Rivera-Rodriguez, G. R. Parameters Influencing the Size of Chitosan-TPP Nano- and Microparticles. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 4695.
- (60) Razi, M. A.; Wakabayashi, R.; Tahara, Y.; Goto, M.; Kamiya, N. Genipin-Stabilized Caseinate-Chitosan Nanoparticles for Enhanced Stability and Anti-Cancer Activity of Curcumin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, 164, 308–315.
- (61) Mohammed, M. A.; Syeda, J. T. M.; Wasan, K. M.; Wasan, E. K. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, 9 (4).
- (62) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, 149, 358–368.
- (63) Qin, X.; Emich, J.; Goycoolea, F. Assessment of the Quorum Sensing Inhibition Activity of a Non-Toxic Chitosan in an N-Acyl Homoserine Lactone (AHL)-Based Escherichia Coli Biosensor. *Biomolecules* **2018**, 8 (3), 87.
- (64) Costalat, M.; David, L.; Delair, T. Reversible Controlled Assembly of Chitosan and Dextran Sulfate: A New Method for Nanoparticle Elaboration. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 102 (1), 717–726.
- (65) Masarudin, M. J.; Cutts, S. M.; Evison, B. J.; Phillips, D. R.; Pigram, P. J. Factors Determining the Stability, Size Distribution, and Cellular Accumulation of Small, Monodisperse Chitosan Nanoparticles as Candidate Vectors for Anticancer Drug Delivery: Application to the Passive Encapsulation of [14C]-Doxorubicin. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2015**, 8, 67.
- (66) Helander, I. ; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, 71 (2–3), 235–244.
- (67) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, 9 (3), e92723.
- (68) Fernandes, M. M.; Francesko, A.; Torrent-Burgués, J.; Carrión-Fité, F. J.; Heinze, T.; Tzanov, T. Sonochemically Processed Cationic Nanocapsules: Efficient

- Antimicrobials with Membrane Disturbing Capacity. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (4), 1365–1374.
- (69) Kolibachuk, D.; Greenberg, E. P. The *Vibrio Fischeri* Luminescence Gene Activator LuxR Is a Membrane-Associated Protein. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (22), 7307–7312.
- (70) Qin, Y.; Luo, Z.-Q.; Smyth, A. J.; Gao, P.; Beck von Bodman, S.; Farrand, S. K. Quorum-Sensing Signal Binding Results in Dimerization of TraR and Its Release from Membranes into the Cytoplasm. *EMBO J.* **2000**, *19* (19), 5212–5221.
- (71) Thoendel, M.; Horswill, A. R. Identification of *Staphylococcus Aureus* AgrD Residues Required for Autoinducing Peptide Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (33), 21828–21838.
- (72) Kaur, G.; Balamurugan, P.; Adline Princy, S. Inhibition of the Quorum Sensing System (ComDE Pathway) by Aromatic 1,3-Di-m-Tolylurea (DMTU): Cariostatic Effect with Fluoride in Wistar Rats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 313.





7. CHAPTER 4. ONGOING EXPERIMENTS*

* Part of the results from this chapter have already been pre-published as a preprint on the open server for biology bioRxiv as: Vila-Sanjurjo, C.^{1,2}, Engwer, C.¹, Qin, X.¹, Hembach, L.¹, Verdía-Cotelo³, T., Remuñán-López, C.², Vila-Sanjurjo, A.³ and F.M. Goycoolea¹. A single intracellular protein governs the critical transition from an individual to a coordinated population response during quorum sensing: Origins of primordial language. bioRxiv 074369; doi: <https://doi.org/10.1101/074369>

¹ Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Schlossgarten 3, 48149 Münster, Germany.

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Vida, s/n, 15782 Santiago de Compostela Spain.

³ Grupo GIBE. Departamento de Bioloxía Celular e Molecular, Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA). Universidade da Coruña. Campus Zapateira, s/n, 15071 A Coruña, Spain.

This section of the thesis contains two pieces of uncompleted work which, together with the work in Ch, inspires some of the hypothesis presented in the final discussion of this work and whose investigation have led to some of the lines of research currently carried out by our group.



7.1. PERCOLATION THEORY CAN DESCRIBE VIOLACEIN ACCUMULATION IN *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

7.1.1. Summary

We have used the *C. violaceum* biosensor strain *CV026* to measure violacein production after induction with external signal. We have found that violacein production in this strain is an all-or-none event that can be described by percolation theory. Since violacein is the end product of a multi-enzyme biochemical route, the data cannot unambiguously establish whether the percolation phase reflects the nature of the underlying QS switch, the biosynthetic process, or both. Future experiments are proposed to elucidate these issues.

7.1.2. Introduction

Chromobacterium violaceum is a soil- and water-borne Gram-negative bacterium that has been found to regulate the production of its characteristic pigment, violacein, by QS^{1,2}. The QS apparatus of *C. violaceum* consists of the LuxR/I-like proteins CviR and CviI². Violacein and its related compound deoxy-violacein are produced by the action of five enzymes consecutively encoded in the *vioABCDE* operon^{3,4}. Work with recombinant *Escherichia coli* strains harboring mutations in the *vioA* promoter led to the identification of the palindromic DNA sequence ‘CTGNCCNNNGGNACAG’ as the binding site of CviR². Binding of the QS activator CviR to the *vioA* promoter controls the expression of this operon and the biosynthesis of the pigments^{1,5-7}. As such, violacein deposition has been traditionally taken as a hallmark manifestation of QS in *C. violaceum*. Yet, the details of the molecular mechanism governing *C. violaceum* quorum-dependent production of violacein have not been fully elucidated⁶. More recently, the works of Lozano et al.⁸ and Devescovi et al.⁶ further defined the complexity of violacein biosynthesis in the *C. violaceum* ATCC31532 strain. According to both authors, besides to AHL-signaling, regulation of the *vioA* operon involves the negative regulator VioS⁶ and a two-component regulatory system named antibiotic-induced response (*air*)⁸. They have also shown that overexpression of *cviR* induces violacein production, while overexpression of *cviI*

(encoding the AHL synthase CviI), does not, an observation that argues for a limiting role of CviR levels against autoinducer levels in the QS response of wild type (wt) *C. violaceum*⁸.

The *C. violaceum* strain *CV026* is a mutant derivative of the ATCC31532 wt strain. The *CV026* strain is a well-known QS biosensor that has lost the ability to produce the autoinducer N-hexanoyl-L homoserine lactone (C6-HSL, AHL) due to a double Tn5 transposon insertion mapping to the *cviI* gene¹. Additionally, the *CV026* carries a second insert on at the *vioS* locus, encoding a repressor protein^{1,8}. Despite the insertions, *C. violaceum CV026* can still release violacein in response to the presence of external AHL⁹. Thus, by using *C. violaceum CV026*, one can decouple violacein production from its normal regulation during the growth cycle.

Percolation theory (PT) is a general mathematical formalism that describes connectivity and transport in geometrically complex systems. Specifically, PT describes the behavior of a system in the vicinity of a critical threshold above which, an infinite cluster of interconnected objects spans a given network system. In **Chapter 1**, we have hypothesized and provided *in vivo* and *in vitro* evidence that substantiates the notion that PT can explain QS “listening” in a model *E. coli* fluorescent biosensor. In this Chapter, we provide further evidence that PT can also account for the production of violacein in *C. violaceum CV026*.

7.1.3. Methodology

7.1.3.1. End-point evaluation of violacein production at various AHL concentrations by plate bioassays

The mini-Tn5 mutant bioreporter strain of *C. violaceum CV026* has been described elsewhere¹ and was kindly donated by Prof. Ana Otero (University of Santiago de Compostela, Spain). Bioassay plates were made as follows. An overnight culture of *CV026* was subjected to a 10⁻¹ dilution in LB (final OD₆₀₀ ≈ 0.4) and further sub-diluted 10⁻¹ in a final volume of 3 mL of semi-solid LB containing 1.2% agar and kanamycin (30 µg/mL). A lawn culture was started by pouring the mixture onto a LB agar plate supplemented with kanamycin (30

$\mu\text{g/mL}$). Wells were created in the agar at adequate distances by using the wider end of a one mL micropipette tip. The wells were filled with 50 μL AHL at concentrations ranging from 1×10^{-5} to 1×10^{-6} M. After incubation at 30°C for 48 h, high-resolution pictures were taken with a Fujifilm FinePix S3Pro camera (picture size = 1440 x 960 pixels, focal length = 70 mm). The pictures were analyzed with ImageJ 1.47v¹⁰. After splitting the image into RGB channels, the variation of color intensity in every violacein ring was measured on the green channel. To do this, six radial lines, each spanning 120-160 pixels were drawn starting at the edge of the AHL source and extending across the imaged violacein ring and into the violacein-free periphery. Intensity values were background corrected by subtracting the average pixel intensity of three lines (131 pixels each) drawn at the violacein-free periphery.

7.1.3.2. Estimation of AHL diffusion profile from the calibration with BMB

BMB was dissolved in water to a concentration of 0.9 mM and filter sterilized. Three cell-free, bioassay plates were prepared as described above. A 50- μL aliquot of 0.9 mM BMB was applied to the well, and the plates were incubated upright for 48 h at room temperature. BMB diffusion was recorded over 48 hours, and the images were analyzed with ImageJ 1.47v¹⁰. The mixtures were overlaid onto LB agar plates and BMB intensity was measured in the RGB green channel as explained previously.

7.1.3.3. Percolation analysis of published data

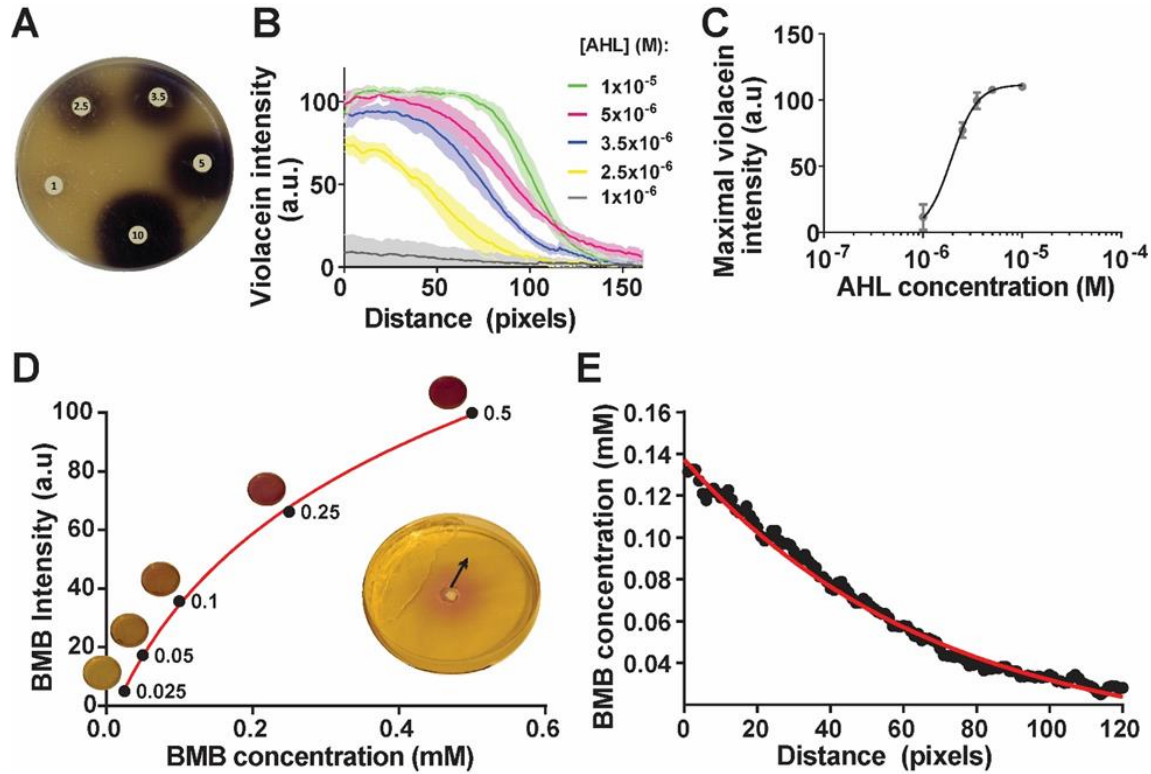
The plots of interest were captured as screenshots from the original papers (**Table 1** summarizes the relevant information available in the original publications). The resulting images were uploaded to the free online application "web plot digitizer"⁷. The axes were calibrated by selecting two known values for x and y, and indicating whether the axis was in log scale, when required. Data points on the original plot were selected on the image. The application returns the converted data as a text file. When the y-axis was specified as being in log scale, the application returned linearized data. The converted data was plotted and

⁷ (<http://arohatgi.info/WebPlotDigitizer/app/>)

fitted to the percolation function as previously described. When possible, response data were normalized to cell density before fitting to the percolation function. In the case of Gallardo et al.¹¹, only A_{480} values higher than 0.4 in their Figure 9 were considered for percolation analysis. These values were taken as the no-violacein baseline to discriminate violacein accumulation from absorbance due to cell growth of wt *C. violaceum*.

7.1.4. Results and Discussion

Violacein deposition by *C. violaceum* has been widely used as a proxy of QS¹. When *C. violaceum* CV026 cells are plated in the presence of sufficiently high concentrations of AHL, a concentric ring of violacein is produced around the AHL source after prolonged incubation (**Figure 1 A**). The fact that no violacein is produced outside the ring attests to the well-known inability of *C. violaceum* CV026 to synthesize AHL (**Figure 1 A**)^{1,11,12}. **Figure 1 B** shows the intensity of violacein formed by a *C. violaceum* CV026 lawn as the one shown in **Figure 1 A**, relative to the distance from the AHL well. Maximum pigment intensity is achieved within a region adjacent to the periphery of the well in the presence of increasing AHL concentrations ranging between $1-10 \times 10^{-6}$ M (magenta and green curves in **Figure 1 B**). From these experiments we determined that maximal violacein intensity can be fitted to the Hill equation with a K_{Hill} of 1.94×10^{-6} M (**Figure 1 C**). This K_{Hill} value should be taken with care, however, as it merely represents the AHL concentration present in the bioassay well at time zero but not the actual concentration sensed by the cells in the lawn. To better understand the nature of the underlying AHL gradient, we measured the diffusion of bromophenol blue (BMB) in agar. Since BMB is a diffusible probe with low molecular weight, we decided to use it as a surrogate approximation to the diffusion of AHL in agar (see Materials & Methods and **Figure 1 D-E**). Images of the ensuing BMB rings formed after BMB diffusion for 48 h (inset in **Figure 1 D**) were taken to digitally measure the intensity of the probe. To convert pixel intensity values to BMB concentration, a calibration curve was built by diluting increasing BMB in semi-solid LB containing 1.2% agar to final concentrations ranging

Figure 1. End-point QS response of *C. violaceum* CV026

Legend Figure 1: End-point QS response of *C. violaceum* CV026. **A.** Plate assay showing the formation of violacein rings by *C. violaceum* CV026 induced with varying AHL concentrations. Numbers shown in wells represent AHL concentrations in the μM range. **B.** Variation in violacein intensity within the violacein rings of **A** as a function of the distance from the edge of the well. X axis: distance from the edge of the well measured in pixels. Y-axis: Violacein intensity measured in a.u. Green, 1×10^{-5} M AHL; red 5×10^{-6} M AHL; blue 3.5×10^{-6} M AHL; yellow 2.5×10^{-6} M AHL, and grey, 1×10^{-6} M AHL. Solid lines represent the mean. Light-colored, shaded areas represent the standard deviation from three biological replicates. **C.** Hill plot of the maximum violacein intensity values from **B**. X axis: concentration of AHL (M). Y-axis: maximum violacein intensity in a.u. (see Materials and Methods). **D.** Plot of BMB intensity as a function of BMB concentration. Images of the agar plates with known concentrations of BMB (from 0.025 to 0.5×10^{-3} M) are shown alongside their corresponding intensity values on the plot. The continuous red line shows the fitting of the measured values to a three-parameter logarithmic function (see Materials and Methods). X axis: BMB concentration (mM). Y-axis: BMB intensity measured in a.u. (see Materials and Methods). Inset: agar plate showing the diffusion of 0.9 mM BMB after 48 hours. BMB was applied to the well at the center of the plate as described in Materials and Methods (the arrow shows the direction of the diffusion). **E.** Fitting of an exponential function to the estimated concentration of BMB after diffusion in agar. The estimated BMB concentration (black dots) was plotted against the distance, measured in pixels, from the edge of the well to its periphery. The fit is shown by the continuous red line. X axis: Distance in pixels. Y-axis: BMB concentration (mM).

from 0.025 to 0.5×10^{-3} M. The measured intensity values were fitted to an exponential calibration curve as described in Materials and Methods. The results are shown in **Figure 1 D**. The concentration of AHL after diffusion in agar was estimated as follows. First, the concentration of BMB in the ring was plotted as a function of the distance from the edge of the well and fitted to an exponential decay function as described in Materials and Methods (**Figure 1E**). Strikingly, we found that, within the time frame of the experiment of **Figure 1 A**, the estimated concentration of BMB at the edge of the well (i.e., < 0.14 mM) is less than $1/6^{\text{th}}$ of the initial concentration applied in the well (i.e., 0.9 mM; **Figure 1E**). This concentration could be even lower in the real experiment, as modeling with BMB was performed at room temperature, instead of the normal growth temperature of *C. violaceum*, namely 30°C . These results indicate that maximal pigment intensity could be induced by AHL concentrations well below the 5×10^{-6} M, the minimal initial AHL concentration giving rise to maximum intensity (red trace in **Figure 1 B**). It should be noticed, however, that the long delay between AHL sensing and violacein detection, together with the

presence of an ever-changing gradient of AHL, makes it difficult to pinpoint the minimal AHL concentration inducing maximal pigment production. The monotonic exponential decay function shown in **Figure 1E** describing the time-dependent diffusion of BMB into agar is in agreement with the results of Anbazhagan et al.¹³, who found a similar relationship by measuring the dependence of AHL-induced rings on the concentration of the inducer. Clearly, the sigmoidal character of violacein intensity across the ring (*c.f.* **Figures 1B** and **C**), indicates that the kinetics of the QS response launched by *C. violaceum* CV026 cells does not mirror the underlying AHL diffusion gradient. To better understand the temporal kinetics of violacein accumulation, we performed time-lapse analysis of *C. violaceum* CV026 cells in the presence of external AHL. The results are shown in **Figure 2 A** (note that the experiment has been performed at room temperature to achieve increased time resolution, see Materials & Methods). Under these conditions, a transition from clear to opaque agar at ~32 h, caused by cell growth, is followed by the sudden appearance of a violet hue at ~48 h. Violacein keeps accumulating until the end of the experiment (80 h) (**Figure 2A**). At no point in time, violacein accumulation appears to be proportional to the underlying gradient of AHL concentration (modelled in **Figure 1C**), but rather resembles an all-or-none response (**Figure 2A**). The abrupt rise in violacein intensity within a narrow concentration range observed at the periphery of the ring, together with the apparent synchronicity of this process across the ring, strongly suggested that the underlying kinetics could be those of a critical phenomenon. Based on this experimental observation, we hypothesized that the phenomenon could be explained and approximated quantitatively by means of PT¹⁴. To test the validity of this hypothesis, we first fitted the time-resolved violacein intensity values vs. distance as shown in **Figure 2B** and **C**. Notably, we found that the data satisfactorily fitted the percolation function (R^2 values ≥ 0.91 - 0.97) with β exponents fairly well conserved in the range from 0.69 to 0.84 (**Figure 2 D-G**). These values are in remarkable agreement with the universal critical exponents for the dimensionalities of $d=4$, across most of the ring, and $d=5$ near the periphery (0.65 and 0.83 for $d=4$ and $d=5$,

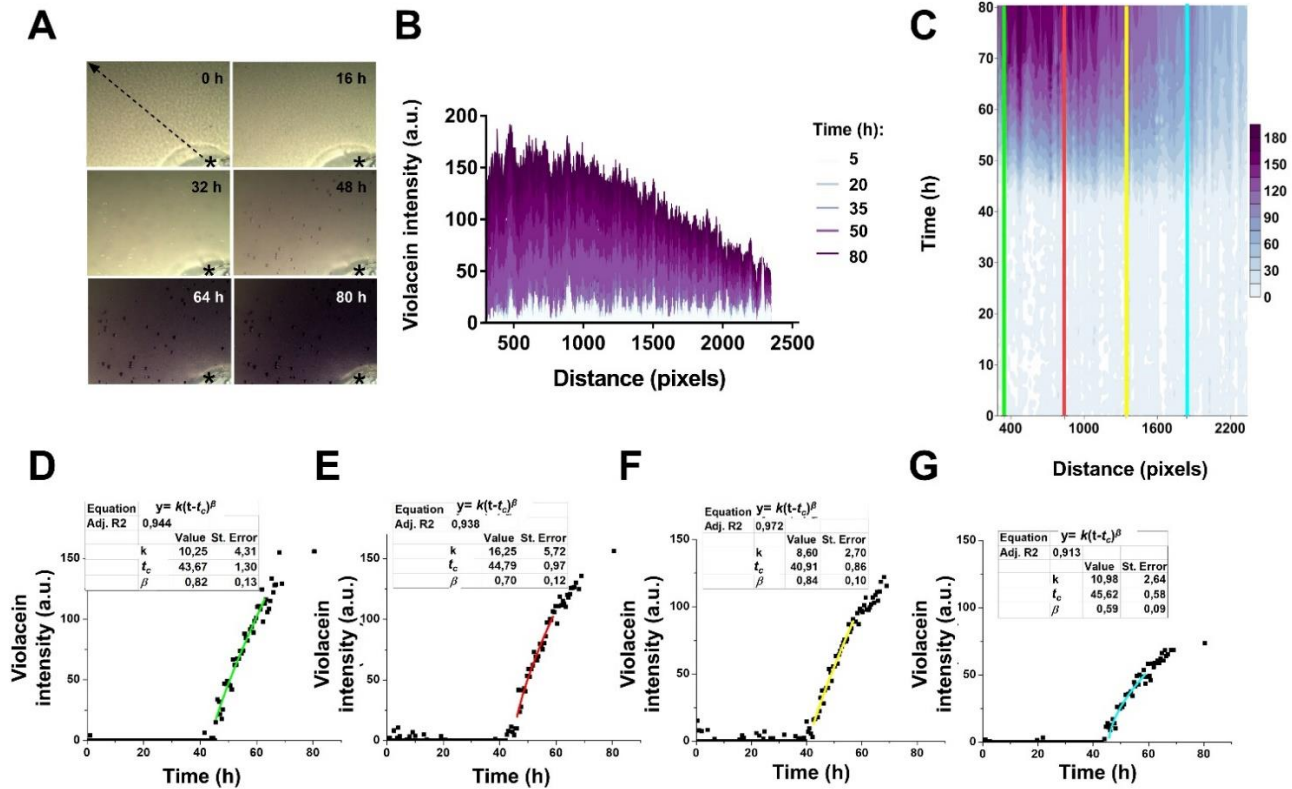


Figure 2. Adjustment of the density-normalized QS response of *C. violaceum* CV026 to the percolation function

Legend Figure 2: Adjustment of the density-normalized QS response of *C. violaceum* CV026 to the percolation function. **A.** Time-resolved violacein deposition by *C. violaceum* CV026 in the presence of AHL. Time points: 0, 16, 32, 48, 64, and 80 h. The position of the AHL well, containing 50 μ L of an aqueous 10- μ M solution of AHL at the beginning of the assay, is indicated by an asterisk. Violacein intensity was measured along the direction marked with the arrow shown at time 0. **B.** Plot of time-resolved violacein intensity vs. distance. Violacein intensity, measured as background-corrected pixel intensity values (see Materials and Methods), was plotted as a function of the distance from the well's edge to the periphery of the ring in time-resolved manner. Individual plots were piled up for the times indicated on the right. **C.** Time vs. distance plot of the pixel intensity values from **B.** The region corresponding to 0-300 pixels, in the vicinity of the well, was erased due to the presence of a shadow which affected pixel intensity values. The estimated violacein intensity values (in a.u.) are color coded as indicated by the color key shown to the right. Region adjacent to the well (green line); mid-ring region close to the well (red line); mid-ring region far from the well (yellow line); ring periphery (blue line). **D-G.** Percolation fits of the violacein intensity data of **C.** Pixel intensity values from the regions indicated by lines in **C** were used for the fitting. Black dots: pixel intensity values. Solid lines: percolation fits. The fits are color coded to the corresponding lines in **C.** The shown data in **A-F** corresponds to a single, representative experiment.

respectively)¹⁵. These results also suggest that the apparent synchronicity of the response derives from the existence of a critical time, $t_c \approx 41$ -46 h, at which onset violacein abruptly appears at measurable levels.

The above results with mutant *C. violaceum* CV026 cells begged the question of whether violacein deposition in wt *C. violaceum* might concord to “percolation-like behavior”. Gallardo et al.¹¹ used highly sensitive spectroscopic techniques to measure violacein production *in vivo* by wt *C. violaceum* ATCC 31532. **Figure 3A** shows that their data can be readily fitted to the percolation function ($R^2 = 0.977$, see also **Table 1**), albeit with a somewhat smaller β percolation exponent (0.46) and a shorter t_c (5.87 h). The time disparities between our results and those of Gallardo et al., may stem on temperature differences, as we have been able to detect violacein from *C. violaceum* CV026 in ~ 7 hours (unpublished results). Despite the observed differences, the fittings' outcome is in general agreement that violacein deposition in wt *C. violaceum* cells displays an all-or-none character similar to that described here for the “QS-speaking” deficient strain CV026.

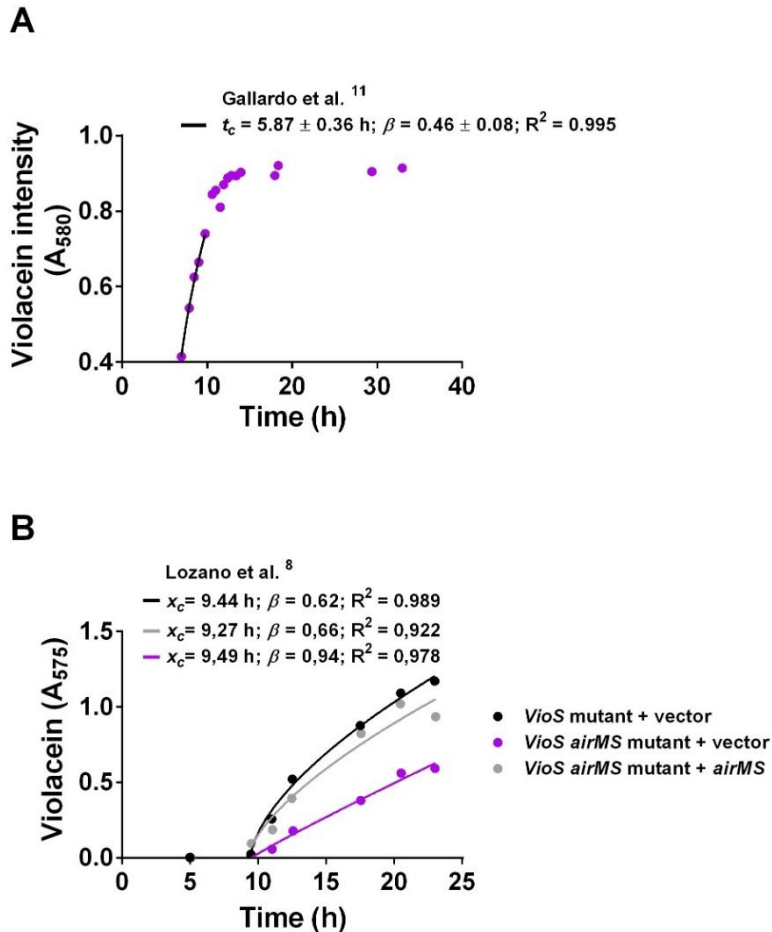


Figure 3. Adjustment of the density-normalized QS response of *C. violaceum*-based QS responses from the literature to the percolation function. **A.** Fitting of the data of Gallardo et al. ¹¹ to the percolation function. The plot shows the accumulation of violacein over time displayed by wild type *C. violaceum* ATCC 31532. X axis = time (h). Y axis = violacein intensity (A_{580}). Data corresponding to that published in Figure 9 of Gallardo et al. (*AMB Expr* 2014, 4: 4. With a Creative Commons license) ¹¹. **B.** Fitting of the results of Lozano et al. ⁸ to the percolation function. The plot shows the accumulation of violacein over time in the following *C. violaceum* ATCC 31532 mutants: *vioS* (black circles), *vioS airMS* + control vector (purple circles), and *vioS airMS* complemented with a vector carrying *airMS*. Data corresponding to that published in Figure 5F of Lozano et al. (*MBio* 2020, 11 (3): e00948-20. With a Creative Commons license) ⁸.

We have also fitted data of violacein production by *C. violaceum* ATCC31532 mutants recently reported by Lozano et al.⁸. The black and grey traces in **Figure 3B** show the fitting of violacein production data of a *vioS* mutant at 28 °C (the only difference between the two traces is that in one case the cells harboured a control vector, grey trace). Of note, this strain is capable of AHL biosynthesis, as it carries a functional copy of the *cvil* gene⁸. As expected, both strains behaved very similarly yielding t_{cs} of 9.44 and 9.27 h, respectively. While the violacein deposition kinetics are much faster than those of **Figure 2**, due mostly to temperature differences, the value of the β exponent calculated for the *vioS* single mutant ($\beta = 0.62$ and 0.66 respectively, black and grey traces in **Figure 3C**) is in keeping with the lower end of the β value limit displayed by our CV026 strain at the lowest AHL concentration, namely $\beta = 0.59$ (**Figure 2G**). This result is interesting in that it might indicate an effect of the *vioS* mutation on the β exponent. Lozano et al. generated a double mutant carrying non-functional versions of the *vioS* and *airMS* loci, both regulating violacein production⁸. After fitting the data obtained from this double mutant to the percolation function, we obtained a t_c of 9.49 h, and a β exponent of 0.94 (purple trace in **Figure 3C**). Again, the results are in line with the idea that mutations affecting the regulation of the violacein synthetic route might give rise to variations in the β exponent.

So far, we have provided evidence that violacein deposition in *C. violaceum* ATCC31532 can be described by PT, both in the absence of functional CviI protein (strain CV026) and in its presence (wt, *vioS*, and *vioS/airMS* strains). However, it should be noted that the fact that violacein deposition can be fitted to a percolation function does not mean that QS induction in this organism can also be described as a percolative phenomenon.

In contrast to the simple, GFP-based construct carried by the *E. coli* biosensor of **Chapter 1**, violacein production is the result of a multistep biosynthetic route and its regulation is known to involve elements beyond QS, including the aforementioned *vioS* gene and *airMS* regulatory systems^{6,8}. The repressor protein VioS is known to inhibit violacein production by counteracting activation by C6-HSL-

Table 1. Experimental details from published data used for percolation analysis.

Figures	Temperature	System	Output	Genetic device	Number of <i>lux</i> gene copies	Figure number within the reference	Reference
3A	Room temperature	<i>C. violaceum</i> wild type strain ATCC 31532	Violacein production in wt <i>C. violaceum</i>	Wild-type <i>cvil-R</i> genes and <i>vio</i> operon	single copy	Figure 9; wild-type 580 [nm]	11
3C	28°C	<i>C. violaceum</i> mutant strains ATCC31532 <i>vioS</i> pJN105Cm; ATCC31532 <i>vioS</i> <i>airMS</i> pJN105Cm and ATCC31532 <i>vioS</i> <i>airMS</i> pJN105Cm_ <i>airMS</i>	Violacein production in <i>C. violaceum</i> mutants of the <i>VioS</i> repressor and/or <i>Air</i> regulatory system.	The <i>airMS</i> operon was deleted by chromosomal allelic exchange and replaced with a chloramphenicol resistance cassette. The <i>vioS</i> gene was interrupted by chromosomal transposon insertion ¹	single copy	Figure 5F	8

bound CviR⁶. In their paper, Lozano et al. discovered a new locus that regulates violacein biosynthesis, *airMS*⁸. In contrast to *vioS*, the *airMS* locus has a positive effect on violacein production⁸. They have also found that CviR overexpression, but not that of CviI, increased violacein synthesis⁸. Taking all this into account, we do not favor a simple interpretation of the results in which violacein biosynthesis can be simply taken as proxy of QS induction. Instead, we believe that QS regulation and violacein deposition are governed by different kinetics. Thus, the satisfactory fitting of the latter to PT might just report on the particular kinetics of violacein biosynthesis rather than the kinetics of the preceding QS process. Nevertheless, the fact that the analysis presented here is consistent with the idea that PT can describe violacein biosynthesis deserves further attention.

With this in mind, this study serves as a preliminary account and repository of initial observations that can lead future research. We are currently using a series of mutants in the *vioS*, *cviR*, and *cviI* genes, together with fluorescent reporters controlled by the *vioA* promoter in an attempt to better understand the regulation of the *vioABCDE* operon⁶. In addition, future directions to elucidate the connection between PT and violacein synthesis will include violacein deposition measurements from liquid cultures and experiments with the *vioS*, *vioS/airM*, and CviR overexpressing strains of Lozano et al.⁸.

7.2. THE *IN SILICO* SIMULATED RESPONSE OF VIRTUAL CELLS CARRYING A SINGLE *LUXR* LOCUS CAN BE FITTED TO THE PERCOLATION FUNCTION

7.2.1. Summary

In **Chapter 1**, we have proved, both *in vivo* and *in silico*, that externally added *N*-acyl homoserine lactone (AHL) induces a fluorescent response in cells of an *Escherichia coli* biosensor that can be approximated by means of percolation theory (PT). These biosensor cells carried many copies of the gene encoding the LuxR regulator from *Aliivibrio fischeri*. Here, we will attempt to simulate the QS response of a biosensor carrying a single copy of the *luxR* gene, a scenario which more closely resembles that of its natural host. Our simulation data is consistent with the idea that once a critical threshold of intracellular activator monomers in complex with AHL is reached, a delayed, QS-like response ensues that takes the form of a percolation burst. While displaying an apparent cell-density dependence, such response neither requires strict sensing of population levels by individual cells, nor the participation of all the cells in the population. In this model of QS, the cell-density-dependent synchronicity of the response is simply explained as a result of the action of a single protein, the LuxR activator, capable of coordinating the temporal response of a population of cells in the absence of AHL production. These results are in agreement with, and integrate the latest conclusions reached in the field and may bear important implications in our understanding of the most fundamental aspects of QS.

7.2.2. Introduction

Efforts towards the construction of mathematical models that can accurately describe QS responses have gained considerable traction. Several mathematical models have been proposed to understand the functioning of the *luxR/luxI* genetic circuitry of *A. fischeri*. The majority of these models use networks with single or double positive feedback loops at the level of *luxI* regulation and predict the existence of bistable, switch-like behaviour dependent on the external concentration of the autoinducer *N*-acyl homoserine lactone (AHL) ¹⁶.

However, few models have focused on the intracellular end of the switch, specifically on how the levels of LuxR affect the emergence of an orchestrated QS response at the population level. *In vivo* and *in silico* studies have recently shown substantial cell-to-cell heterogeneity in the QS response of *A. fischeri*, even at externally fixed autoinducer concentrations that saturate the bulk population response^{16,17}. In its natural host, *luxR* is transcribed from a single chromosomal locus whose expression is maintained at basal levels prior to QS induction¹⁸. Since it is known that macromolecules at single- or low-copy numbers behave stochastically in living cells^{19,20}, it is possible that the cell-to-cell variability observed in *A. fischeri* cells might be the result of noise at the level of LuxR expression.

In **Chapter 1** we used an *E. coli* strain carrying a “mute” (LuxI-deficient) version of the QS circuitry of *A. fischeri* to measure its response to external AHL. Since the biosensor carried the *luxR* gene of *A. fischeri* in a high-copy-number plasmid and under a constitutive promoter, the cells were expected to produce large quantities of monomeric LuxR regardless of the presence of AHL. The almost immediate QS-like response observed upon addition of AHL was interpreted within the framework of what we called the “AHL trap”, namely the “soaking up” of any diffusing AHL molecule by a vast intracellular pool of LuxR. In **Chapter 1** we also showed that PT can be used to describe the QS-based response of a “mute” *E. coli* biosensor carrying the *luxR* gene of *A. fischeri* in a high-copy-number plasmid. In addition, in Appendix 3 we showed that PT could also describe QS data obtained with biosensors carrying medium-copy-number plasmids. The main difference between the two systems is that the critical time, t_c , and the *luxR* copy number follow an inverse relationship. In this Chapter, we have used agent-based simulations to answer the question of whether a similar biosensor carrying a single copy of the *luxR* gene could display a percolation-like burst of QS-dependent activity. Additionally, we aimed to explore the effect of gene expression noise, at the level of LuxR, on the response of individual cells. The *in silico* results shown here will be used as to propose an initial hypotheses to be validated in future *in vivo* experiments.

7.2.3. Methodology

7.2.3.1. Simulation of the AHL-based response of bacteria in a 3D-cubic lattice model

The simulations were performed with the open-source software developed by Christoph Engwer for his PhD thesis (2019) ²¹. In this regard, the following must be stated: all the simulations presented in this chapter were developed by Celina Vila-Sanjurjo and a preliminary version was included in a bioRxiv preprint (2016) ²².

The AHL-based bacterial response was simulated as described in **Chapter 1** with the parameters shown in **Table 2**. In this case, colony growth on a solid surface was used, in line with recent studies on QS stochasticity ^{16,17}. Fitting to the Hill function was performed as described in **Chapter 1**.

7.2.4. Results and discussion

In an attempt to implement gene expression noise at the level of *luxR* in our simulations, we have used agent-based modelling. In **Chapter 1** we used this *in silico* platform to simulate the QS-based behaviour of an *E. coli* biosensor. The simulations enabled to glean significant insights about how LuxR-AHL dimers' accumulation ($[LuxR-AHL]_2$) led to a highly orchestrated population response. In the experiments of **Chapter 1**, both the biosensor and the virtual cells carried *luxR* at high copy number, giving rise to QS-based bursts almost immediately after exposure to external AHL ²³. Evidence reported and analysed in **Appendix 3** showed that similar *E. coli* biosensors in which the *luxR* gene is present at medium copy number, give rise to delayed critical responses upon incubation with external AHL. In the “multi-copy” simulations of **Chapter 1**, the virtual cells carried large numbers of LuxR activators at time zero due to their expression from a hundred simulated “transcriptional sites”. We hereon will use the term “single-copy” mode to refer to these simulations instead of the “multi-copy” mode used in **Chapter 1**. To study the influence of LuxR expression noise in the virtual response, we simulated a virtual population of bacteria carrying a single copy of the *luxR* gene, i.e. we reduced the “transcriptional sites” to one. The potential influence of noise at the

AHL level is automatically eliminated by “incubating” the virtual cells with saturating concentrations of external AHL. The only two requirements we imposed over the simulated system was to adhere to the Hill behaviour reported for the bioluminescence of wild type (wt) *A. fischeri* in the presence of exogenous AHL and to reproduce the stochasticity associated with bioluminescence production by *A. fischeri*¹⁷. We wondered whether we could find simulation conditions in “single-copy” mode that gave rise to a percolation-like burst similar to that observed with multi-copy systems such as our *E. coli* biosensor (**Chapter 1**) and those of Andersen et al.²⁴ and Cheng et al.²⁵ (see **Appendix 3**).

Finding conditions leading to a percolation-like burst in “single-copy” mode was more challenging than in “multi-copy” mode (**Chapter 1**). To create stochasticity in the per-cell levels of LuxR, we restricted the synthesis of this molecule with a very low P_{+I} simulation parameter ($P_{+I} = 0.001$, range: 0-1. See **Table 2**). After testing different combinations of simulation parameters, we found that if activator levels were allowed to increase slowly in the cell (see simulation parameters in **Table 2**), a percolation-like burst was obtained (**Figure 4A**). Indeed, fitting of the simulation plots to the percolation function was successful, yielding a β exponent of 0.8 and a t_c of 448 ± 0.4 simulation time units (in a.u.), placing the onset of the QS response at mid-log phase (**Figure 4B**). This is in agreement with the intact LuxI-LuxR system's response in its native environment^{26,27} (see **Figure 1A** and **1B** in **Appendix 3**). While the two systems are not directly comparable, mostly due to the presence of an active *luxI* gene in the *in vivo* system, we found the coincidence quite remarkable, as no growth-phase constraints were implemented for the onset of the burst in the simulation.

Next, we tested whether the normalized response of our virtual cells displayed Hill-like behaviour. To this end, we ran our simulations at different AHL concentrations and arranged the response data in a Hill plot. A typical sigmoid curve was obtained (**Figure 5**), indicating that our algorithm can recreate behaviours similar to those observed under equivalent conditions *in vivo*^{17,26,27}. We observed that the system entered the “percolation phase” once a small number of stable activator dimers emerge out of an intracellular monomer population that is much

Table 2. Model parameters used in simulations.
See Chapter 1 for more detailed information on the simulation parameters.

Parameter	Description	Possible values	"single-copy" mode
Antagonist diffusion	Enable/disable diffusion of antagonist molecules	True/False	True
Antagonist starting density	Initial density or absolute number of antagonist molecules	0.0 – 1.0 - ... or 1, 2, 3, ...	0.0
Bacterial growth	Enable/disable bacterial growth	True/False	True
Bacterial movement	Enable/disable bacterial movement	True/False	False
Bacterial starting density	Initial density or absolute number of bacteria	0.0 – 1.0 - ...	0.001
Box size	Length of the simulated box	1, 2, 3, ...	20
Growth penalty	Growth penalty rate for responding bacteria	0.0 – 1.0	0.0
Growth rate	Bacterial growth rate	0.0 – 1.0	0.011
P_{+1}	Receptor production rate	0.0 – 1.0	0.001
P_{+2}	Receptor-signal binding rate	0.0 – 1.0	0.7
P_{+3}	Receptor-signal dimerization rate	0.0 – 1.0	0.1
P_{+a}	Receptor-antagonist binding rate	0.0 – 1.0	0.9
P_{-1}	Receptor degradation rate	0.0 – 1.0	0.01
P_{-2}	Receptor-signal dissociation rate	0.0 – 1.0	0.1
P_{-3}	Receptor-signal dimer dissociation rate	0.0 – 1.0	0.05
P_{-a}	Receptor-antagonist dissociation rate	0.0 – 1.0	0.9
Repetitions	Number of Monte Carlo simulations	1, 2, 3, ...	10
Response	Enable/disable response of bacteria to signals	True/False	True
Response degradation rate	Degradation rate of response level	0.0 – 1.0	0.0
Signal degradation rate	Degradation rate of signal molecules	0.0 – 1.0	0.0
Signal diffusion	Enable/disable signal diffusion	True/False	True
Signal production rate	Signal production rate by bacteria	0.0 – 1.0 - ...	0.0
Signal starting density	Initial density or absolute number of signal molecules	0.0 – 1.0 - ... or 1, 2, 3, ...	0.4
Starting receptors	Initial number of receptor molecules in bacteria	1, 2, 3, ...	0.0
Time steps	Number of time steps for each Monte Carlo simulation	1, 2, 3, ...	5000
Transcriptional sites	Number of transcriptional sites in bacteria (i.e. 1 for chromosome or multiple for plasmids)	1, 2, 3, ...	1

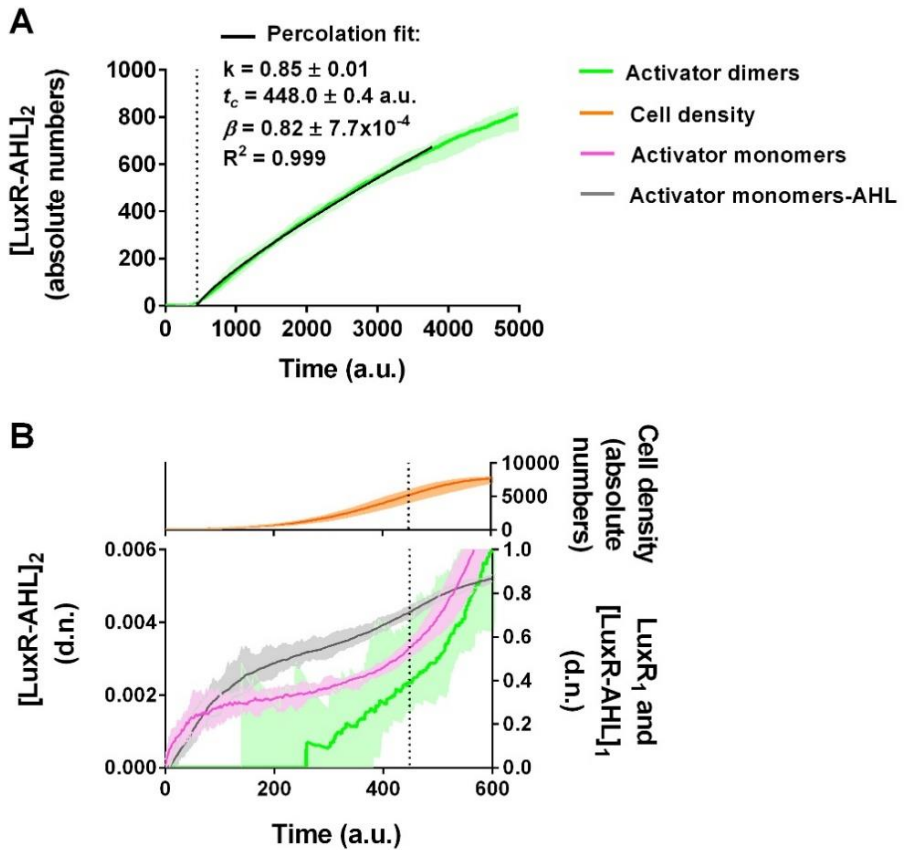


Figure 4. “QS listening” simulations in the “single-copy” mode. A. [LuxR-AHL]₂ vs. time plot showing the accumulation of [LuxR-AHL]₂ as a function of time. X-axis: time in a.u. Y-axis: absolute numbers of LuxR dimers. The median of 23 simulations is represented by the solid green line and the data range is indicated by the light shadowed area. The solid black line in A shows the best fit to the percolation function. B. Density-normalized (d.n.) levels of [LuxR]₁, [LuxR-AHL]₁, and [LuxR-AHL]₂. X-Axis: time in a.u. Lower left y-axis: d.n. [LuxR-AHL]₂ levels (green line). Upper right y-axis: number of cells in simulation (orange line). Lower right y-axis: d.n., levels of [LuxR]₁ (magenta line) and [LuxR-AHL]₁ (grey line). Data represents the median of 23 simulations and the data range is indicated by the light shadowed areas.

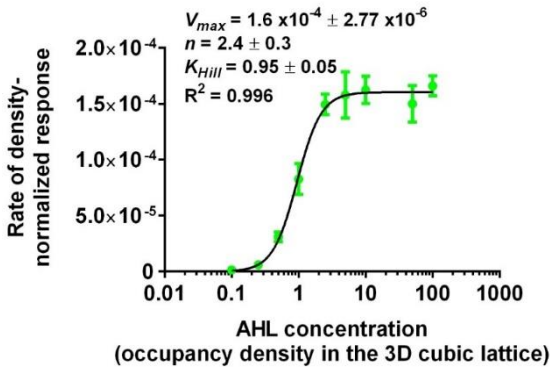


Figure 5. Fitting of simulation data to Hill behavior. Hill behavior of our simulations when run in “single-copy” mode. Solid dots represent the average of 10 simulations. Error bars denote the standard deviations of the data points. The solid line represents the best fit to a one-site, specific-binding, Hill function.

larger than that of dimers (**Figure 4B**). **Figure 6** compares the levels of $[LuxR]_1$ and $[LuxR-AHL]_1$ relative to $[LuxR-AHL]_2$. A very low P_{+1} parameter was chosen to maintain a stochastic per-cell level of LuxR in “single-copy” mode (**Table 2**). A much higher P_{+2} parameter (700 times higher) ensured that $[LuxR]_1$ was rapidly converted to $[LuxR-AHL]_1$. This, combined with a small P_{+3} parameter (10 times lower than P_{+2}) ensured that the majority of the LuxR molecules in the system are present as $[LuxR-AHL]_1$ before t_c (cf. **Figure 6A to C**). For both the $[LuxR]_1$ and $[LuxR-AHL]_1$ species, there is an initial burst of molecules followed by a phase of exponential decay t_c (**Figure 6A and C**). At t_c , the levels of $[LuxR]_1$ exceed the amount of $[LuxR-AHL]_2$ by a factor of $\sim 200:1$ in “single-copy” mode (**Figure 6A**), and by a factor of $\sim 800:1$ (**Figure 6B**) in “multi-copy” mode. In contrast, the levels of $[LuxR-AHL]_1$ exceeded those of $[LuxR-AHL]_2$ by more than two orders of magnitude in “single-copy” mode (**Figure 6C**) but became just three times higher in “multi-copy” mode (**Figure 6D**). Next, we explored the fate of individual cells in the “single-mode” simulations. **Figure 7** shows that activator dimer formation occurs in a minority of cells in the “single-copy” mode, whereas virtually all the cells in the “multi-copy” mode carried dimers at the end of the simulation (cf. **Figure 7** vs. **Figure 6** in **Chapter 1**). The huge differences in the number of LuxR molecules per cell explain why virtually all the cells were implicated in the QS response in the “multi-copy mode” (**Figure 6** in **Chapter 1**), whereas only a small subgroup was QS activated in the “single copy mode” (**Figure 7**). Notably, while the total levels of $[LuxR-AHL]_2$ in

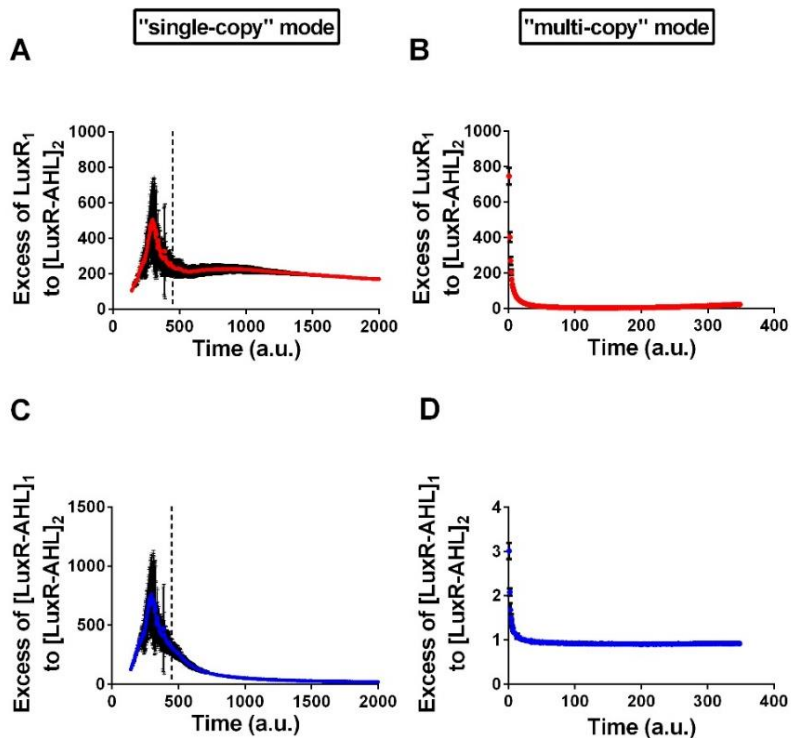


Figure 6. Excess of monomer to dimer species. Comparison of the excess of $[\text{LuxR}]_1$ (red dots in A and B) and $[\text{LuxR-AHL}]_1$ (blue dots in C and D) over $[\text{LuxR-AHL}]_2$ species in the simulations performed at “single-copy” (A, C) and “multi-copy” (B, D) modes. Colored dots represent the mean and black bars represent the standard deviation of 23 (“single-copy”) and 9 (“multi-copy”) replicates. Data in B and D was extracted from Figure 10A in Chapter 1. Dashed lines in A and C show the t_c value calculated for “single-copy” mode ($t_c = 448$). The t_c value is not shown in B and C, as it is close to zero (Chapter 1).

the virtual cell population follow percolation kinetics, individual cells fluctuate between the “ON” to the “OFF” states (see dashed red circles in **Figure 7B**). Despite this, it becomes clearly apparent that groups of cells that reach the “ON” state tend to maintain such state. We explored this further and the results are shown in **Figure 8**, in which we increased the value of P_{+1} to ascertain its influence in the levels of stochasticity.

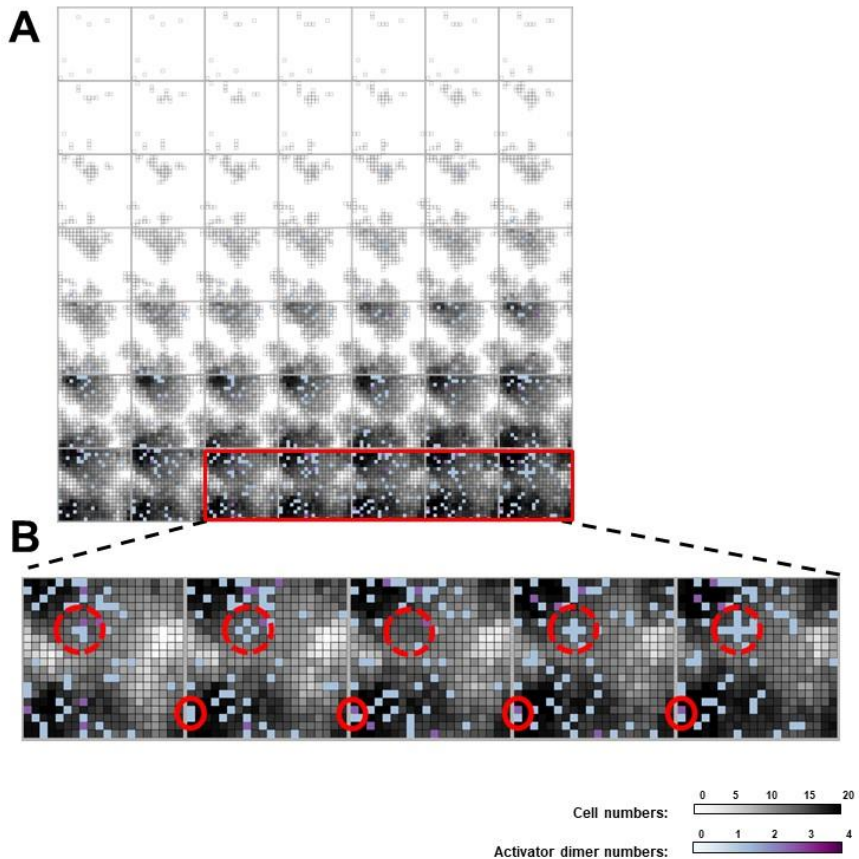


Figure 7. 2D representation of a simulation run in “single-copy” mode. **A.** Accumulation of activator dimers over time in the virtual bacterial population. Each tile corresponds to one of 49 time steps equally spaced from time zero until the end of the simulation. **B.** Amplified view of the red squared area in A, showing areas of stable cellular activation (solid red circles) and areas of intermittent activation (dashed red circles). The plots are the result of the projection of the apical view of the 3D cubic lattice into 2D. Each pixel corresponds to a column in the box. Column cell density as a function of time is represented in gray scale. Column accumulation of LuxR dimers ($[\text{LuxR-AHL}]_2$) is represented in purple. The color keys indicate the number of cells and dimers per column.

A

$$P_{+1} = 0.001$$

Bacteria:



Activator dimers:

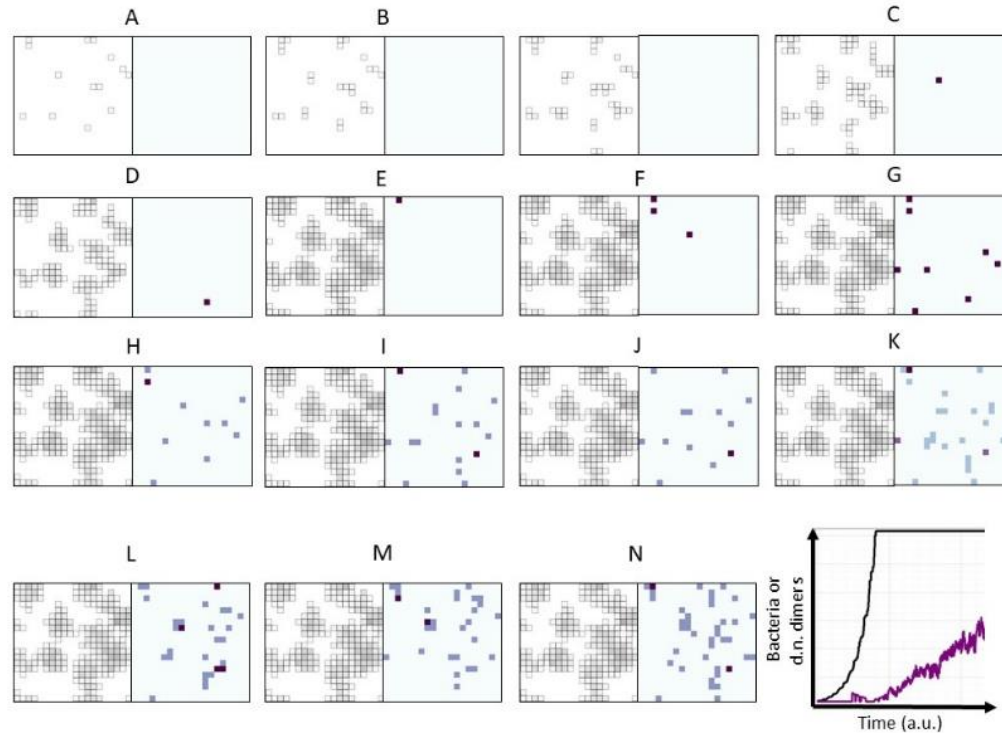


Figure 8A. Effect of increasing the rate of LuxR synthesis on the simulated QS-like response in “single-copy” mode

B

$$P_{+1} = 0.01$$

Bacteria:



Activator dimers:

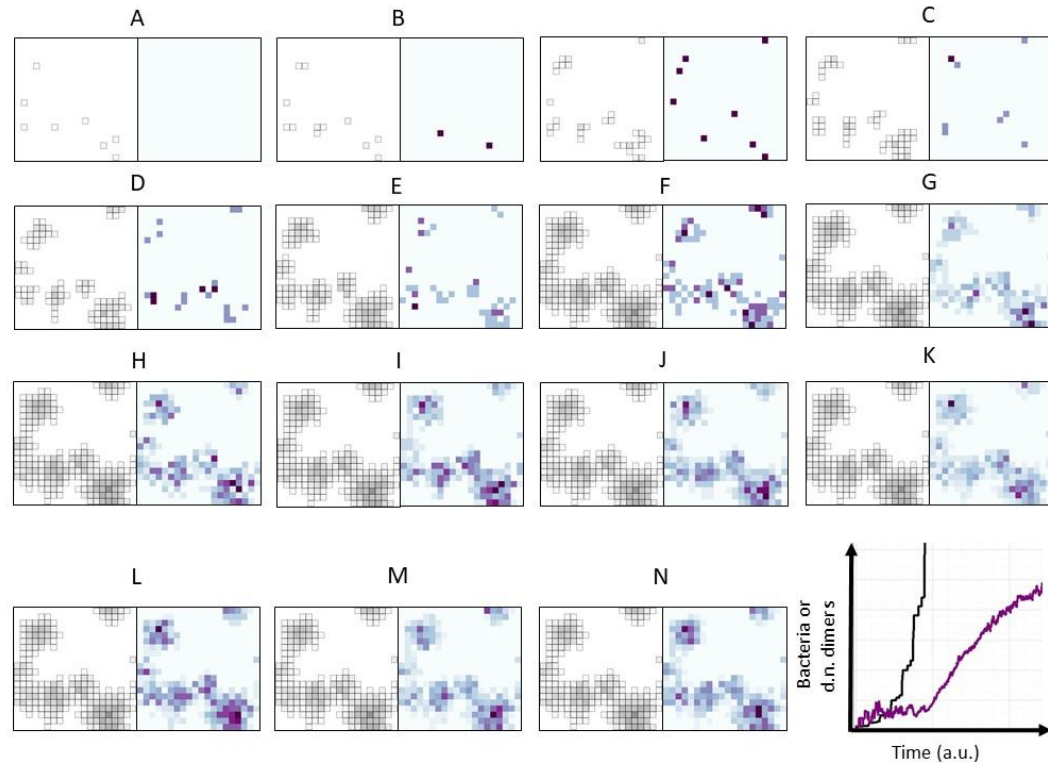


Figure 8B. Effect of increasing the rate of LuxR synthesis on the simulated QS-like response in “single-copy” mode

C

$P_{+1} = 0.1$

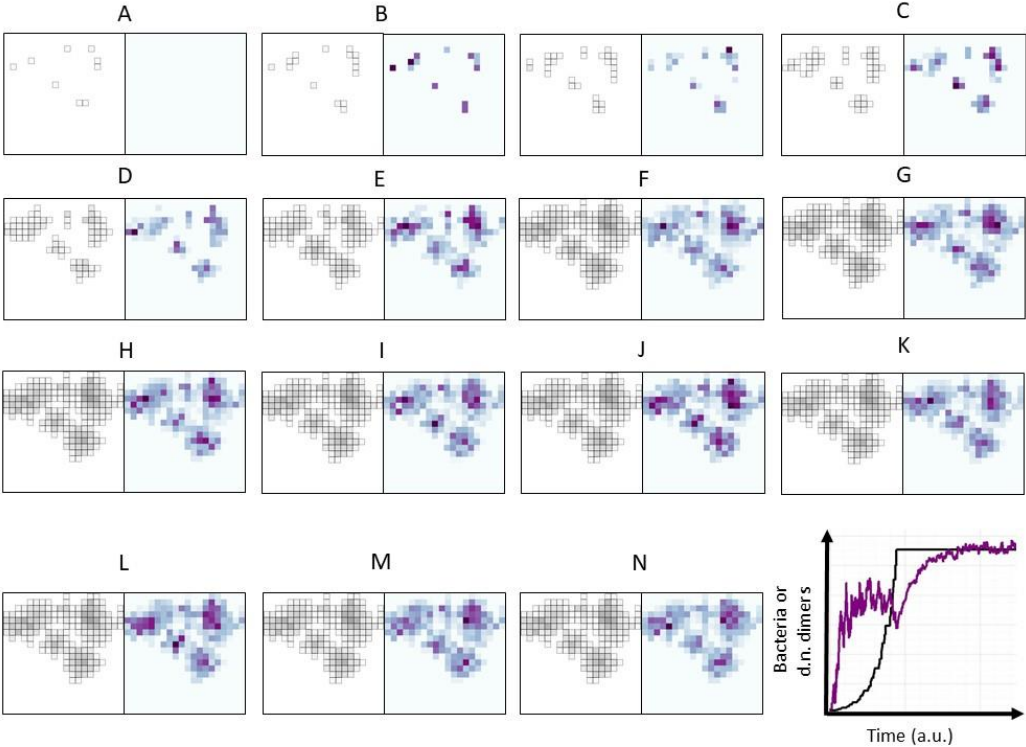
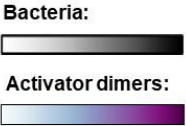


Figure 8C. Effect of increasing the rate of LuxR synthesis on the simulated QS-like response in “single-copy” mode

D

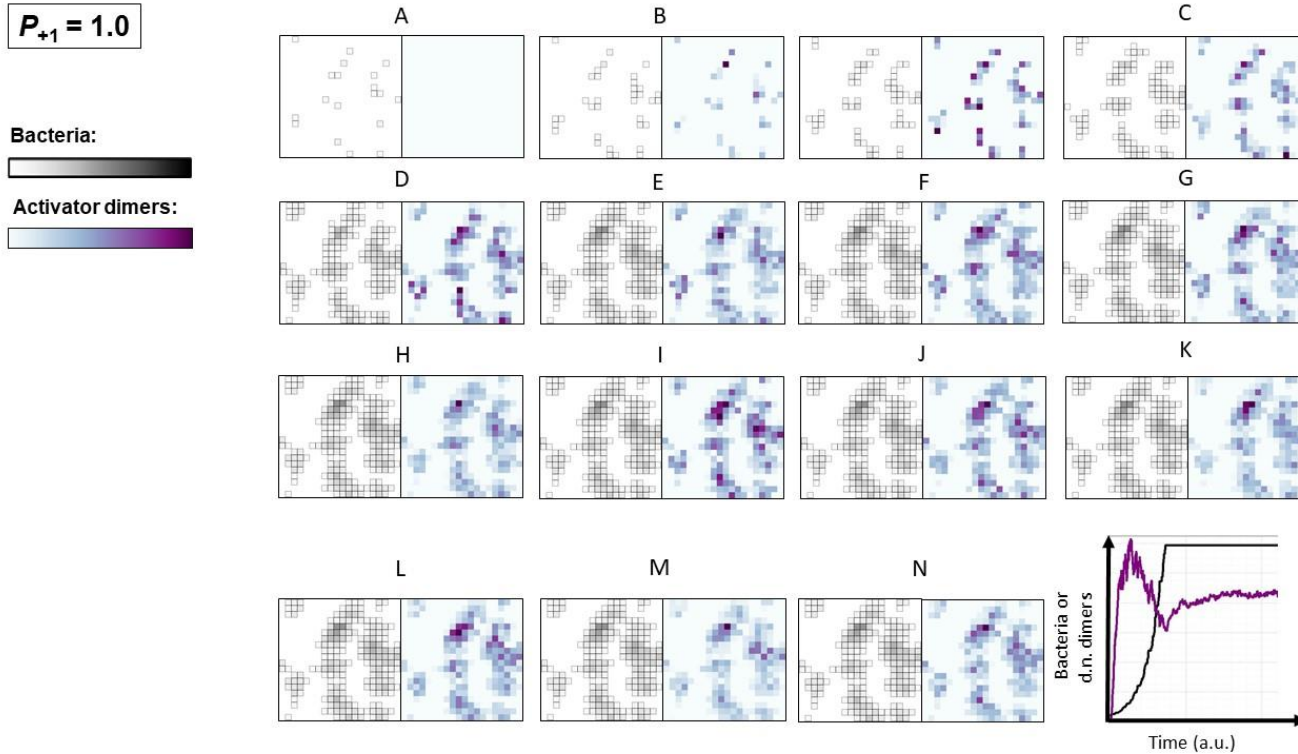


Figure 8D. Effect of increasing the rate of LuxR synthesis on the simulated QS-like response in "single-copy" mode

Legend Figure 8: Effect of increasing the rate of LuxR synthesis on the simulated QS-like response in “single-copy” mode. The intracellular levels of LuxR were changed by increasing the P_{+1} parameter that controls its synthesis rate. The rest of the simulation parameters remained unchanged. **A.** $P_{+1} = 0.001$. **B.** $P_{+1} = 0.01$. **C.** $P_{+1} = 0.1$. **D.** $P_{+1} = 1$. The cell and [LuxR-AHL]₂ tiles (A through N) are similar to those of **Figure 7** but without merging. The plot on the right shows the growth (black trace) and [LuxR-AHL]₂ accumulation (purple trace) curves for the population of virtual cells. X axes, time in a.u.; Y axes, virtual bacteria or d.n. luxR dimers ([LuxR-AHL]₂). Coordinates are omitted for simplicity.

A qualitative and speculative interpretation will only be offered at this point, leaving more profound conclusions awaiting a more thorough analysis of the data. Two important conclusions can be drawn though. First, the onset of the response maintains an inverse relationship with the synthesis rate, as hypothesized above. Second, the response becomes “tighter” as P_{+1} increases, as judged by the fact that cells that become “ON” are more likely to remain so at higher P_{+1} values. The implications of these findings will be discussed next.

A key aspect of the development of accurate bacterial cell-to-cell communication models is understanding how gene expression noise in individual cells^{16,19,28–36} translates into the cell-density-dependent synchronous QS response at the population level. Perez and Hagen, described substantial heterogeneity in the bioluminescence response of single cells of wt *A. fischeri*¹⁷. They measured the time-dependence and autoinducer-dependence of light production by individual *A. fischeri* cells immobilized in a perfusion chamber and exogenously supplied with AHL. By means of bioluminescence microscopy recording of photon emission from individual cells over time, they observed a high level of variability in the timing of the bioluminescent response and in the brightness of individual cells, even at concentrations of AHL that saturated the bulk bioluminescence of the population³⁷. The variability in the response measured was much greater than previously calculated for LuxI/LuxR system under stochastic assumptions^{17,38,39}. The authors related the observed heterogeneity to molecular noise, presumably at the level of cellular components such as ribosomes and polymerases, but they did not discard noise at the level of *lux* gene expression, even under stable autoinducer concentrations¹⁷. *In silico* studies simulating virtual *A. fischeri* cells have also shown the existence of extensive cell-to-cell heterogeneity even in the presence of

saturation AHL concentrations^{16,17}. These observations imply that while QS phenomena are imprecise in regard of the response of individual cells, synchronized bulk behaviour arises as the average response of large numbers of cells^{17,37,40,41}. Our observation of a heterogeneous response at the individual cell level in “single-copy” mode simulations agrees well with these reports. This heterogeneity is due to stochastic levels of LuxR at the single cell level. Since our simulations track the “activation” of individual virtual cells, the fact that their population responses could be approximated by PT suggests that percolation arises by the integration of multiple stochastic inputs at the individual cell level into a single population response. Weber and Buceta²⁸ investigated what they called “epigenetic variability” in the QS response, namely the stochastic stabilization of phenotypic states caused by the noise-induced activation of the QS response in a subset of cells in a homogeneous population. In their simulations, they found that the maximum noise intensity was obtained when operating at an average level of ~ 1 molecules of the activating protein per-cell⁴². Thus, while using very different simulation methods, our agent-based results showing a high degree of population variability manifested in the number of cells carrying at least one LuxR dimer agree with those of Weber and Buceta⁴². However, we found that our virtual response was not stable over time at the single-cell level (**Figure 7**). This is likely due to the absence of a positive feedback loop at the level of LuxR production in our model¹⁸. The existence of such an auto-regulatory loop was shown to be essential for the maintenance of “memory” in QS systems^{33,42}. Thus, feedback loops are effective means to create such “memory” out of noise by stabilizing an inherently unstable genetic response generated by the expression of single-copy genes. The results shown in **Figure 8** are in agreement with this idea in that increasing the rate of LuxR production decreases the likelihood that cells switch between the “ON” and “OFF” states. Future work will address this issue by introducing a feedback loop in our simulations.

On the other hand, low, noisy expression, together with the low stability of the activator molecule in its inactive form, ensures the emergence of “burst” kinetics, giving rise to delayed, coordinated population responses, as shown by our simulations (**Figure 4A**). Such

response takes the form of a percolation-like function with a t_c that marks the time of the burst. Our results show that in the context of QS, PT connects single-cell stochasticity to emergent population behaviour. At the same time, our simulations demonstrate the power of open-ended computer methods to recreate emergent behaviours starting from simple microscopic rules.

The results presented here, together with those of **Chapter 1** and **Appendix 3** start to delineate a picture in which the intracellular level of protein LuxR is the main effector of QS responses. This is in stark contrast to the currently held view in which autoinducer accumulation is the key factor in ensuring the emergence of highly orchestrated responses out of individual cells. Our results performed with “QS mute” cells, both *in silico* and *in vivo* are consistent with the hypothesis that stochasticity at the level of LuxR can, by itself, lead to the emergence of community behaviour. Future experiments to test this hypothesis will require the creation of an *in vivo* model of stochastic LuxR expression. Such model system would carry a single copy of the *luxR* gene placed next to regulatory components with a predictable dynamic range⁴³, thus allowing precise control over LuxR expression.

7.3. REFERENCES

- (1) McClean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J. H.; Swift, S.; Bycroft, B. W.; Stewart, G. S. A. B.; Williams, P. Quorum Sensing and Chromobacterium Violaceum: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of N-Acylhomoserine Lactones. *Microbiology* **1997**, *143* (12), 3703–3711.
- (2) Stauff, D. L.; Bassler, B. L. Quorum Sensing in Chromobacterium Violaceum: DNA Recognition and Gene Regulation by the CviR Receptor. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (15), 3871–3878.
- (3) August, P. R.; Grossman, T. H.; Minor, C.; Draper, M. P.; MacNeil, I. A.; Pemberton, J. M.; Call, K. M.; Holt, D.; Osburne, M. S. Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from Chromobacterium Violaceum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *2* (4), 513–519.
- (4) Sánchez, C.; Braña, A. F.; Méndez, C.; Salas, J. A. Reevaluation of the Violacein Biosynthetic Pathway and Its Relationship to Indolocarbazole Biosynthesis. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1231–1240.
- (5) Chen, G.; Swem, L. R.; Swem, D. L.; Stauff, D. L.; O’Loughlin, C. T.; Jeffrey, P. D.; Bassler, B. L.; Hughson, F. M. A Strategy for Antagonizing Quorum Sensing. *Mol. Cell* **2011**, *42* (2), 199–209.
- (6) Devescovi, G.; Kojic, M.; Covaceuszach, S.; Cámara, M.; Williams, P.; Bertani, I.;

- Subramoni, S.; Venturi, V. Negative Regulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium violaceum*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 349.
- (7) Swem, L. R.; Swem, D. L.; O'Loughlin, C. T.; Gatmaitan, R.; Zhao, B.; Ulrich, S. M.; Bassler, B. L. A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors and Controls Bacterial Pathogenicity. *Mol. Cell* **2009**, *35* (2), 143–153.
- (8) Lozano, G. L.; Guan, C.; Cao, Y.; Handelsman, J.; Borlee, B. R.; Broderick, N. A.; Stabb, E. V. A Chemical Counterpunch: *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 Produces Violacein in Response to Translation-Inhibiting Antibiotics. *MBio* **2020**, *11* (3), e00948-20.
- (9) Throup, W.; Bainton, B.; Williams, S. Signalling in Bacteria beyond Bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects*; Campbell, A. K., Kricka, L. J., Stanley, P. E., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1994; pp 89–92.
- (10) Abràmoff, M. D.; Magalhães, P. J.; Ram, S. J. Image Processing with ImageJ Part II. *Biophotonics Int.* **2005**, *11* (7), 36–43.
- (11) Gallardo, M.; Staforelli, J.; Meza, P.; Bordeu, I.; Torres, S. Characterization of *Chromobacterium violaceum* Pigment through a Hyperspectral Imaging System. *AMB Express* **2014**, *4* (1), 4.
- (12) Chernin, L. S.; Winson, M. K.; Thompson, J. M.; Haran, S.; Bycroft, B. W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (17), 4435–4441.
- (13) Anbazhagan, D.; Mansor, M.; Yan, G. O. S.; Md Yusof, M. Y.; Hassan, H.; Sekaran, S. D. Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of an Autoinducer Synthase Gene among Biofilm Forming Clinical Isolates of *Acinetobacter* Spp. *PLoS One* **2012**, *7* (7), e36696.
- (14) Stanley, H. E.; Andrade, J. S.; Havlin, S.; Makse, H. A.; Suki, B. Percolation Phenomena: A Broad-Brush Introduction with Some Recent Applications to Porous Media, Liquid Water, and City Growth. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **1999**, *266* (1–4), 5–16.
- (15) Stauffer, D.; Aharony, A. Cluster Numbers. In *Introduction to Percolation Theory*; Stauffer, D., Aharony, A., Eds.; London: UK Taylor & Francis Ltd., 1994; pp 15–59.
- (16) Melke, P.; Sahlin, P.; Levchenko, A.; Jönsson, H. A Cell-Based Model for Quorum Sensing in Heterogeneous Bacterial Colonies. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (6), e1000819.
- (17) Pérez, P. D.; Hagen, S. J. Heterogeneous Response to a Quorum-Sensing Signal in the Luminescence of Individual *Vibrio fischeri*. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15473.
- (18) Shadel, G. S.; Baldwin, T. O. Positive Autoregulation of the *Vibrio fischeri* LuxR Gene: LuxR and Autoinducer Activate CAMP-Catabolite Gene Activator Protein Complex-Independent LuxR Transcription. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (11), 7696–7702.
- (19) Gorochowski, T. E.; Matyjaszkiewicz, A.; Todd, T.; Oak, N.; Kowalska, K.; Reid, S.; Tsaneva-Atanasova, K.; Savery, N. J.; Grierson, C. S.; di Bernardo, M. BSim: An Agent-Based Tool for Modeling Bacterial Populations in Systems and Synthetic Biology. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42790.
- (20) Li, G. W.; Xie, X. S. Central Dogma at the Single-Molecule Level in Living Cells. *Nature* **2011**, *475* (7356), 308–315.
- (21) Engwer, C. Understanding the Principles of Bacterial Communication and Particle Formation, and the Interaction between Them, Münster, 2019.

- (22) Vila-Sanjurjo, C.; Engwer, C.; Qin, X.; Hembach, L.; Verdía-Cotelo, T.; Remuñán-López, C.; Vila-Sanjurjo, A.; Goycoolea, F. M. A Single Intracellular Protein Governs the Critical Transition from an Individual to a Coordinated Population Response during Quorum Sensing: Origins of Primordial Language. *bioRxiv* **2016**.
- (23) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.
- (24) Andersen, J. B.; Heydorn, A.; Hentzer, M.; Eberl, L.; Geisenberger, O.; Christensen, B. B.; Molin, S.; Givskov, M. Gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (2), 575–585.
- (25) Cheng, H. J.; Ee, R.; Cheong, Y. M.; Tan, W.-S.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Detection of Quorum Sensing Activity in the Multidrug-Resistant Clinical Isolate *Pseudomonas Aeruginosa* Strain GB11. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14* (7), 12511–12522.
- (26) Kempner, E. S.; Hanson, F. E. Aspects of Light Production by Photobacterium Fischeri. *J. Bacteriol.* **1968**, *95* (3), 975–979.
- (27) Engebrecht, J.; Nealson, K.; Silverman, M. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio Fischeri*. *Cell* **1983**, *32*, 773–781.
- (28) Weber, M.; Buceta, J. Dynamics of the Quorum Sensing Switch: Stochastic and Non-Stationary Effects. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7* (1), 6.
- (29) Perez, P.; Weiss, J.; Hagen, S. Noise and Crosstalk in Two Quorum-Sensing Inputs of *Vibrio Fischeri*. *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5* (1), 153.
- (30) Müller, J.; Kuttler, C.; Hense, B. A.; Rothballer, M.; Hartmann, A. Cell–Cell Communication by Quorum Sensing and Dimension-Reduction. *J. Math. Biol.* **2006**, *53*, 672–702.
- (31) Goryachev, A. B. Design Principles of the Bacterial Quorum Sensing Gene Networks. *Wiley Interdiscip. Rev. Biol. Med.* **2009**, *1* (1), 45–60.
- (32) Fujimoto, K.; Sawai, S. A Design Principle of Group-Level Decision Making in Cell Populations. *PLoS Comput Biol* **2013**, *9* (6), e1003110.
- (33) Williams, J. W.; Cui, X.; Levchenko, A.; Stevens, A. M. Robust and Sensitive Control of a Quorum-Sensing Circuit by Two Interlocked Feedback Loops. *Molec Syst Biol* **2008**, *4*, 234.
- (34) Rai, N.; Anand, R.; Ramkumar, K.; Sreenivasan, V.; Dabholkar, S.; Venkatesh, K. V.; Thattai, M. Prediction by Promoter Logic in Bacterial Quorum Sensing. *PLoS Comput Biol* **2012**, *8* (1), e1002361.
- (35) Goryachev, A. B. Understanding Bacterial Cell-Cell Communication with Computational Modeling. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 238–250.
- (36) Kurz, V.; Nelson, E. M.; Perry, N.; Timp, W.; Timp, G. Epigenetic Memory Emerging from Integrated Transcription Bursts. *Biophys. J.* **2013**, *105* (6), 1526–1532.
- (37) Pérez, P. D.; Hagen, S. J. Heterogeneous Response to a Quorum-Sensing Signal in the Luminescence of Individual *Vibrio Fischeri*. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15473.
- (38) Cox, C. D.; Peterson, G. D.; Allen, M. S.; Lancaster, J. M.; McCollum, J. M.; Austin, D.; Yan, L.; Sayler, G. S.; Simpson, M. L. Analysis of Noise in Quorum Sensing. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2003**, *7* (3), 317–334.
- (39) Anetzberger, C.; Pirch, T.; Jung, K. Heterogeneity in Quorum Sensing-Regulated Bioluminescence of *Vibrio Harveyi*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73* (2), 267–277.
- (40) Zhou, T.; Chen, L.; Aihara, K. Molecular Communication through Stochastic Synchronization Induced by Extracellular Fluctuations. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95* (17).
- (41) Wang, J.; Zhang, J.; Yuan, Z.; Zhou, T. Noise-Induced Switches in Network Systems of the Genetic Toggle Switch. *BMC Syst. Biol.* **2007**, *1*, 50.

- (42) Weber, M.; Buceta, J. Stochastic Stabilization of Phenotypic States: The Genetic Bistable Switch as a Case Study. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 73487.
- (43) Chen, Y.; Ho, J. M. L.; Shis, D. L.; Gupta, C.; Long, J.; Wagner, D. S.; Ott, W.; Josić, K.; Bennett, M. R. Tuning the Dynamic Range of Bacterial Promoters Regulated by Ligand-Inducible Transcription Factors. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–8.





8. DISCUSIÓN





Una parte sustancial de esta tesis, se ha centrado en la caracterización exhaustiva del biosensor *E. coli* fluorescente como herramienta para medir posibles interferencias de nanopartículas de quitosano (CS NPs; del inglés, *chitosan nanoparticles*) sobre la respuesta de QS. Como prueba de concepto, en el **Capítulo 1** utilizamos un inhibidor con actividad *quorum quenching* (QQ) probada, el *trans*-cinamaldehído (CA) ^{1,2} y demostramos que la ruta de regulación de la expresión de GFP dependiente de la interacción entre LuxR y AHL en el biosensor podía ser efectivamente inhibida (**Capítulo 1**). Esta prueba de concepto nos permitió hacer uso del biosensor en los **Capítulos 2** y **3** como herramienta precisa para testar la actividad QQ de nuestras NPs.

En el proceso de caracterización *in vivo* del biosensor hemos descubierto una serie de características inherentes a la construcción de la respuesta de QS dependiente de la inducción con AHL que la conectaban con un mecanismo de transición de fase. Así, el **Capítulo 1** se ha extendido en torno a la hipótesis de que la respuesta de QS bacteriano es similar a la de otros fenómenos críticos de transición de fase existentes en la naturaleza y que están gobernados por la teoría de la percolación. Para ahondar en esta hipótesis, hemos utilizado la función de percolación como herramienta matemática para ajustar los datos de regulación de la respuesta de QS mediada por LuxR-AHL, tanto en cultivos experimentales como en simulaciones *in silico*. Además, hemos conseguido extrapolar este modelo de ajuste a otras respuestas bacterianas publicadas y cuantificadas en una serie de modelos de QS tanto *in vivo* como *in silico* (**Anexo 3**) y lo hemos aplicado *in silico* a un caso límite hipotético en el que la expresión de LuxR a partir de una única copia del gen *luxR*, estuviese controlada por ruido estocástico (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**). Estos estudios nos han llevado a proponer una visión del QS en la que LuxR adquiere un papel prominente, a diferencia de la visión tradicional imperante, que hace recaer este rol sobre el autoinductor. Además, los estudios de inhibición mediante CA *in vivo*, en combinación con las simulaciones *in silico*, nos han llevado a proponer un nuevo modelo de inhibición de QS desconocido hasta el momento, que podría tener consecuencias importantes en el diseño de nuevas estrategias antimicrobianas que actúen sobre este proceso. Las principales conclusiones de estos análisis

iniciales del biosensor, del sistema de QS y de su inhibición se recogen a continuación.

Los estudios seminales de Kempner y Hanson en 1968³, y de Nealson *et al.* en 1970⁴ en cultivos de vibrios marinos pusieron de manifiesto un comportamiento sincronizado de bioluminiscencia dependiente de la densidad celular, por el cual el viraje hacia la producción de luz se adelantaba en el tiempo cuanto mayor era la densidad del cultivo. Estas observaciones y otras posteriores llevaron a la idea generalizada de que la sincronización de las respuestas de *quorum sensing* (QS) depende de la capacidad de las células individuales para percibir la densidad poblacional. La explicación más aceptada para este fenómeno de percepción del censo celular se basa en la acumulación durante el crecimiento celular de moléculas autoinducidas hasta una concentración crítica, a partir de la cual se desencadena la respuesta sincronizada⁴⁻⁸. Es importante señalar que la mayoría de los experimentos pioneros fueron realizados en cultivos en fase de crecimiento logarítmico y, por tanto, el viraje de los cultivos a la respuesta de QS se observó principalmente en condiciones de cultivo en lote, donde los comportamientos de las células individuales pasan inadvertidos^{3,4,6,9-13}. Una serie de trabajos más recientes apuntan a que la inducción de la respuesta de QS en células individuales puede seguir trayectorias que divergen del comportamiento promediado de la población y, por tanto, la formación coordinada de respuestas de QS podría ser más compleja de lo que se venía asumiendo¹³⁻¹⁵.

El hecho que invariablemente nuestros datos se ajusten, con un alto grado de correlación ($R^2 \sim 0.95-0.99$, **Capítulo 1, Anexo 3, Capítulo 4**), a la función de percolación, nos permite proponer una serie de mecanismos moleculares esenciales para la elaboración de comportamientos coordinados de QS a partir de las respuestas de células individuales, incluso en ausencia de síntesis de autoinductor. Una conclusión fundamental de estos ajustes es que los niveles del activador LuxR son clave en la formación de la respuesta de QS y, para llegar a esta conclusión, la utilización de modelos con diferente número de loci *luxR* ha resultado altamente relevante. Para entender esto, hemos de analizar la relevancia de los niveles de LuxR en el tiempo crítico de respuesta (t_c). A continuación, desarrollaremos los principales

hallazgos a lo largo de la tesis que nos han llevado a comprender mejor la conexión existente entre la abundancia de LuxR y el retardo de la respuesta multicelular de QS.

8.1. LA “TRAMPA DE AHL”:

En el biosensor *E. coli*, la expresión constitutiva del gen *luxR* está dirigida desde un plásmido de alto número de copias, ~200 y con un promotor constitutivo¹⁶, lo cual podría resultar en cientos de miles de moléculas de LuxR, 9.42×10^5 moléculas según nuestras propias estimaciones (**Capítulo 1**). En las simulaciones “multi-copia”, basadas en el biosensor, mostrábamos que a medida que los monómeros libres $[\text{LuxR}]_1$ se convierten en complejos de LuxR con AHL ($[\text{LuxR-AHL}]_1$ y $[\text{LuxR-AHL}]_2$), se volvían estas últimas las especies mayoritarias y que el punto de intersección entre las curvas de $[\text{LuxR}]_1$ y el aumento de los complejos $[\text{LuxR-AHL}]_1$ y $[\text{LuxR-AHL}]_2$ coincidía aproximadamente con la concentración de AHL correspondiente al valor de la k_{Hill} (**Capítulo 1**, Figura 5E). En rangos de concentraciones de AHL cercanos a k_{Hill} , nuestras simulaciones predicen que cualquier molécula de AHL que entre en la célula encontrará una molécula de LuxR disponible, de entre las miles que se producen constitutivamente, para unirse y formar un complejo LuxR-AHL. Hemos bautizado esta hipótesis con el nombre de “trampa de AHL”. Esta hipótesis ha sido crucial para entender algunas de las observaciones descritas en este trabajo, así como para poder ajustar los parámetros de modelos *in silico* de QS basados en agentes. La hipótesis de la “trampa de AHL” también predice que la acumulación de AHL en las células ha de seguir una tendencia lineal durante una parte importante del crecimiento de la población de células (**Capítulo 1**, Figura 2), una predicción confirmada más adelante a través de nuestro modelo *in silico* basado en agentes. Un modelo matemático publicado por Müller *et al.* en 2008 lleva a una interpretación del QS que es compatible con nuestra hipótesis de la “trampa de AHL”. Este modelo sostiene que la maquinaria LuxI-R es capaz de adaptar el tiempo de formación de complejos entre LuxR y AHL a la cantidad de señal disponible¹³. Según las predicciones de este modelo, si una célula que no ha formado dichos complejos es inducida

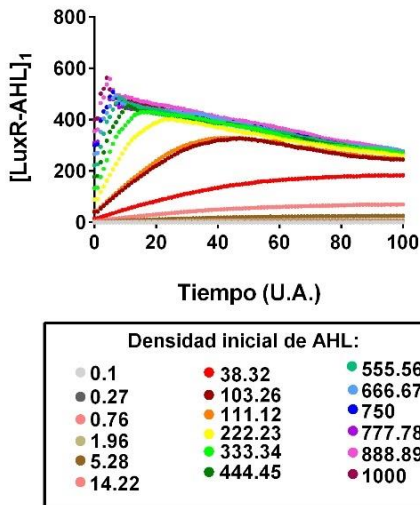


Lámina 1. Acumulación de complejos $[LuxR-AHL]_1$, normalizados por la densidad celular, con respecto al tiempo y a distintas densidades de señal, a partir de los datos del Capítulo 1 (Figura 5C).

con AHL, la tasa de formación de complejos será proporcional a la densidad de AHL disponible. El modelo predice además que el sistema LuxI-R actúa como un “filtro de paso bajo”. Esto es, un sensor que deja pasar niveles de señal inferiores a un umbral fijado y

atenúa niveles de señal superiores a este umbral. Por encima de este nivel de saturación, las células ya no discriminarían entre distintas concentraciones de señal. Este comportamiento, que aparece ilustrado en la Figura 2 de Müller *et al.*¹³, al que predicen nuestras simulaciones “multi-copia” para la evolución de los niveles de $[LuxR-AHL]_1$ a distintas concentraciones de AHL (**Lámina 1**). Aunque la forma de las curvas en tiempos largos es diferente, probablemente debido al número limitado de moléculas que se pueden incluir en nuestras simulaciones, las predicciones de Müller *et al.*¹³ y nuestras simulaciones dan lugar exactamente al mismo modelo en tiempos cortos (*cf.* Figura 2 de Müller *et al.*¹³ y Lámina 1). A pesar de la concordancia entre nuestro modelo basado en la “trampa de AHL” con el modelo de Müller *et al.*, éstos partían de asunciones alejadas de la nuestras. En primer lugar, Müller *et al.* no contemplaron la formación de $[LuxR-AHL]_2$ *al.* y tampoco consideraron la existencia de estocasticidad a nivel de la expresión de *luxR*, la cual se mantenía en una tasa constante¹³. De hecho, la única estocasticidad contemplada en los niveles de LuxR-AHL, era el reflejo del ruido a nivel de la concentración intracelular de señal. Aun así, estimaron un número mínimo de monómeros LuxR, en torno a 100, necesarios para asegurar que el sistema no funcionara de forma errática¹³. Por último, Müller *et al.* utilizaron datos experimentales para ajustar su modelo¹¹. Nosotros no hemos utilizado ningún dato experimental en

nuestras simulaciones basadas en agentes, por el contrario, en éstas el flujo de moléculas se regía en todos los pasos de forma estocástica. Es por ello muy significativo que, aun partiendo de premisas y aproximaciones muy diferentes, ambos modelos hayan llegado a conclusiones tan similares.

En concreto, el “filtro de paso bajo” describe la situación de equilibrio en que la práctica totalidad de las moléculas de LuxR están unidas a AHL. Desde la hipótesis de la “trampa de AHL”, esta situación se daría a concentraciones intracelulares de AHL cercanas o mayores a la concentración intracelular de LuxR, situación que en el caso del biosensor habría de ser en el rango milimolar ($\sim 1.57 \times 10^{-3}$ M, **Capítulo 1**). Por otro lado, Müller *et al.* encontraron que la distribución probabilística de los niveles de complejos LuxR-AHL seguía una función binomial¹³, una aproximación que se ha utilizado para explicar mecanismos de percolación en la proximidad del umbral crítico¹⁷.

8.2. EL QS EXPLICADO DESDE LA TEORÍA DE LA PERCOLACIÓN:

Hasta donde nos consta, nuestro *pre-print* publicado en 2016¹⁸ en la plataforma BioRxiv (<https://www.biorxiv.org/>), recoge la primera asociación entre percolación y QS bacteriano. En esta tesis se recogen algunas de las conclusiones adelantadas en dicho *pre-print* y se expanden para comprender mejor la relación entre percolación y QS. Teniendo en cuenta que los mecanismos de QS conforman por sí mismos fenómenos críticos, no resulta sorprendente que la teoría de percolación pueda servir de marco de referencia para modelar su funcionamiento. Recientemente, se ha propuesto que fenómenos de transición de fase ampliamente conocidos en procesos físicos, explican también respuestas celulares colectivas tales como la transición epitelial-mesenquimal en células de mamíferos¹⁹. En el caso de respuestas bacterianas, el modelo de Ising ha sido aplicado a circuitos moleculares de QS²⁰. Además, otros trabajos recientes^{13,21–23} han planteado mecanismos de transición de fase para explicar la autoinducción dependiente del sistema LuxI-R. En concreto, en un modelo de Ferkinghoff-Borg y Sams²², de forma similar a las predicciones de nuestras simulaciones (**Capítulos 1 y Capítulo 4, epígrafe 7.2**), la concentración intracelular de dímeros activos [LuxR-

AHL]₂ es la medida intrínseca para la formación del *quorum*, entendido éste como la transición de fase al estado inducido de la población de células. Según Ferkinghoff-Borg y Sams, cuando las condiciones de crecimiento determinan una concentración máxima de [LuxR-AHL]₂ por encima de un umbral determinado, se puede disparar el bucle de retroalimentación positiva a nivel de expresión de *luxI*, dando lugar a estallidos en la concentración de AHL y de más [LuxR-AHL]₂²². El panel A de la **Lámina 2** es una reproducción de la Figura 3 de Ferkinghoff-Borg y Sams²² y representa los niveles estimados de [LuxR-AHL]₂ con respecto al tamaño de colonia. En este modelo, de manera similar a nuestras propias predicciones (**Capítulo 1**), a medida que aumenta la concentración máxima de [LuxR-AHL]₂ (r_m) se reduce el retardo de la respuesta. En una publicación de 2019, Kindler *et al.*²¹ han planteado explícitamente un mecanismo de percolación para la autoinducción basada en el sistema LuxI-R. Estos autores diseñaron un modelo numérico para el funcionamiento de este sistema en colonias de células virtuales y encontraron que la producción de autoinductor tenía lugar en forma de estallidos en grupos locales de células y en una forma de comportamiento abrupto reminiscente a la percolación²¹. En su modelo, Kindler *et al.*, mostraban la autoinducción como una transición de fase abrupta, de tipo todo o nada, que era el resultado de la escalada desde pequeños focos de estallido de producción de AHL en microcolonias locales hasta un estallido global de la macrocolonia²¹. Los datos del modelo de autoinducción percolativa de Kindler *et al.* aparecen reproducidos en el panel B de la **Lámina 2**. La analogía entre el perfil de percolación de Kindler *et al.* y los de nuestras simulaciones es destacable (*cf.* paneles B y C en la **Lámina 2**). Sin embargo, las diferencias en las asunciones de ambos modelos también son importantes: mientras en el modelo de Kindler *et al.* la condición *sine qua non* para la percolación es el incremento en la producción de autoinductor debido a la activación del bucle de retroalimentación positiva centrado en la sintasa LuxI (panel B)²¹, nuestras simulaciones son totalmente independientes de esta sintasa y se centran en el papel de los complejos entre LuxR y AHL (panel B). El mecanismo de

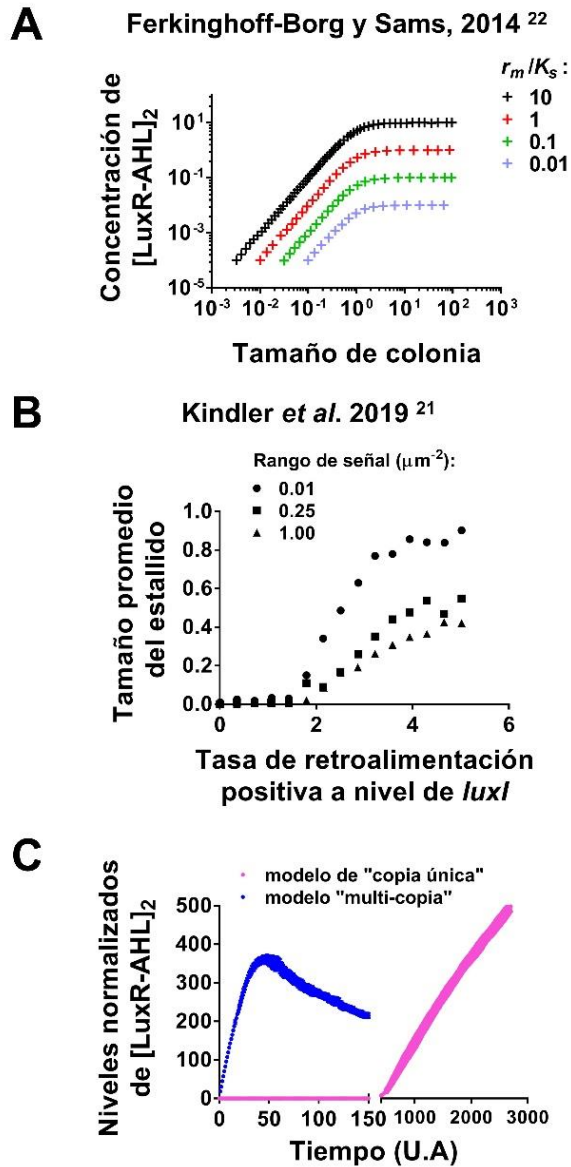


Lámina 2. Analogías entre los modelos publicados de transición de fase para el sistema LuxI-R y nuestro modelo de percolación

Leyenda Lámina 2: Analogías entre los modelos publicados de transición de fase para el sistema LuxI-R y nuestro modelo de percolación. A. Reproducción de la Figura 3 de Ferkinghoff-Borg y Sams ²² (*Mol. BioSyst.*, 2014, 10, 103-109. Publicado por The Royal Society of Chemistry. Con licencia Creative Commons). Cuando las condiciones de crecimiento dan lugar a concentraciones máximas de [LuxR-AHL]₂ (r_m), por debajo de cierto valor umbral, es imposible que se encienda el bucle de retroalimentación positiva a nivel de la sintasa, independientemente de la concentración de autoinductor. Este umbral lo marca la relación $K_s b_s / k_s$; siendo K_s la constante de disociación del dímero activo [LuxR-AHL]₂ con el promotor de *luxI*; b_s la producción basal de AHL y k_s tasa de producción de AHL una vez inducido el bucle de retroalimentación positiva a nivel de *luxI* ²². Por el contrario, cuando las condiciones de crecimiento favorecen la acumulación de [LuxR-AHL]₂ significativamente por encima de la relación anterior, se activa el bucle de retroalimentación positiva. Para Ferkinghoff-Borg *et al.* el efecto del bucle de retroalimentación positiva es una producción incrementada de moléculas señal y una transición abrupta en los niveles de dímeros de activador ²². Los trazos con cruces representan los niveles estimados de [LuxR-AHL]₂ con respecto al tamaño de colonia y en ausencia de bucle de retroalimentación positiva a nivel de *luxI*. Los distintos colores representan diferentes asunciones en la relación r_m / K_s , con valores entre 0.01 y 10.0. B. Reproducción de la Figura 12 de Kindler *et al.* ²¹ (*Sci Rep* 9, 12077 (2019). Con licencia Creative Commons), que representa el tamaño medio del estallido de inducción normalizado por la densidad celular en función de la producción adicional de autoinductor, derivada del bucle de retroalimentación positiva. El comportamiento abrupto del estallido de inducción es reminiscente de un proceso de percolación, cuyo máximo aumenta conforme lo hace el rango de señal. Los estallidos son reflejo de la inducción simultánea de un clúster de células y la transición de fase (percolación) marca el salto abrupto desde clústeres pequeños a estallidos con dimensión del orden de tamaño de la colonia ²¹. C. Evolución de los niveles normalizados de dímeros [LuxR-AHL]₂ según nuestras simulaciones. El tiempo necesario para lograr la transición de fase (t_c) se ve ampliamente incrementado cuando el algoritmo asume elevadas tasas de ruido molecular asociado a la producción de monómeros LuxR y a la formación de complejos LuxR-AHL (cf. trazos azul y magenta, correspondientes a las simulaciones en modo “multi-copia” (Capítulo 1) y “copia única” (Capítulo 4, epígrafe 7.2), respectivamente.

percolación de Kindler *et al.* ²¹ y otros relacionados ^{22,23} aportan modelos elegantes y con un interés indiscutible para comprender tanto las dinámicas de autoinducción durante el crecimiento de colonias y biopelículas como el papel que cumplen aspectos como la difusión del autoinductor y la distribución espacial de las células en el establecimiento de comportamientos coordinados de QS ²¹. Estos modelos validan además nuestra elección de la función de percolación como herramienta matemática de ajuste de la sincronidad celular mediada por QS. Teniendo en cuenta que nuestro modelo correlaciona el “encendido” celular con la formación de dímeros activos [LuxR-

AHL]₂, las analogías entre las curvas de acumulación de dímeros y los modelos de transición de fase publicados por otros autores (**Lámina 2**) justifican que expliquemos dicho “encendido” como un mecanismo de percolación, una vez se supera un umbral de complejos activos de LuxR-AHL. En nuestras simulaciones, el tiempo crítico (t_c) para lograr la transición de fase se ve ampliamente incrementado cuando el algoritmo asume elevadas tasas de ruido molecular asociado a la producción de monómeros LuxR y a la formación de complejos LuxR-AHL (*cf.* trazos azul y magenta, en el panel B de la Lámina 4, correspondientes a las simulaciones “multi-copia” y “copia única”, respectivamente (**Capítulo 1** y **Capítulo 4, epígrafe 7.2**). Además, el hecho de haber podido ajustar satisfactoriamente nuestros datos experimentales a la función de percolación nos lleva a plantearnos que pueda existir una correspondencia entre los procesos naturales regulados por la unión de AHL a LuxR y la teoría de percolación. A favor de esto, presentamos los siguientes argumentos: en primer lugar, los exponentes estimados tras ajustar los datos experimentales y derivados de simulaciones a la función de percolación (Ecuación 1, **Capítulo 1**), tienden a acercarse a los valores universales contemplados desde un modelo de percolación clásica ²⁴. Segundo, la percolación es consistente con la integración de múltiples respuestas microscópicas sometidas a ruido molecular en las células individuales, en una respuesta macroscópica coordinada de la población (**Capítulo 1** y **Capítulo 4, epígrafe 7.2**). Por último, la capacidad del antagonista de QS *trans*-cinnamaldehído (CA) para retrasar la “fase percolativa” en el biosensor *E. coli*, tanto *in vivo* como *in silico* (**Capítulo 1**), recuerda sobremanera al efecto de otros inhibidores conocidos que interfieren con la formación de sistemas interconectados de percolación. Por ejemplo, el cuajado o coagulación de la leche mediado por renina (o quimosina) está dirigido por la desestabilización de la micela de caseína y su subsecuente floculación y gelificación durante el procesado industrial de productos lácteos ²⁵. Este fenómeno ha sido explicado como un proceso de percolación, cuyo tiempo crítico de coagulación, (t_c), es inversamente dependiente de la concentración de la enzima quimosina ²⁶ y de la concentración inicial de micelas de caseína ²⁷.

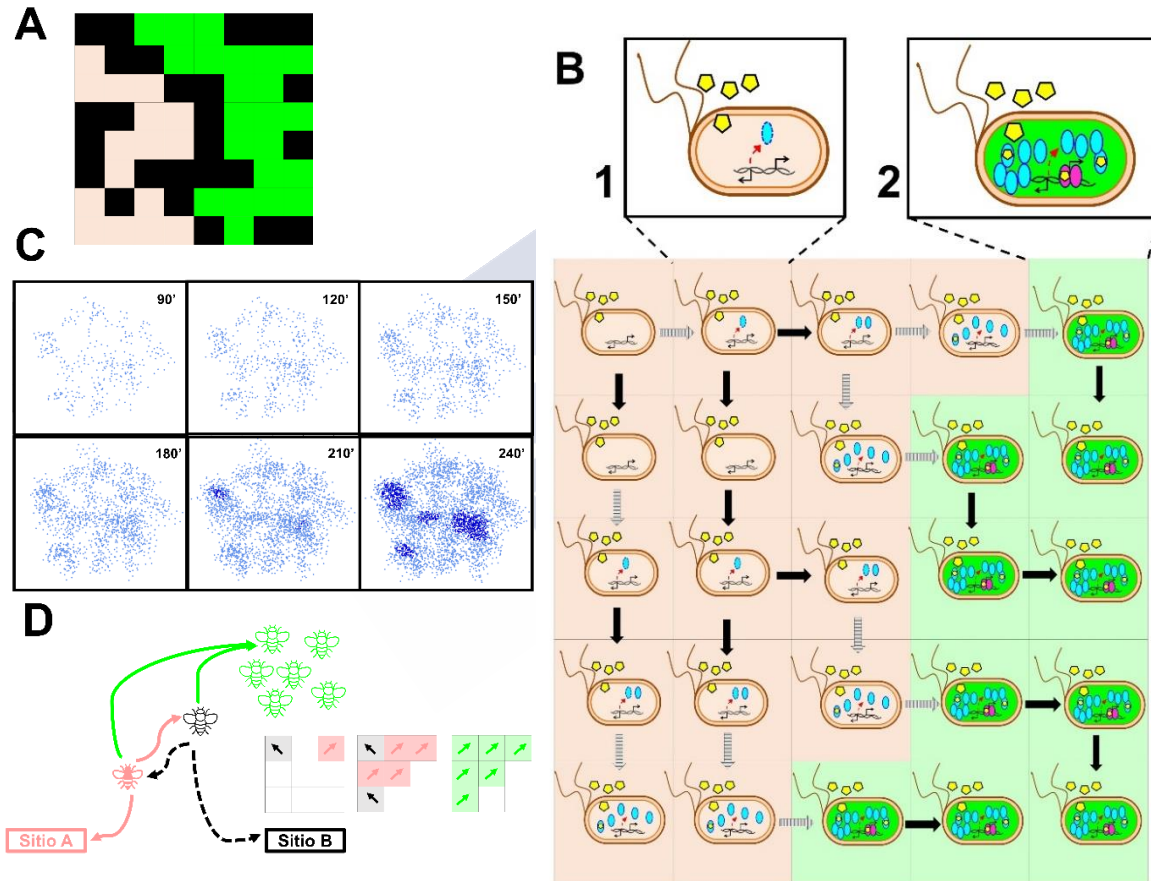


Lámina 3. Establecimiento de redes de conectividad en distintos modelos de percolación

Leyenda Lámina 3: Establecimiento de redes de conectividad en distintos modelos de percolación. **A.** Modelo de percolación clásico en dos dimensiones. En una cuadrícula con $n \times n$ sitios, cada sitio tiene dos opciones: puede estar libre (rosa) o bloqueado (negro). Los sitios libres se pueden conectar con otro sitio libre de las filas superiores o inferiores por medio de una cadena de sitios libres inmediatamente adyacentes (en las posiciones superior, inferior, derecha o izquierda). Los sitios conectados se llenan y se representan en verde. El sistema percola cuando se establece conectividad por medio de una cadena de sitios que logran llenarse desde la primera a la última fila de la cuadrícula. El modelo es una réplica del mostrado en www.cs.princeton.edu ⁸. **B.** Modelo hipotético de conectividad por la propagación clonal del estado celular activado durante los episodios de división celular, basado en las predicciones *in silico* de percolación de los complejos LuxR-AHL (**Capítulo 1 y Capítulo 4, epígrafe 7.2**). La tasa de expresión de *luxR*, la acumulación intracelular de señal y la tasa de crecimiento de la célula serían parámetros de control cruciales que dictarían la probabilidad de establecimiento de conectividad a nivel del estado de activación a través de los linajes celulares y la capacidad de sincronización multicelular de la respuesta regulada por los complejos [LuxR-AHL]₂. Recuadro ampliado número 1: los pentágonos amarillos representan las moléculas de AHL, la flecha discontinua roja denota la expresión estocástica de un monómero LuxR₁ (óvalo azul cian) a partir de su promotor. Recuadro ampliado número 2: la acumulación estocástica de complejos [LuxR-AHL]₁ (óvalos azul cian unidos a hexágonos amarillos) a lo largo de los distintos episodios de división celular haría que algunos linajes de células se viesen más enriquecidos y pudiesen formar complejos activos [LuxR-AHL]₂ (dos óvalos rosas unidos a hexágonos amarillos). En estas células, la unión de [LuxR-AHL]₂ al ADN desencadenaría la activación de la respuesta de QS (células verdes). Las flechas negras y discontinuas representan episodios únicos o múltiples de división celular, respectivamente. **C.** Modelo de percolación de la autoinducción propuesto por Kindler *et al.* ²¹. La producción de señal está sobre-regulada positivamente una vez que se alcanza la concentración umbral y las células vecinas de una célula emisora tienen más probabilidades de inducirse, debido a la elevada concentración local de señal. Esto se traduce en estallidos locales de inducción que tienen lugar como saltos abruptos en la concentración de autoinductor y en fracciones concretas de células inducidas dentro de la colonia. La figura es una réplica de la Figura 4 de Kindler *et al.* ²¹ (*Sci Rep* **9**, 12077 (2019)). Con licencia Creative Commons). **D.** Modelo de toma de decisiones en abejas. Cuando las abejas deciden fundar una nueva colonia deben convencer a parte de su colmena para hacer la mudanza a un sitio determinado. Las abejas pioneras pueden escoger un sitio potencial y comunicárselo a sus compañeras por medio de una danza específica. Ante dos sitios potenciales (sitio A y sitio B), dos abejas pioneras van a tratar de convencer al resto de la colonia por medio de sus danzas y además van a tratar de socavar la opción competidora por medio de señales “stop” (vibraciones específicas para parar la danza de su competidora). La abeja rosa, pionera del sitio A, baila y manda señales de stop hacia la opción de su competidora (abeja negra, sitio B), y viceversa. Además, ambas abejas tratan de convencer al resto de la colonia. La capacidad de convicción de la

⁸ Consultado el 25 de febrero de 2021

<https://www.cs.princeton.edu/courses/archive/spring20/cos226/assignments/percolation/specification.php>

abeja A y sus seguidoras (flechas rosas) es superior a la del equipo B (flechas negras) y, por encima de un umbral crítico de señal, se alcanza un *quorum* (abejas y flechas verdes) en la colonia para mudarse al sitio A. Las figuras fueron creadas basándonos en los modelos publicados por Niven *et al.*²⁸ y Seeley *et al.*²⁹.

También se ha demostrado que la gelificación La teoría de percolación se ha utilizado recientemente para describir dos fenómenos biológicos no asociados a bacterias y que implican el concepto del *quorum*. La **Lámina 3** recoge ejemplos de formación de redes de percolación. El panel A describe el establecimiento de conectividad en el modelo clásico de percolación, cuando se supera un umbral crítico de ocupación de sitios²⁴. En el panel B proponemos un modelo hipotético de conectividad establecida a partir de la propagación, a lo largo de los episodios de división celular, del estado de activación determinado por los niveles de complejos LuxR-AHL. Según nuestras simulaciones “multi-copia” (**Capítulo 1**) y de “copia única” (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**), cuanto mayor es la estocasticidad asociada a los distintos pasos de formación de cada una de las especies LuxR (LuxR₁, [LuxR-AHL]₁ [LuxR-AHL]₂), mayor será la heterogeneidad en el estado de activación entre distintos linajes de células (*cf.* Figuras 6 y 3 de los **Capítulo 1** y **Capítulo 4, epígrafe 7.2**, respectivamente). En las simulaciones en modo de “copia única” encontramos un elevado grado de heterogeneidad celular, caracterizada por el “encendido” de clústeres aislados de células, los cuales tendían a mantener este estado en una suerte de memoria a corto plazo (Figura 3, **Capítulo 4, epígrafe 7.2**). Este mecanismo concuerda con la heterogeneidad celular observada por otros autores en condiciones de ruido molecular a nivel de la expresión de *luxR*³⁰⁻³². El comportamiento en las simulaciones del biosensor *E. coli*, por el contrario, es consistente con un elevado nivel de activación inmediato y simultáneo del total de la población de células (Figura 3, **Capítulo 1**). La observación de memoria a corto plazo en modo de “copia única”, nos hace plantearnos la posibilidad de la existencia de conectividad clonal a través de la activación de linajes celulares. Kurz *et al.*³² han demostrado *in vivo* que las células individuales son capaces de desarrollar memoria de los niveles de LuxR, a partir de la transmisión genealógica de los niveles de regulación de la expresión génica, así como de los niveles preexistentes del activador desde las

células parentales a las hijas. Se trata, pues de una forma de herencia epigenética, que conlleva una mayor sensibilidad al autoinductor en ciertas células y que se degrada únicamente por dilución debida a la proliferación celular, de modo que persiste durante varias generaciones, incluso en ausencia de la señal de QS³². En nuestras simulaciones en modo de “copia única” demostramos que, al menos teóricamente, la existencia de esta memoria se asegura mediante la persistencia de dímeros de [LuxR-AHL]₂ más allá de la división celular. Dado que nosotros no modelamos ningún bucle de retroalimentación en nuestras simulaciones, la presencia de dichos bucles, tanto a nivel de LuxR como de LuxI³³, debería favorecer la persistencia de dicha memoria. Desde el punto de vista de la teoría de percolación, esta idea de memoria clonal a través de persistencia de dímeros [LuxR-AHL]₂ podría explicar el establecimiento de redes de clústeres interconectados de bacterias durante QS.

En su modelo *in silico* de autoinducción percolativa, Kindler *et al.*²¹ también realizaron un seguimiento genealógico de los estados celulares de inducción, el cual hemos reproducido en el panel C de la **Lámina 3**. En este modelo, durante el crecimiento de las colonias se activaban y propagaban clústeres de células “encendidas” tras sucesivas cascadas de autoinducción²¹ (**Lámina 3**, panel C). La **Lámina 3** recoge además un mecanismo de conectividad percolativa en un sistema biológico de *quorum* no bacteriano. Es el caso de la toma de decisiones en abejas (panel D). La capacidad de las abejas y otros insectos sociales de llegar a un acuerdo para decidir el lugar donde establecer una nueva colonia ha sido comparada con el QS bacteriano³⁴ y se ha explicado por medio de percolación³⁵ (**Lámina 3**, panel E). De manera similar, la transmisión de impulsos nerviosos entre neuronas se explica por medio de un mecanismo conocido como “percolación de *quorum*”³⁶. En la formación de sinapsis, los estímulos propagados a través de neuronas conectadas se integran en una neurona receptora, la cual se “enciende”, una vez que se alcanza un *quorum* de estímulos³⁶. Junto a nuestros resultados, todas estas observaciones sugieren que, desde el origen de la vida, el desarrollo de respuestas multicelulares sincronizadas podría estar basado en fenómenos de tipo percolativo. Siendo el QS presumiblemente la forma más básica de comunicación

célula-célula, nuestras observaciones podrían tener importantes implicaciones para la comprensión de la evolución de la comunicación en su forma química primordial.

8.3. LA RELACIÓN INVERSA ENTRE EL TIEMPO CRÍTICO DE PERCOLACIÓN Y LOS NIVELES DE LUXR:

En el biosensor *E. coli*, la expresión constitutiva del gen *luxR* desde un plásmido de alto número de copias da lugar a una respuesta fluorescente prácticamente inmediata tras la inducción con AHL, con un tiempo crítico de inducción (percolación), $t_c \approx 7-10$ min (**Capítulo 1** y estudios de Canton *et al.* ¹⁶). Como mencionamos anteriormente, nuestra interpretación de los resultados obtenidos con el biosensor de *E. coli*, requirieron entender el circuito *lux* como una “trampa de AHL” en la que la acumulación intracelular de señal tiene lugar de forma lineal (**Capítulo 1**, Figura 2). Estas premisas fueron más tarde confirmadas por las simulaciones en modo “multi copia”. La hipótesis de la “trampa de AHL” y su implícita acumulación lineal de AHL, es consistente con la naturaleza de otros sistemas de percolación, en los cuales se sabe que el parámetro de ocupación, p_c , varía linealmente con el tiempo ^{37,38}. Se justificó así el uso de t y t_c como parámetros subrogados para ajustar nuestros datos *in silico* e *in vivo*, así como otras respuestas de QS publicadas (**Capítulos 1, Capítulo 4, epígrafe 7.2 y Anexo 3**) a la función de percolación (Ecuación 1, **Capítulo 1**). De este modo, t_c pasó a ser el tiempo necesario para alcanzar una concentración crítica de complejos de activador y AHL.

La rapidez de la respuesta de el biosensor *E. coli*, confirmada con los datos del grupo autor de su diseño ¹⁶, contrasta con el retardo observado en nuestros ajustes de percolación de datos publicados por otros autores. Dichos datos provienen de experimentos realizados con sistemas de QS en los cuales el número de copias del gen *luxR* y, por tanto, el número final de moléculas de LuxR en la célula, es considerablemente menor que en el biosensor. Por ejemplo, Engebrecht *et al.* evaluaron la producción de bioluminiscencia a partir del operón *lux*, tanto en su sistema natural (cepa salvaje de *A. fischeri*), como en una cepa recombinante de *E. coli* portadora del mismo operón en un plásmido con un número medio de copias (~ 20) ⁶. Según nuestras

estimaciones, el t_c oscilaba entre 163.15 y 169.21 min para la cepa salvaje y para la recombinante, respectivamente (**Anexo 3**). Estos resultados muestran que se necesita un número considerable de copias de *luxR*, en torno a 20, para que el tiempo de autoinducción del sistema LuxI-R en *E. coli* se equipare al de cepa salvaje. Curiosamente, los datos indican que cuando se induce con AHL exógena a cepas recombinantes de *E. coli* portadoras de ~20 loci *luxR* por célula, éstas reducen dramáticamente el t_c a ~16 - 60 min^{12,39}. Además, nuestras propias evidencias (**Capítulo 1**) y las de Canton *et al.*¹⁶ muestran que estos t_c oscilan entre ~2 y 10 min cuando el sistema inducible se expresa en *E. coli* desde un plásmido de alto número de copias, dando lugar a cientos de loci *luxR*. En base a estas observaciones, esperaríamos que el t_c para un sistema de copia única del locus *luxR* en *E. coli* habría de incrementarse considerablemente con respecto a los sistemas descritos. De hecho, Williams *et al.* han demostrado que se precisan aproximadamente 7 h para equilibrar un sistema de *E. coli* inducible mediante AHL externa y basado en una única copia de *luxR*¹⁵. Dado que las macromoléculas en copia única o en bajo número de copias se comportan estocásticamente en células vivas⁴⁰, es muy posible que en sistemas de copia única de *luxR* como el de Williams *et al.*¹⁵ existan números estocásticos de LuxR.

Hemos de resaltar que existen diferencias experimentales considerables entre todos estos trabajos que no permiten una comparación directa de los mismos. Sin embargo, la evidencia es clara y nos lleva a la conclusión de que existe una relación inversa entre t_c y los niveles intracelulares de LuxR (**Anexo 3**)^{6,12,39}. Esta aparente relación inversa va a ser utilizada de forma especulativa en esta discusión para presentar un modelo hipotético del funcionamiento del QS a nivel molecular que pueda ser comprobado experimentalmente en estudios futuros.

Por debajo de diez moléculas por célula, el ruido es inversamente proporcional a la abundancia⁴⁰. En el QS esta situación podría darse tanto a nivel de AHL como de LuxR^{14,32,33,41} y podría explicar las diferencias de comportamiento a nivel de células individuales observadas este tipo de sistemas^{30-32,42}. Nuestra observación del papel crucial de los niveles de LuxR en el arranque de la respuesta de QS,

plasmados en la relación inversa aparente entre dichos niveles y el t_c , nos llevaron a plantearnos la posibilidad de simular niveles estocásticos de LuxR, en las simulaciones en modo de “copia única” (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**). De acuerdo con lo apuntado en líneas anteriores esperaríamos obtener una gran variabilidad en las respuestas de células individuales inducidas con AHL externo. Esta hipótesis ha sido confirmada por medio de las simulaciones del **Capítulo 4 (epígrafe 7.2)**. Curiosamente, en estas simulaciones comprobamos que teóricamente un sistema con niveles estocásticos de LuxR, y en ausencia de LuxI, puede percolar. Descubrimos además que este sistema da lugar a una respuesta aparentemente dependiente de la densidad celular y a una suerte de memoria epigenética^{15,31,32} a corto plazo, la cual aparece como un engranaje del sistema (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**). Es de esperar que, de perfeccionar este modelo incluyendo la capacidad de síntesis de autoinductor y la existencia de bucles de retroalimentación a nivel de LuxI y del propio LuxR, éstos contribuirían a una memoria epigenética más persistente y una mayor precisión del interruptor molecular del QS⁴³.

Lo apuntado hasta ahora sugiere que los niveles de LuxR pueden determinar tanto el momento de inicio de la respuesta de QS, como el tipo de respuesta a nivel de células individuales, estocástica o determinista. Niveles bajos de LuxR dan lugar a comportamientos estocásticos, mientras que niveles altos, como en el biosensor, producirían una respuesta totalmente determinista en respuesta a las mismas concentraciones de AHL externo (**Capítulo 4, epígrafe 7.2** y **Capítulo 1**, respectivamente). Esta idea representa una nueva forma de entender el QS con respecto a la visión prevalente en la que el QS depende únicamente de los niveles de AHL. Los datos publicados que apoyan el papel fundamental de los niveles de LuxR en la respuesta de QS son los siguientes. Se ha demostrado que la acumulación de moléculas LuxR amortigua los cambios en la respuesta de QS ante variaciones bruscas de los niveles de AHL, asegurando una respuesta robusta¹⁵. Por otro lado, las simulaciones de Weber y Buceta³¹ predecían que a mayor concentración intracelular de moléculas LuxR, mayor rapidez de la respuesta de QS (una observación análoga a nuestro concepto de *tiempo crítico*, t_c , de respuesta)³². De manera similar,

Haseltine y Arnold ⁴⁴ encontraron que, para una cepa de *E. coli* recombinante, portadora del circuito *luxI-R* en un plásmido con un número intermedio de copias (20 copias/célula), el tiempo para el establecimiento de la respuesta de QS se podía incrementar si se reducía la tasa de traducción de *luxR*. Kurz *et al.* ³², por su parte, examinaron el efecto del ruido molecular en la regulación del operón *lux* en células individuales. En concreto, utilizaron una cepa de *E. coli* recombinante y fluorescente, portadora de una versión estocástica del operón *lux*, en la cual LuxR se expresaba constitutivamente en un nivel bajo, y estaba sobrerregulado al doble de su nivel de expresión basal tras la inducción por medio de AHL exógena, activando tanto la respuesta de QS como su propia expresión (bucle de retroalimentación positiva). Las células recombinantes de Kurz *et al.* respondían a la presencia extracelular de AHL con estallidos transcripcionales de producción de LuxR, con alto grado de variabilidad intercelular ³². En línea con lo anterior, Weber y Buceta modelaron el papel del ruido molecular sobre el regulón *lux* y encontraron que la estocasticidad a nivel de LuxR —y no a nivel de LuxI—, es precisamente la que controla la precisión del interruptor de QS ³¹. Además de las evidencias crecientes sobre el papel central de los activadores de QS tipo LuxR ^{14,15,32,44}, algunos autores han cuestionado directamente la importancia de los niveles externos de autoinductor ^{15,41}. Los estudios de Pérez y Hagen ⁴¹, que demuestran una elevada variabilidad en la respuesta de QS en células individuales de una cepa de *A. fischeri* “muda” (*i.e.* carente de la sintasa LuxI), claramente contradicen la tesis clásica centrada en el autoinductor. De forma similar, Williams *et al.* ³³ han propuesto que el desarrollo de histéresis (memoria celular invertida en los niveles de LuxR) no requiere la síntesis endógena de AHL, sino que ésta únicamente afectaría, de forma complementaria, al rango de concentración de LuxR en el cual aparece este comportamiento ³³.

Por último, hemos de reflexionar sobre las implicaciones de que las simulaciones en modo de “copia única” puedan ajustarse a percolación. Consideramos que nuestro modelo simplificado de QS puede guiar esfuerzos futuros encaminados a elucidar, desde el marco de la teoría de percolación, los detalles moleculares de la percepción celular

durante el QS en cepas de recombinantes de *E. coli* con copia única del locus *luxR*.

8.4. MODELO DE INHIBICIÓN DEL QS POR *TRANS*-CINAMALDEHÍDO (CA)

El estudio y modelado exhaustivo de la respuesta de QS del biosensor *E. coli* fluorescente discutidos en líneas anteriores nos han permitido utilizar la misma cepa para comprender las dinámicas de inhibición del QS, utilizando el *trans*-cinamaldehído (CA) como modelo por su actividad QQ reportada ^{1,2,45,46}. Los resultados de estos estudios se incluyen en el **Capítulo 1** y las principales conclusiones se recogen a continuación. La visión apuntada anteriormente de la relación directa entre t_c y los niveles de LuxR parece sostenerse a la luz de los resultados de inhibición del biosensor en presencia de CA, que muestran como t_c se incrementa a medida que se inactivan las especies $[\text{LuxR-AHL}]_{1/2}$ al añadir el CA al sistema (**Capítulo 1**). Para entender estos resultados, utilizamos nuestro algoritmo basado en agentes para tratar de recrear el perfil de respuesta del biosensor en presencia de CA. Una serie de experimentos de Niu *et al.* apuntaron a que la inhibición por parte del CA de la respuesta de QS de un biosensor basado en *E. coli* similar al nuestro debía tener lugar por unión competitiva del CA a LuxR ¹. Sin embargo, dichos experimentos no permitían discernir si la unión de CA a LuxR era capaz de impedir la formación de complejos $[\text{LuxR-AHL}]_1$ o si, alternativamente, el CA se podía unir e inactivar complejos $[\text{LuxR-AHL}]_{1/2}$ pre-formados ¹. Nuestros intentos de simular *in silico* la respuesta a la adición de CA, modelando el inhibidor como un antagonista, no produjeron los incrementos de t_c observados *in vivo*. Curiosamente, solo conseguimos recrear el retardo de la respuesta observado *in vivo* cuando el algoritmo asumió que el inhibidor se unía e inactivaba los complejos $[\text{LuxR-AHL}]_{1/2}$, de modo que dichos complejos inactivados efectivamente eliminaban la mayoría de las AHLs del sistema. En este escenario, el t_c se veía significativamente incrementado mientras duraba el secuestro de las AHLs y hasta que se agotaba el inactivador, produciéndose entonces un estallido intracelular AHLs debido a la liberación de éstas de los complejos inactivos (**Capítulo 1**, Figuras 11 y 12). En el modelo de Ferkinghoff-Borg y

Sams²² que ilustramos en el panel A de la **Lámina 2**, señalamos que se producía un retardo en la cinética de acumulación de [LuxR-AHL]₂, de manera similar a nuestras evidencias con el CA. En el modelo de Ferkinghoff-Borg y Sams²², el retardo de la respuesta se incrementaba conforme, bien disminuían los valores asumidos por el modelo para los niveles máximos de [LuxR-AHL]₂, bien aumentaba la tasa de disociación de [LuxR-AHL]₂ con el promotor en el ADN²². Nuestra hipótesis de inactivación por CA es funcionalmente equivalente a un incremento de la tasa de disociación del ADN, explicando así la similitud entre nuestro modelo de inhibición y las cinéticas de respuesta de Ferkinghoff-Borg y Sams²². Ayrapetyan *et al.*⁴⁷ han demostrado que el CA es capaz de retardar una respuesta de QS mediada por el autoinductor AI-2 en vibrios y han relacionado este efecto con la posible reducción de la capacidad de LuxR de unirse al ADN en presencia de CA⁴⁸. El LuxR al que se refieren estos autores es homólogo del de *V. harveyi* y, por tanto guarda muy poca relación con el LuxR de *A. fischeri* que expresa nuestro biosensor (ver Introducción). Sin embargo, podría ser que ambos activadores de QS fuesen inhibidos de forma similar por el CA.

Nuestras simulaciones ofrecen un mecanismo novedoso y testable experimentalmente de inhibición del QS por CA. Por ejemplo, la unión covalente de CA a LuxR podría ser testada por medio del aislamiento de la proteína tras la incubación con AHL y el inhibidor. Este y otros experimentos serán objeto de investigaciones futuras. Pensamos que el mecanismo de inhibición elucidado por nuestras simulaciones puede iluminar la búsqueda de estrategias de control antimicrobiano de nueva generación dirigidas a dianas de los reguladores de tipo LuxR.

8.5. EL MODELO DE INHIBICIÓN DE NANOPARTÍCULAS (NPS) A BASE DE QUITOSANO (CS)

Los análisis de inhibición con CA ofrecen un nuevo marco y claves importantes que permiten caracterizar otros inhibidores de QS y modelar su comportamiento. Por ejemplo, es posible que otros inhibidores de QS con modos de acción diferentes al del CA puedan perturbar otros parámetros de la cinética de la respuesta del biosensor distintos al t_c . Nuestras simulaciones del **Capítulo 1** no solo nos

llevaron a proponer el modelo de inhibición de CA, sino que nos sirvieron para testar otros tipos de inhibidores con mecanismos de acción clásicos (antagonistas, inactivadores). Partiendo de estos datos, hemos utilizado el biosensor para evaluar la capacidad de las CS NPs para interferir con el QS. Los resultados de estos estudios se recogen en los **Capítulos 2 y 3** y las principales conclusiones se exponen a continuación.

8.5.1. La estructura de las CS NPs y su influencia sobre sus propiedades fisicoquímicas y biológicas

En los **Capítulos 2 y 3** hemos preparado y comparado las propiedades fisicoquímicas y la bioactividad de tres tipos de CS NPs; en concreto, las NPs de CS-tripolifosfato (TPP) formadas por el método clásico de gelificación iónica ⁴⁹ (IC-NPs, del inglés: *ionically-crosslinked nanoparticles*; **Capítulo 2**), las mismas NPs sometidas a co-entrecruzamiento covalente con genipina (GNP) (CC-NPs, del inglés: *co-crosslinked nanoparticles*; **Capítulo 2**) y un tercer tipo, donde el CS es pre-entrecruzado con GNP previa formación de las NPs por gelificación iónica con TPP (PC-NPs, del inglés: *pre-crosslinked nanoparticles*; **Capítulo 3**). Hemos observado que, variando los tres componentes de las NPs (CS, TPP y GNP), podemos modular las propiedades coloidales y fisicoquímicas de las mismas.

En el **Capítulo 2** mostramos que las CC-NPs presentan una mayor estabilidad coloidal que las IC-NPs durante los procesos de centrifugación y resuspensión, así como durante su incubación en medio de cultivo microbiológico (medio mínimo suplementado, pH 6.9), manteniendo su integridad y el tamaño de partícula en un rango estable. Por el contrario, las IC-NPs mostraron muy baja estabilidad y tendencia a la agregación en estas condiciones (Figuras 4-5 y 3-4, **Capítulos 2 y 3**, respectivamente). En cuanto a la bioactividad, las CC-NPs mostraron baja toxicidad, en torno al 50% de la correspondiente a las IC-NPs ($IC_{50}=34.9 \mu\text{g/mL}$ frente a $16.8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, Figura 6, **Capítulo 2**), característica que permite un rango más amplio de aplicación de las CC-NPs a dosis sub-letales. A pesar del mejor perfil de toxicidad, la actividad QQ de las CC-NPs resultó ser significativamente inferior a la de las IC-NPs, las cuales mostraron una

elevada capacidad inhibitoria de la respuesta del biosensor de QS incluso a las dosis más bajas (6.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Figura 7, **Capítulo 2**). Por medio de análisis de radiación de sincrotrón SAXS, hemos sido capaces de elucidar importantes diferencias estructurales entre las IC-NPs y las CC-NPs, en particular, la estabilización a largo plazo de una estructura preexistente, pero muy lábil, de tipo núcleo-corteza a partir del entrecruzamiento covalente con GNP en las CC-NPs (Figura 3, **Capítulo 2**). Así, parece que la estabilidad coloidal mejorada y las propiedades biológicas distintas de estos dos tipos de NPs podrían deberse a la presencia de la estructura núcleo-corteza. Durante la caracterización de las NPs nos encontramos con una llamativa discrepancia entre los tamaños de partícula estimados por difracción de luz dinámica, DLS (diámetro hidrodinámico promedio ~ 200 nm, Figura 1F, **Capítulo 2**) y el valor del radio de giro ($R_g \sim 17$ nm) estimado a partir de los datos de SAXS y la función de Guinier (**Figura 2, Capítulo 2**). En base a estos resultados, proponemos que las IC-NPs y las CC-NPs se ensamblarían a partir de la agregación de NPs primarias más pequeñas, en el rango entre $\sim 30 - 40$ nm para organizarse en estructuras de tipo “frambuesa”, de acuerdo con el modelo propuesto por Huang y Lapitsky⁵⁰ para NPs de CS-TPP preparadas en presencia de sal monovalente (NaCl), de forma similar a nuestras IC-NPs.

Las características fisicoquímicas superiores de las CC-NPs y su mayor estabilidad en condiciones de cultivo microbiológico, las convierten en principio en candidatas más indicadas para el diseño de vehículos para la liberación de fármacos y otras moléculas activas con aplicaciones en control microbiano. Las ventajas de los materiales a base de CS reticulados covalentemente con GNP para aplicaciones en la liberación controlada de fármacos han sido ampliamente descritas⁵¹⁻⁶⁰ e incluyen su estabilidad, capacidad de respuesta a temperatura o pH, su baja toxicidad, entre otras. Por ello, los resultados mostrados en el **Capítulo 1** para las CC-NPs apuntan a un elevado potencial de estos nanosistemas para incorporar moléculas activas y estructuras multifuncionales o, incluso, responder a estímulos externos.

En un intento por desarrollar NPs que aunasen la elevada estabilidad de las CC-NPs y la bioactividad de las IC-NPs, en el **Capítulo 3** encontramos que, al someter una mezcla pre-gelificada de

CS/GNP a gelificación iónica con TPP, se obtenían PC-NPs de tamaño homogéneo (~100-150 nm) y en un amplio rango de relaciones de masa CS:TPP (**Figura 2, Capítulo 3**). Los análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) y reología durante el pre-entrecruzamiento del CS con GNP revelaron que la formación de las PC-NPs se inicia en condiciones próximas al punto de gelificación crítico (Figuras S1 y S3, **Capítulo 3**), donde se formarían nanoclústeres de CS-GNP (Figura 8, **Capítulo 3**). La gelificación iónica posterior con TPP podría estabilizar las cargas superficiales positivas del CS, condensando los clústeres primigenios en NPs en un rango estrecho de distribución de tamaño. Este mecanismo explicaría que el tamaño de las PC-NPs se sitúe invariablemente por debajo de los 150 nm y dentro de un estrecho rango de polidispersión (PDI ~ 0.03 - 0.05; **Tabla 1, Capítulo 2**). Además, las PC-NPs mostraron una elevada estabilidad coloidal en el medio de cultivo (**Figura 4, Capítulo 3**).

La homogeneidad de tamaño de NP lograda con el mecanismo de fabricación de las PC-NPs creemos que es una marca diferencial con respecto al método de gelificación iónica tradicional empleado en la preparación de las IC-NPs y el entrecruzamiento secundario con GNP en el caso de las CC-NPs. La **Tabla 1** del **Capítulo 3** muestra las principales diferencias entre los tres tipos de NPs que podrían suponer una serie de ventajas para aplicaciones específicas de las mismas. En primer lugar, el tamaño homogéneo de las PC-NPs contrasta con los amplios rangos de polidispersión de las IC-NPs y las CC-NPs (PDI ~ 0.1 - 0.2) y sus mayores tamaños (tamaño promedio = 617 ± 232 y 151 ± 8 nm, respectivamente; **Tabla 1, Capítulo 2**). Además, el potencial ζ de las PC-NPs es más positivo (potencial $\zeta = +33$ mV) que el de los otros dos tipos de NPs (potencial $\zeta = +25 \pm 6$ y $+20 \pm 2$ mV para las IC-NPs y las CC-NPs, respectivamente; **Tabla 1, Capítulo 2**). Por último, la introducción de la GNP en el primer paso del proceso de fabricación, esto es, reticulando el CS antes de la formación de las NPs, permite ahorrar un paso intermedio de manipulación con respecto al proceso de preparación de las CC-NPs (**Tabla 1, Capítulo 2**). Esto ocurre porque en las segundas, es necesario centrifugar las NPs tras los dos pasos de reticulación: (1) iónica y (2) covalente, para eliminar los componentes (CS, TPP y GNP) que no han reaccionado. En el caso de las PC-NPs

sólo es necesario aislar las NPs tras el último paso de gelificación iónica, favoreciendo la reproducibilidad del mecanismo de fabricación ^{61,62}.

Queda pendiente por elucidar si las PC-NPs muestran a su vez una estructura en núcleo-corteza o si, por el contrario, su ultraestructura es marcadamente diferente a la de las CC-NPs.

Las PC-NPs mostraron marcada actividad de QQ (Figura 5, **Capítulo 3**). En cuanto a su acción antimicrobiana, tanto las curvas de densidad óptica como la evaluación de los cultivos por microscopía confocal mostraron que el efecto de las PC-NPs sobre el crecimiento del biosensor era muy inferior a la magnitud de la caída de la fluorescencia (Figura 5, **Capítulo 3**). Este comportamiento apunta a una eficiente capacidad anti-QS de las PC-NPs. En conjunto, hemos demostrado que la modificación con GNP da lugar a CS NPs con estabilidad coloidal mejorada durante el proceso de fabricación y en condiciones de cultivo microbiológico. Las PC-NPs, en concreto, combinan la estabilidad coloidal mejorada de las CC-NPs con la actividad QQ de las IC-NPs. Los resultados mostrados en los **Capítulos 2 y 3** indican que la ultraestructura físicoquímica influye en la bioactividad de las CS NPs y que ésta también puede determinar sus potenciales aplicaciones. Así, por ejemplo, mientras las PC-NPs muestran perfiles interesantes para el control del QS, las CC-NPs parecen más indicadas para diseñar vehículos de liberación dirigida de fármacos y moléculas bioactivas para aplicaciones microbiológicas.

8.5.2. Efecto de las CS NPs sobre la cinética de respuesta de QS

Las evidencias de actividad antimicrobiana y anti-QS mostradas en los **Capítulos 2 y 3** muestran que el modo de acción de las nanopartículas de CS (CS NPs) difiere ampliamente del mecanismo de acción propuesto para el CA y otros tipos de inhibidores de QS modelados en el **Capítulo 1**. En el caso del CA, como ya describimos, la cinética de la respuesta de QS del biosensor *E. coli* y el hecho de que ésta se pueda ajustar a una función de percolación, nos permitió relacionar el retardo de la respuesta en presencia de CA con un efecto dependiente de la dosis de incremento del t_c . A diferencia del CA, las CS NPs (**Capítulos 2 y 3**) no afectan al t_c . La **Lámina 4** muestra algunos parámetros cinéticos

característicos del mecanismo de acción de las CS NPs sobre el biosensor. Dado que, entre los tres tipos de CS NPs desarrollados en la Tesis, las PC-NPs muestran los perfiles de actividad anti-QS más interesantes, en la **Lámina 4** utilizaremos las PC-NPs como modelo representativo. El panel A de la **Lámina 4** muestra que el t_c no se ve afectado por el tratamiento con PC-NPs, manteniéndose en torno a ~10-20 min, independientemente de la dosis de PC-NPs. Por el contrario, el tiempo que precisa el biosensor para alcanzar el máximo de fluorescencia ($t_{máx}$) se ve fuertemente afectado por el tratamiento con PC-NPs (panel B, **Lámina 4**). En concreto, el valor de $t_{máx}$ sufre una caída brusca desde ~300 min en las células control a ~100 min para PC-NP concentraciones superiores a 13.75 $\mu\text{g/mL}$. A partir de ~30 $\mu\text{g/mL}$, el lapso del tiempo hasta el máximo se estabiliza a dosis crecientes de NPs. En el panel C podemos observar que este efecto cinético correlaciona estrechamente con las magnitudes del máximo de fluorescencia (normalizada por la densidad celular, $\text{FI}/\text{OD}_{600 \text{ máx}}$) del biosensor en presencia de concentraciones crecientes de NPs. Tras una caída abrupta a concentraciones bajas e intermedias de PC-NPs, el valor $\text{FI}/\text{OD}_{600 \text{ máx}}$ permanece constante a dosis elevadas. Así, las PC-NPs promueven una reducción, a dosis bajas e intermedias, del tiempo necesario para que las células alcancen el máximo de la respuesta de QS, junto con una reducción concomitante de la fluorescencia. En los **Capítulos 2 y 3** mostramos que los cultivos del biosensor sufrían una reducción dramática en la respuesta de fluorescencia mediada por AHL tras un tiempo suficiente de incubación con los tres tipos de CS NPs, en torno a ~100-200 min (**Capítulos 2 y 3**), lo cual parece indicar que el efecto de las NPs no es inmediato. Incluso cuando las NPs se incubaban con las bacterias 60 min antes de la inducción con AHL, el efecto inhibitorio no se manifestaba desde tiempo cero (**Capítulo 3**).

En un trabajo previo de nuestro grupo, Qin *et al.*⁶³ observaron un efecto análogo de la inhibición de la tasa de respuesta fluorescente del biosensor *E. coli* a dosis intermedias de nanocápsulas recubiertas con CS (CS NCs), añadidas en condiciones de inhibición de la división celular (4 °C, 1 h), el cual correlacionaba fielmente con la adhesión electrostática de las CS NCs a la superficie bacteriana⁶³. Dado que el

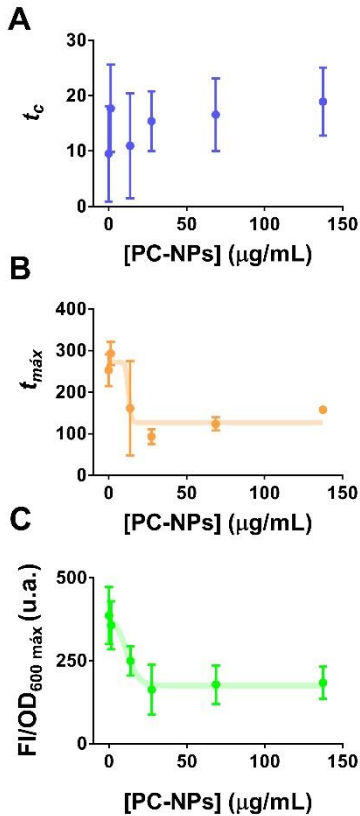


Lámina 4. Efecto de las PC-NPs sobre la cinética de la respuesta fluorescente del biosensor. A. Efecto de la dosis de PC-NPs sobre el valor t_c , estimado a partir del ajuste a la función de percolación (Capítulo 1), de las curvas de FI/OD₆₀₀ del biosensor en presencia de PC-NPs (prototipo PC-A; Figuras 6 y S5, Capítulo 3). B. Efecto de la dosis de PC-NPs sobre el valor $t_{máx}$, estimado como el tiempo necesario para alcanzar el valor máximo de FI/OD₆₀₀ (FI/OD_{600 máx}) en las Figuras 6 y S5 del Capítulo 3. C. Magnitud del FI/OD_{600 máx} en presencia de concentraciones crecientes de PC-NPs (prototipo PC-A; Figuras 6 y S5, Capítulo 3).

potencial ζ y los efectos de los tres tipos de CS NPs desarrollados en esta tesis sobre el crecimiento y la respuesta de QS del biosensor son similares a los descritos para las CS NCs (Capítulos 2 y 3, y ⁶⁴), pensamos que todos estos nanosistemas a base de CS deben compartir un mecanismo de acción común.

En base al retraso del $t_{máx}$ promovido por nuestras CS NPs, proponemos que las NPs deben precisar un tiempo determinado para unirse a la pared celular y que esta adhesión determina su efecto inhibitorio sobre la respuesta de QS del biosensor.

8.5.3. CS NPs: ¿Actividad antimicrobiana, anti-QS, o ambas?

En estudios anteriores de nuestro grupo, Qin *et al.* mostraron que únicamente un número limitado de CS NCs se podían unir a una bacteria, situación que denominaron “relación estequiométrica NC/bacteria” ⁶³. En el Capítulo 2 utilizamos la idea de la relación estequiométrica NC/bacteria para interpretar los resultados de nuestros experimentos *in vivo* en presencia de CS NPs. Por ejemplo, si asumimos que las CS NPs interactúan electrostáticamente con la envoltura bacteriana, la ausencia de dependencia de la dosis observada en los

Capítulos 2 y 3 para la inhibición de la fluorescencia del biosensor se podría explicar fácilmente. Por encima de este valor, aunque se aplicasen concentraciones superiores de nanopartículas, éstas ya no se unirían a la célula ⁶³. En nuestros experimentos, la saturación de los sitios de unión a CS NPs en la cubierta bacteriana, resultaría presumiblemente en una saturación concomitante de los procesos subsecuentes afectados por la interacción de las células con las NPs, lo cual explicaría la ausencia de dependencia de la dosis observada en los **Capítulos 2 y 3**. En ausencia de evidencias directas de su mecanismo de acción, una hipótesis sería que la unión de las CS NPs a la pared celular de *E. coli* podría alterar la captación de nutrientes y/o AHL, interfiriendo así directa o indirectamente con el mecanismo de QS del biosensor. El aislamiento frente a la libre difusión de nutrientes daría lugar a tasas metabólicas más bajas y a una reducción en la síntesis de proteínas no esenciales ^{65,66}, lo cual podría incluir la expresión de LuxR desde el promotor del plásmido en el biosensor. Por otro lado, el aislamiento a nivel de la difusión de AHL podría provocar una menor tasa de activación de las moléculas LuxR presentes en el citoplasma. La reducción de la tasa de crecimiento y de los valores máximos de OD₆₀₀ de los cultivos del biosensor en presencia de las CS NPs (Figuras 6 y 5, **Capítulos 2 y 3**, respectivamente), son en principio compatibles con la hipótesis de la captación reducida de nutrientes. Sin embargo, una serie de evidencias nos hacen dudar de que un desequilibrio metabólico sea el mayor responsable del efecto de las NPs sobre la respuesta de QS del biosensor. En el caso concreto de las PC-NPs, el efecto inhibitorio sobre la respuesta fluorescente es siempre de magnitud superior al efecto sobre el crecimiento (Figura 5, **Capítulos 2 y 3**). Por otro lado, las imágenes de microscopía confocal de cultivos tratados con PC-NPs durante tiempos prolongados, mostraron que el número de células viables era comparable al de los cultivos no tratados (Figura S4, **Capítulo 3**), indicando que no existía deficiencia de células en los primeros como consecuencia de tasas de crecimiento reducidas. La ausencia de relación dosis-respuesta para las CS NPs también parece incompatible con una capacidad potencial de las NPs para secuestrar la AHL. En el **Capítulo 1** hemos probado que la reducción de la concentración de AHL exógena efectivamente da lugar a menores

niveles de FI/OD₆₀₀ en el biosensor, pero en este escenario la posición del t_{max} permanece imperturbable (Figura 1, **Capítulo 1**), en oposición al comportamiento de las NPs (**Lámina 4**). La interacción de las CS NPs con la cubierta bacteriana podría reducir la permeabilidad de la AHL. Sin embargo, ésta sería de nuevo una situación equivalente a la reducción de la concentración efectiva de AHL (Figura 1, **Capítulo 1**). Curiosamente, las curvas de fluorescencia normalizada por la densidad bacteriana muestran sistemáticamente una “fase de recuperación” inmediatamente después de producirse las anomalías en las medidas de OD₆₀₀ para dosis bajas e intermedias de NPs (Figura 5, **Capítulo 3**). La existencia de estas “fases de recuperación” indica que la AHL todavía se encuentra presente en el sistema. De este modo, los resultados mostrados en los **Capítulos 2 y 3** no parecen explicarse a partir de una simple reducción de la captación y difusión de AHL por alteración de la cubierta bacteriana en presencia de las CS NPs. Una publicación de 1993 de Kolibachuck y Greenberg describía a LuxR como una membrana asociada a la membrana en su hospedador nativo *A. fischeri*⁶⁷. Este resultado fue confirmado posteriormente con otros activadores de QS relacionados^{67,68}. También se ha descrito que el CS es capaz de unirse a proteínas de la membrana externa de *E. coli*^{69,70}. Los experimentos futuros estarán guiados a confirmar si las proteínas LuxR recombinantes también se asocian a la membrana en *E. coli* y si las interacciones con proteínas a nivel de la membrana pueden explicar los efectos de las NPs de CS sobre la respuesta de QS del biosensor.

8.5.4. Las nanopartículas de quitosano promueven la agregación bacteriana

En los **Capítulos 2 y 3** hemos recopilado amplias evidencias de agregación bacteriana y lecturas anómalas de OD₆₀₀ en presencia de concentraciones intermedias de CS NPs (Figuras 6 y S5-S8, **Capítulos 2 y 3**, respectivamente), que, junto con micrografías mostrando números semejantes de bacterias en cultivos tratados y no tratados, indican que las medidas de OD₆₀₀ podrían no estar reflejando con exactitud la densidad celular real y la viabilidad de los cultivos en presencia de NPs. Anomalías similares fueron descritas por Qin *et al.*⁶³ y se correlacionaban con el establecimiento de las relaciones

estequiométricas NC/bacteria mencionadas anteriormente. En el **Capítulo 3** profundizamos en la caracterización de estas anomalías y observamos que éstas se correlacionaban con un comportamiento de floculación celular (Figuras 6 y S5-S8, **Capítulos 2 y 3**, respectivamente), similar al descrito por Qin *et al.*⁶³. En el **Capítulo 3** analizamos con mayor detalle este comportamiento para las PC-NPs, correlacionando los tiempos en que se producen las lecturas de OD₆₀₀ anómalas con el establecimiento de la relación estequiométrica NP/bacteria.

La **Lámina 5** muestra que los tiempos para alcanzar la relación estequiométrica siguen una clara dependencia tanto de la dosis de PC-NPs como de la densidad bacteriana. En el panel A, se observa que el tiempo para alcanzar la relación estequiométrica sigue una tendencia hiperbólica que es función directa de la concentración de PC-NPs (ver también Figura 7, **Capítulo 3**). Esto implica que la concentración de PC-NPs determina el estadio de crecimiento celular al que se alcanza el punto estequiométrico. En ausencia de mediciones directas de las relaciones número de NP/bacteria para nuestros experimentos, en el panel B de la **Lámina 5** mostramos una aproximación en la cual dividimos la concentración inicial de PC-NPs por la OD₆₀₀ a lo largo del crecimiento del biosensor. La caída de [NP]/OD₆₀₀ durante el crecimiento del biosensor en presencia de PC-NPs coincide con el patrón descrito por Qin *et al.* (Figura S7 de Qin *et al.*⁶³). Además, la magnitud de la caída en esta relación aumenta de forma lineal con la concentración inicial de PC-NPs (panel C). El mecanismo preciso de floculación dirigida por CS NPs descrito por Qin *et al.*⁶³ y estudiado en el **Capítulo 3** en el contexto del crecimiento bacteriano, convierte a estos nanosistemas en candidatos ideales para aplicaciones de control microbiano a densidades específicas de bacterias. Ejemplos de este tipo de aplicaciones podrían ser la base de la obtención de lodos activados en biorreactores, la optimización de procesos de fermentación o el desarrollo de sensores para la detección y separación de bacterias contaminantes de alimentos o patógenos⁷¹⁻⁷⁶. Recientemente se ha demostrado que ciertas bacterias comensales, incluyendo *E. coli* o *Enterobacter spp.*, entre otras, se unen a norovirus, causantes de trastornos del tracto gastrointestinal⁷⁶. En este sentido, la agregación

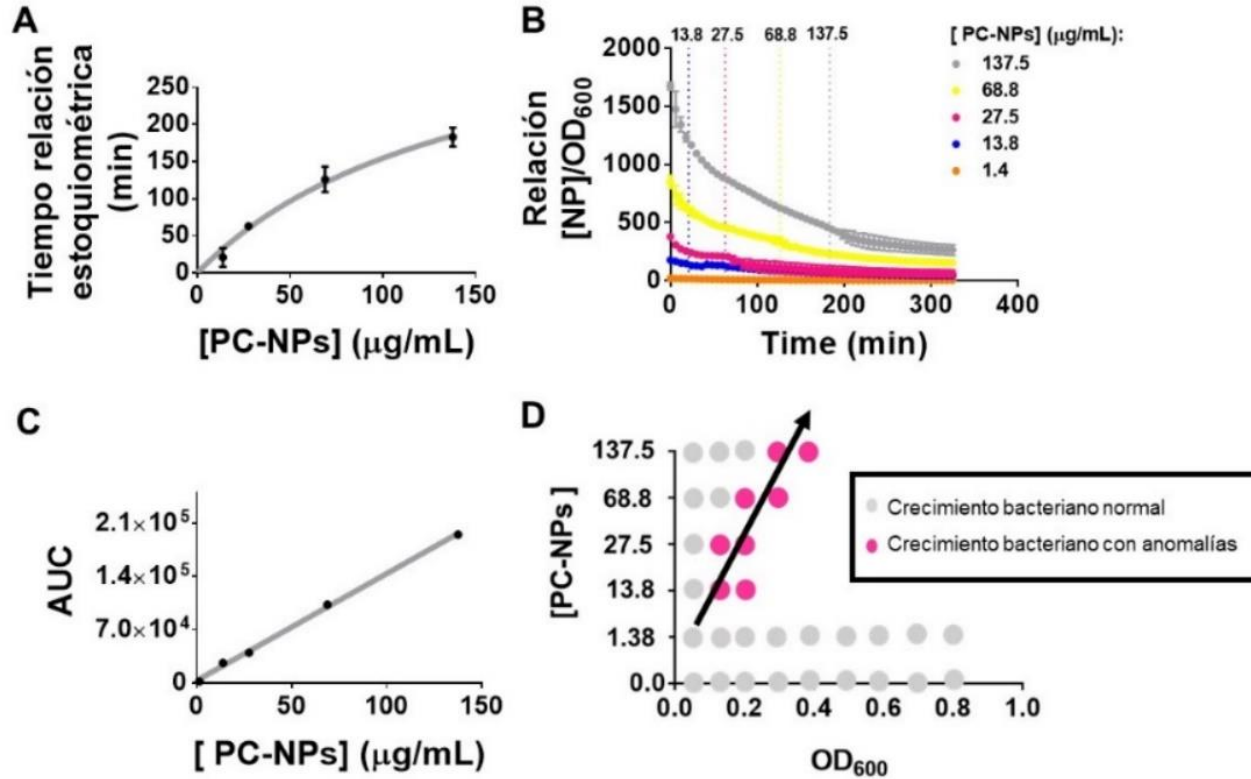


Lámina 5. Floculación bacteriana dependiente de la dosis de CS NPs y la densidad celular

Leyenda Lámina 5: Floculación bacteriana dependiente de la dosis de CS NPs y la densidad celular. **A.** Tiempo necesario para alcanzar la relación estequiométrica NP/bacteria, estimada a partir de la aparición de anomalías en las lecturas de OD₆₀₀ en momentos determinados del crecimiento y en presencia de concentraciones específicas de PC-NPs (prototipo PC-A; ver también Figura 7 del **Capítulo 3**) La línea gris muestra la interpolación de una curva de tendencia hiperbólica. **B.** Evolución de la relación NP/OD₆₀₀ durante el crecimiento del biosensor en presencia de PC-NPs (prototipo PC-A). Los datos fueron extraídos de las curvas de OD₆₀₀ mostradas en las Figuras 6 y S5 del **Capítulo 3**. Las líneas discontinuas señalan los tiempos necesarios para alcanzar la relación estequiométrica (panel A) para cada concentración de PC-NPs (misma escala de color que la mostrada a la derecha). **C.** Dependencia del área bajo la curva (AUC) de cada una de las condiciones mostradas en B con la concentración de PC-NPs. La línea gris muestra la interpolación de una tendencia lineal. **D.** Diagrama cualitativo de transición de fase ⁷⁷ desde un crecimiento normal de las células (círculos grises) hasta la aparición de anomalías en las lecturas de OD₆₀₀ (círculos rosas), en función de la concentración de PC-NPs y de la OD₆₀₀. Los datos proceden de la evaluación de las curvas de OD₆₀₀ mostradas en las Figuras 6 y S5 del **Capítulo 3**.

bacteriana inducida por CS NPs se podría aplicar para la concentración y detección de norovirus. Además de las posibles aplicaciones citadas anteriormente, las propiedades de agregación de bacterias que presentan las CS NPs podrían ser utilizadas en otros contextos. En ambientes naturales, la agregación bacteriana cumple importantes funciones, más allá de las conocidas biopelículas. Por ejemplo, es sabido que *P. aeruginosa* se suele encontrar formando agregados en los sitios de infección en el hospedador, como son el pulmón en pacientes de fibrosis quística o en heridas abiertas, y que estos agregados favorecen la tolerancia de esta especie al tratamiento con antibióticos ⁷⁷.

Un estudio reciente de Secor *et al.* ⁷⁷ ha revelado que ciertos polímeros presentes en los sitios de infección — ácido hialurónico, mucina, entre otros — son precisamente los responsables de inducir la agregación de *P. aeruginosa*, de forma independiente a la formación de biopelículas. En concreto, han demostrado que este comportamiento se basa en la depleción, o la constricción de polímeros no adsorbentes en el área intersticial entre dos bacterias adyacentes, lo cual reduce la entropía del sistema y da lugar a una agregación ordenada y alineada de las bacterias ⁷⁷.

En el mecanismo de depleción, un diagrama de fase que muestre la transición desde células dispersas a células agregadas en función de la concentración de polímero y la densidad bacteriana, va a mostrar

típicamente una pendiente negativa, derivada de la necesidad cada vez menor de polímero para agregar mayores densidades de células ⁷⁷. En contraposición a los polímeros endógenos no adsorbentes, los polímeros con capacidad adsorbente como el CS basan su capacidad de agregación en un mecanismo distinto. De hecho, Secor *et al.* utilizaron el CS en su estudio para mostrar un modelo de agregación por establecimiento de puentes, esto es, cuando el polímero se adsorbe simultáneamente a más de una bacteria, uniéndolas a modo de puente intercelular ⁷⁷. En el establecimiento de puentes, se necesita más polímero a medida que aumenta la densidad de bacterias, ya que cada vez se precisan más puentes para cohesionar las células. Así, un diagrama que muestre la transición de fase por agregación en función de la concentración de CS y la densidad bacteriana, mostraría una pendiente claramente positiva ⁷⁷. De acuerdo con este modelo, el panel D de la **Lámina 5** muestra un diagrama de la agregación de las células de nuestro biosensor en función de la concentración de PC-NPs y la densidad óptica, donde la transición de fase muestra una tendencia claramente positiva. La agregación por puentes no suele causar alineación bacteriana, sino agregados con morfología desordenada ⁷⁷, en concordancia con Qin *et al.* ⁶³ y nuestras propias evidencias con el biosensor en presencia de PC-NPs (Figura S8, **Capítulo 3**). Los resultados obtenidos por nuestro grupo (Qin *et al.* ⁶³ y **Capítulo 3**) con relación a la capacidad de agregación bacteriana de las CS NPs indican que estas nanopartículas, especialmente las PC-NPs, tienen potencial para competir con el mecanismo de agregación inducido por polímeros endógenos en sitios de infección, concretamente en los contextos de infecciones en heridas o pulmonares señalados por Secor *et al.* ⁷⁷. Una competición de este tipo podría explicar el conocido efecto beneficioso de biomateriales diversos a base de CS en procesos de cicatrización y de control infecciones ⁷⁸⁻⁸³. De hecho, el CS está aprobado para su uso en vendajes y apósitos para cicatrización ^{82,84,85}. Además, la bioactividad intrínseca de las PC-NPs se podría combinar con su potencial como vehículos de liberación de fármacos en el sitio de infección. En relación a esto, algunos estudios han demostrado que las actividades antimicrobiana y moduladora de la inflamación ejercidas por nanosistemas a base CS pueden mejorar la eficacia de fármacos,

incluyendo antibióticos y péptidos terapéuticos, en aplicaciones para la cicatrización de heridas ^{83,85-87}. La capacidad agregante y la potencial aplicación de las PC-NPs en el control de infecciones activas en heridas es por tanto un camino interesante para explorar.

El contexto de las infecciones pulmonares es, sin duda, otra vía de investigación de gran interés. La mayoría de los antibióticos administrados por vía oral para infecciones localizadas en el pulmón se ven limitados a la hora de alcanzar las concentraciones terapéuticas adecuadas en el sitio de acción. En los sitios de infección, la barrera de mucus limita habitualmente la penetración de los antibióticos. En el caso específico de la fibrosis quística pulmonar, este problema se ve incrementado, ya que la capa de mucus es más viscosa y gruesa debido a una alteración endógena del sistema de transporte de sales ⁸⁸. Este escenario resulta ideal para testar la hipótesis del potencial efecto competidor de nuestras CS NPs con la mucina para la agregación de *P. aeruginosa* y sus efectos sobre la patogénesis ⁷⁷. En combinación con sus propiedades intrínsecas, sería interesante explotar la capacidad de nuestras CS NPs como vehículos de liberación de fármacos por vía pulmonar. En este contexto, y gracias a sus propiedades aerodinámicas, los sistemas nano-microparticulados a base de CS, preparados en forma de polvo seco, son candidatos ideales para la administración de fármacos, incluyendo antibióticos, por vía pulmonar ⁸⁹⁻⁹³. Precisamente, en el escenario actual de la pandemia por SARS-CoV-2, el CS se ha propuesto como candidato para la nanoformulación de vacunas basadas en ADN para aplicación por vía pulmonar ⁹⁴. En relación a las infecciones bacterianas del pulmón, un estudio de 2015 de Gaspar *et al.* ha propuesto la formulación de levofloxacina en micropartículas de CS reticuladas con GNP para la inhalación del antibiótico en forma de polvo seco en pacientes con fibrosis quística ⁹⁵. Además, los nanosistemas a base de CS han sido propuestos como eficaces vectores no virales para la terapia génica dirigida a la fibrosis quística pulmonar y la tuberculosis ⁹⁶⁻⁹⁸. Teniendo en cuenta estos factores, las infecciones pulmonares causadas por bacterias propensas a desarrollar resistencias a antibióticos, como son las infecciones causadas por *P. aeruginosa* en pacientes de fibrosis quística o las causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, suponen un nicho de

aplicación de especial interés para nuestras CS NPs. Por otro lado, las NPs a base de CS se han mostrado eficaces para aumentar la eficacia de antibióticos en biopelículas⁹⁹, por lo que la posibilidad de que nuestras CS NPs mejoren la susceptibilidad a antibióticos tras la inducción de agregados bacterianos merece especial atención. Por último, la investigación de las propiedades anti-QS intrínsecas de los materiales a base de CS está en pleno auge y un número importante de estudios demuestran la acción sinérgica de nanomateriales de CS con la de compuestos antimicrobianos y antagonistas en la inhibición de los fenotipos dependientes del QS en *P. aeruginosa* y otras bacterias patógenas^{2,45,100–104}. En conjunto, pensamos que las evidencias mostradas en esta Tesis resaltan el gran potencial de las CS NPs para el desarrollo futuro de nanovehículos de liberación de fármacos y agentes de control microbiano de nueva generación.

8.6. PERSPECTIVAS FUTURAS:

Durante el desarrollo de esta Tesis se han abierto nuevas hipótesis que precisan ser testadas en futuras investigaciones.

En primer lugar, la hipótesis del QS como mecanismo de percolación. El estudio del interruptor QS del biosensor *E. coli* en el **Capítulo 1** nos dio una serie de claves de los aspectos fundamentales que gobierna la inducción de la respuesta de QS mediante la acumulación de complejos LuxR y AHL a partir de células saturadas en monómeros LuxR y de acuerdo con un proceso de percolación. La observación de cinéticas similares en otros sistemas de QS publicados en la literatura, incluyendo los de cepas bacterianas salvajes nos hizo plantearnos que la percolación podría ser un mecanismo predominante en las respuestas reguladas por LuxR. Con esta idea, los estudios preliminares con modelos *in vivo* e *in silico* de copia cromosómica única del gen *luxR* (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**) nos abren nuevas vías de investigación para el futuro. En particular, el hecho de que la producción de violaceína en *C. violaceum* siga asimismo una cinética de tipo percolativo merece especial atención (**Capítulo 4, epígrafe 7.1**). Por el momento, carecemos de evidencias de que la percolación opere a nivel de la regulación mediada por CviR, pero una serie de experimentos actuales en nuestro grupo de investigación se están

centrando en elucidar el mecanismo de regulación del operón *vioABCDE*, utilizando una serie de mutantes en los genes *vioS*, *cviR*, y *cviI*¹⁰⁵, combinados con experimentos de fluorescencia con resolución a nivel de células individuales. Estos estudios y una serie de experimentos futuros con cepas mutantes *vioS*, *vioS/airM*¹⁰⁶ permitirán estudiar al detalle la conexión entre la producción de violaceína en *C. violaceum* y la teoría de la percolación. Siendo *C. violaceum* una especie modelo fundamental para la evaluación de agentes inhibidores del QS, además de su enorme interés para la biofabricación de antibióticos (violaceína) y exoenzimas (quitinasa, quitosanasas) con elevado potencial biotecnológico¹⁰⁷. Por ello, pensamos que nuestras contribuciones a una caracterización precisa de los mecanismos de regulación en *C. violaceum* se pueden trasladar a aplicaciones biotecnológicas y de interferencia con el QS de gran alcance.

En segundo lugar, los experimentos *in silico* iniciales con nuestro modelo simplificado de “copia *luxR* única” (**Capítulo 4, epígrafe 7.2**) nos han llevado a plantear la hipótesis de que la estocasticidad a nivel de LuxR puede, *per se*, determinar la construcción de una respuesta de QS coordinada de poblaciones de células, aun en ausencia de síntesis de autoinductor. Los experimentos futuros irán encaminados a testar esta hipótesis en cepas de *E. coli* portadoras de versiones estocásticas y de copia única del gen *luxR*¹⁰⁸, que permitan un control preciso de la expresión de LuxR.

En tercer lugar, en la tesis planteamos nuevas hipótesis cuya elucidación se podría traducir en el desarrollo de nuevos agentes de control microbiano, así como de nanosistemas multifuncionales para la liberación dirigida de fármacos. En este sentido, la hipótesis derivada del modelo *in silico* de inactivación de los complejos de LuxR y AHL por unión covalente al CA (**Capítulo 1**) ha de ser testada *in vivo* por medio de herramientas de proteómica. Además de profundizar en el conocimiento del mecanismo anti-QS del CA, estos estudios podrían encaminar al diseño de nuevas moléculas sintéticas con mecanismos de inhibición análogos al propuesto en nuestro modelo.

En cuarto lugar, los efectos mostrados de las CS NPs sobre la agregación y la inhibición de la respuesta de QS en las células del biosensor *E. coli* precisan sin duda de un estudio más profundo

encaminado a desentrañar las interacciones a nivel de la interfase nanopartícula-bacteria. Concretamente, los estudios futuros con las CS NPs irán enfocados a estudiar sus interacciones con componentes de las membranas bacterianas (peptidoglicano, lipopolisacárido porinas, entre otros) ¹⁰⁹⁻¹¹². En este sentido, la posibilidad de que LuxR esté ligado a la membrana en la cepa recombinante de *E. coli* ⁶⁷ no se ha investigado y podría ser esencial para entender los efectos de las CS NPs sobre la respuesta de QS. Por tanto, los esfuerzos futuros deberán incluir necesariamente experimentos que permitan identificar si existen interacciones entre las CS NPs y LuxR ^{67,113}.

Por último, y como se discutió en secciones anteriores, la hipótesis de que la agregación promovida por las CS NPs y dirigida a densidades específicas de bacterias pueda competir con mecanismos endógenos de agregación bacteriana en sitios de infección requiere ser testada en modelos de infección, con especial relevancia en los escenarios de terapia pulmonar y cicatrización de heridas ^{77,89,90,96,114}. Aspectos fundamentales a tratar en estos enfoques serán los efectos de las CS NPs sobre la susceptibilidad de los agregados bacterianos a antibióticos y otras moléculas activas así como a fagos o a la interferencia dirigida con RNAi ^{99,115-117}; sus efectos sobre el QS de cepas patógenas ^{100,111} y la modificación funcional de las CS NPs (aptámeros, ligandos, péptidos o proteínas) ¹¹⁸⁻¹²⁰, para dirigirlas a dianas específicas. En conjunto, pensamos que estas perspectivas de futuro contribuirán al desarrollo de estrategias de control antimicrobiano en un contexto de emergencia ante la expansión de resistencias.

8.7. REFERENCIAS:

- (1) Niu, C.; Afre, S.; Gilbert, E. S. Subinhibitory Concentrations of Cinnamaldehyde Interfere with Quorum Sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* **2006**, *43* (5), 489–494.
- (2) Pattnaik, S.; Barik, S.; Macha, C.; Chiranjeevi, P. V.; Siddhardha, B. Anti Quorum Sensing and Anti Biofilm Efficacy of Cinnamaldehyde Encapsulated Chitosan Nanoparticles against *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *LWT* **2018**, *97*, 752–759.
- (3) Kempner, E. S.; Hanson, F. E. Aspects of Light Production by *Photobacterium Fischeri*. *J. Bacteriol.* **1968**, *95* (3), 975–979.
- (4) Neelson, K. H.; Platt, T.; Hastings, J. W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **1970**, *104* (1), 313–322.
- (5) Neelson, K. H.; Eberhard, A.; Hastings, J. W. Catabolite Repression of Bacterial Bioluminescence: Functional Implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1972**, *69* (5), 1073–1076.
- (6) Engbrecht, J.; Neelson, K.; Silverman, M. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio Fischeri*. *Cell* **1983**, *32*, 773–781.
- (7) Engbrecht, J.; Silverman, M. Identification of Genes and Gene Products Necessary for Bacterial Bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, *81* (13), 4154–4158.
- (8) Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (2), 269–275.
- (9) Hastings, J. W.; Greenberg, E. P. Quorum Sensing: The Explanation of a Curious Phenomenon Reveals a Common Characteristic of Bacteria. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (9), 2667–2668.
- (10) Winson, M. K.; Swift, S.; Hill, P. J.; Sims, C. M.; Griesmayr, G.; Bycroft, B. W.; Williams, P.; Stewart, G. S. A. B. Engineering the LuxCDABE Genes from *Photobacterium Luminescens* to Provide a Bioluminescent Reporter for Constitutive and Promoter Probe Plasmids and Mini-Tn5 Constructs. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *163* (2), 193–202.
- (11) Kaplan, H. B.; Greenberg, E. P. Diffusion of Autoinducer Is Involved in Regulation of the *Vibrio Fischeri* Luminescence System. *J. Bacteriol.* **1985**, *163* (3), 1210–1214.
- (12) Andersen, J. B.; Heydorn, A.; Hentzer, M.; Eberl, L.; Geisenberger, O.; Christensen, B. B.; Molin, S.; Givskov, M. Gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (2), 575–585.
- (13) Müller, J.; Kuttler, C.; Hense, B. A. Sensitivity of the Quorum Sensing System Is Achieved by Low Pass Filtering. *BioSystems* **2008**, *92* (1), 76–81.
- (14) Weber, M.; Buceta, J. Stochastic Stabilization of Phenotypic States: The Genetic Bistable Switch as a Case Study. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 73487.
- (15) Williams, J. W.; Cui, X.; Levchenko, A.; Stevens, A. M. Robust and Sensitive Control of a Quorum-Sensing Circuit by Two Interlocked Feedback Loops. *Molec Syst Biol* **2008**, *4*, 234.
- (16) Canton, B.; Labno, A.; Endy, D. Refinement and Standardization of Synthetic Biological Parts and Devices. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (7), 787–793.
- (17) Güémez, J.; Velasco, S. A Probabilistic Approach to the Site-Percolation Problem. I. Bethe Lattices. *Phys. A Stat. Mech. its Appl.* **1991**, *171* (3), 486–503.
- (18) Vila-Sanjurjo, C.; Engwer, C.; Qin, X.; Hembach, L.; Verdía-Cotelo, T.; Remuñán-

- López, C.; Vila-Sanjurjo, A.; Goycoolea, F. M. A Single Intracellular Protein Governs the Critical Transition from an Individual to a Coordinated Population Response during Quorum Sensing: Origins of Primordial Language. *bioRxiv* **2016**.
- (19) La Porta, C. A. M.; Zapperi, S. Phase Transitions in Cell Migration. *Nature Reviews Physics*. 2020, pp 516–517.
- (20) Weber, M.; Buceta, J. The Cellular Ising Model: A Framework for Phase Transitions in Multicellular Environments. *J. R. Soc. Interface* **2016**, *13* (119).
- (21) Kindler, O.; Pulkkinen, O.; Cherstvy, A. G.; Metzler, R. Burst Statistics in an Early Biofilm Quorum Sensing Model: The Role of Spatial Colony-Growth Heterogeneity. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1).
- (22) Ferkinghoff-Borg, J.; Sams, T. Size of Quorum Sensing Communities. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10* (1), 103–109.
- (23) Yusufaly, T. I.; Boedicker, J. Q. Spatial Dispersal of Bacterial Colonies Induces a Dynamical Transition from Local to Global Quorum Sensing. *Phys. Rev. E* **2016**, *94* (6).
- (24) Stauffer, D. Scaling Theory of Percolation Clusters. *Physics Reports*. 1979, pp 1–74.
- (25) Dalgleish, D. G. Coagulation of Renneted Bovine Casein Micelles: Dependence on Temperature, Calcium Ion Concentration and Ionic Strength. *J. Dairy Res.* **1983**, *50* (03), 331–340.
- (26) Tokita, M. Gelation Mechanism and Percolation. *Food Hydrocoll.* **1989**, *3* (4), 263–274.
- (27) Lu, Y.; McMahon, D. J.; Vollmer, A. H. Investigating Rennet Coagulation Properties of Recombined Highly Concentrated Micellar Casein Concentrate and Cream for Use in Cheese Making. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100* (2), 892–900.
- (28) Niven, J. E. How Honeybees Break a Decision-Making Deadlock. *Science*. 2012, pp 43–44.
- (29) Seeley, T. D.; Visscher, P. K.; Passino, K. M. Group Decision Making in Honey Bee Swarms: When 10,000 Bees Go House Hunting, How Do They Cooperatively Choose Their New Nesting Site? *American Scientist*. 2006, pp 220–229.
- (30) Pérez, P. D.; Hagen, S. J. Heterogeneous Response to a Quorum-Sensing Signal in the Luminescence of Individual *Vibrio Fischeri*. *PLoS One* **2010**, *5* (11), e15473.
- (31) Weber, M.; Buceta, J. Dynamics of the Quorum Sensing Switch: Stochastic and Non-Stationary Effects. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7* (1), 6.
- (32) Kurz, V.; Nelson, E. M.; Perry, N.; Timp, W.; Timp, G. Epigenetic Memory Emerging from Integrated Transcription Bursts. *Biophys. J.* **2013**, *105* (6), 1526–1532.
- (33) Williams, J. W.; Cui, X.; Levchenko, A.; Stevens, A. M. Robust and Sensitive Control of a Quorum-Sensing Circuit by Two Interlocked Feedback Loops. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 234.
- (34) Le Conte, Y.; Huang, Z.; Robinson, G. E. “Quorum Sensing” in Honeybees: Pheromone Regulation of Division of Labor. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; Washington DC: ASM Press, 2008; pp 463–468.
- (35) Richardson, T. O.; Christensen, K.; Franks, N. R.; Jensen, H. J.; Sendova-Franks, A. B. Ants in a Labyrinth: A Statistical Mechanics Approach to the Division of Labour. *PLoS One* **2011**, *6* (4), e18416.
- (36) Cohen, O.; Keselman, A.; Moses, E.; Martinez, M. R.; Soriano, J.; Tlusty, T. Quorum Percolation in Living Neural Networks. *Epl* **2010**, *89* (1), 18008.
- (37) Sauerwald, T.; Hennemann, J.; Kohl, C.-D.; Wagner, T.; Russ, S. H2S Detection Utilizing Percolation Effects in Copper Oxide. In *Proc Sens 2013*; 2013; pp 656–660.

- (38) Kurselis, K.; Kiyam, R.; Bagratashvili, V. N.; Popov, V. K.; Chichkov, B. N. 3D Fabrication of All-Polymer Conductive Microstructures by Two Photon Polymerization. *Opt. Express* **2013**, *21* (25), 31029–31035.
- (39) Cheng, H. J.; Ee, R.; Cheong, Y. M.; Tan, W.-S.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Detection of Quorum Sensing Activity in the Multidrug-Resistant Clinical Isolate *Pseudomonas Aeruginosa* Strain GB11. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14* (7), 12511–12522.
- (40) Li, G. W.; Xie, X. S. Central Dogma at the Single-Molecule Level in Living Cells. *Nature* **2011**, *475* (7356), 308–315.
- (41) Perez, P.; Weiss, J.; Hagen, S. Noise and Crosstalk in Two Quorum-Sensing Inputs of *Vibrio Fischeri*. *BMC Syst. Biol.* **2011**, *5* (1), 153.
- (42) Pérez, P. D.; Weiss, J. T.; Hagen, S. J. Noise and Crosstalk in Two Quorum-Sensing Inputs of *Vibrio Fischeri*. *Bmc Syst. Biol.* **2011**, *5*, 153.
- (43) Williams, J. W.; Cui, X.; Levchenko, A.; Stevens, A. M. Robust and Sensitive Control of a Quorum-Sensing Circuit by Two Interlocked Feedback Loops. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*, 234.
- (44) Haseltine, E. L.; Arnold, F. H. Implications of Rewiring Bacterial Quorum Sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74* (2), 437–445.
- (45) Qin, X.; Kräfft, T.; Goycoolea, F. M. Chitosan Encapsulation Modulates the Effect of Trans-Cinnamaldehyde on AHL-Regulated Quorum Sensing Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *169*, 453–461.
- (46) Li, T.; Wang, D.; Liu, N.; Ma, Y.; Ding, T.; Mei, Y.; Li, J. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas Fluorescens* by Cinnamaldehyde. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *269*, 98–106.
- (47) Ayrapetyan, M.; Williams, T. C.; Oliver, J. D. Interspecific Quorum Sensing Mediates the Resuscitation of Viable but Nonculturable *Vibrios*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (8), 2478–2483.
- (48) Brackman, G.; Defoirdt, T.; Miyamoto, C.; Bossier, P.; Van Calenbergh, S.; Nelis, H.; Coenye, T. Cinnamaldehyde and Cinnamaldehyde Derivatives Reduce Virulence in *Vibrio* Spp. by Decreasing the DNA-Binding Activity of the Quorum Sensing Response Regulator LuxR. *BMC Microbiol.* **2008**, *8* (149).
- (49) Calvo, P.; Remunan-Lopez, C.; Vila-Jato, J. ; Alonso, M. J. Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *63*, 125–132.
- (50) Huang, Y.; Lapitsky, Y. Salt-Assisted Mechanistic Analysis of Chitosan/Tripolyphosphate Micro- and Nanogel Formation. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (11), 3868–3876.
- (51) Chen, H.; Wei, O.; Martoni, C.; Prakash, S. Genipin Cross-Linked Polymeric Alginate-Chitosan Microcapsules for Oral Delivery: In-Vitro Analysis. *Int. J. Polym. Sci.* **2009**, *Volume 200*, Article ID 617184.
- (52) Harris, R.; Lecumberri, E.; Heras, A. Chitosan-Genipin Microspheres for the Controlled Release of Drugs: Clarithromycin, Tramadol and Heparin. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (6), 1750–1762.
- (53) Lin, Y.-H.; Tsai, S.-C.; Lai, C.-H.; Lee, C.-H.; He, Z. S.; Tseng, G.-C. Genipin-Cross-Linked Fucose-Chitosan/Heparin Nanoparticles for the Eradication of *Helicobacter Pylori*. *Biomaterials* **2013**, *34* (18), 4466–4479.
- (54) Yuan, Y.; Chesnutt, B. M.; Utturkar, G.; Haggard, W. O.; Yang, Y.; Ong, J. L.; Bumgardner, J. D. The Effect of Cross-Linking of Chitosan Microspheres with Genipin on Protein Release. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *68* (3), 561–567.
- (55) Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M.

- H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F. Chitosan Crosslinked with Genipin as Support Matrix for Application in Food Process: Support Characterization and β -d-Galactosidase Immobilization. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 184–190.
- (56) Song, X.; Wu, H.; Li, S.; Wang, Y.; Ma, X.; Tan, M. Ultrasmall Chitosan–Genipin Nanocarriers Fabricated from Reverse Microemulsion Process for Tumor Photothermal Therapy in Mice. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2080–2090.
- (57) Espinosa-García, B. M.; Argüelles-Monal, W. M.; Hernández, J.; Félix-Valenzuela, L.; Acosta, N.; Goycoolea, F. M. Molecularly Imprinted Chitosan-Genipin Hydrogels with Recognition Capacity toward o-Xylene. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3355–3364.
- (58) Artech Pujana, M.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros Iturbe, L. C.; Katime, I. Biodegradable Chitosan Nanogels Crosslinked with Genipin. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (2), 836–842.
- (59) Kumar, G. V.; Su, C.-H.; Velusamy, P. Ciprofloxacin Loaded Genipin Cross-Linked Chitosan/Heparin Nanoparticles for Drug Delivery Application. *Mater. Lett.* **2016**, *180*, 119–122.
- (60) Razi, M. A.; Wakabayashi, R.; Tahara, Y.; Goto, M.; Kamiya, N. Genipin-Stabilized Caseinate-Chitosan Nanoparticles for Enhanced Stability and Anti-Cancer Activity of Curcumin. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *164*, 308–315.
- (61) Carvalho, E. L. S.; Grenha, A.; Remuñán-López, C.; Alonso, M. J.; Seijo, B. Mucosal Delivery of Liposome–Chitosan Nanoparticle Complexes. *Methods Enzymol.* **2009**, *465*, 289–312.
- (62) Masarudin, M. J.; Cutts, S. M.; Evison, B. J.; Phillips, D. R.; Pigram, P. J. Factors Determining the Stability, Size Distribution, and Cellular Accumulation of Small, Monodisperse Chitosan Nanoparticles as Candidate Vectors for Anticancer Drug Delivery: Application to the Passive Encapsulation of [14C]-Doxorubicin. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2015**, *8*, 67.
- (63) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*.
- (64) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*, 358–368.
- (65) Shimizu, K. Regulation Systems of Bacteria Such as Escherichia Coli in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites* **2014**, *4* (1), 1–35.
- (66) Pletnev, P.; Osterman, I.; Sergiev, P.; Bogdanov, A.; Dontsova, O. Survival Guide: Escherichia Coli in the Stationary Phase. *Acta Naturae* **2015**, *7* (4), 22–33.
- (67) Kolibachuk, D.; Greenberg, E. P. The Vibrio Fischeri Luminescence Gene Activator LuxR Is a Membrane-Associated Protein. *J. Bacteriol.* **1993**, *175* (22), 7307–7312.
- (68) Qin, Y.; Luo, Z.-Q.; Smyth, A. J.; Gao, P.; von Bodman, S. B.; Farrand, S. K. Quorum-Sensing Signal Binding Results in Dimerization of TraR and Its Release from Membranes into the Cytoplasm. *EMBO J.* **2000**, *19* (19), 5212–5221.
- (69) Kim, K.; Kim, K. P.; Choi, J.; Lim, J. A.; Lee, J.; Hwang, S.; Ryu, S. Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of Cronobacter Sakazakii. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (15), 5188–5198.
- (70) Jeon, S. J.; Oh, M.; Yeo, W.-S.; Galvão, K. N.; Jeong, K. C. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the Treatment of Infectious Diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (3), e92723.
- (71) Larsen, M. U.; Seward, M.; Tripathi, A.; Shapley, N. C. Biocompatible Nanoparticles Trigger Rapid Bacteria Clustering. In *Biotechnology Progress*; 2009; Vol. 25, pp

- 1094–1102.
- (72) Tang, J.; Wu, Y.; Esquivel-Elizondo, S.; Sørensen, S. J.; Rittmann, B. E. How Microbial Aggregates Protect against Nanoparticle Toxicity. *Trends in Biotechnology*. 2018, pp 1171–1182.
- (73) Metch, J. W.; Burrows, N. D.; Murphy, C. J.; Pruden, A.; Vikesland, P. J. Metagenomic Analysis of Microbial Communities Yields Insight into Impacts of Nanoparticle Design. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13* (3), 253–259.
- (74) Zemmouri, H.; Mameri, N.; Lounici, H. Chitosan Use in Chemical Conditioning for Dewatering Municipal-Activated Sludge. *Water Sci. Technol.* **2015**, *71* (6), 810–816.
- (75) Hayden, S. C.; Zhao, G.; Saha, K.; Phillips, R. L.; Li, X.; Miranda, O. R.; Rotello, V. M.; El-Sayed, M. A.; Schmidt-Krey, I.; Bunz, U. H. F. Aggregation and Interaction of Cationic Nanoparticles on Bacterial Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (16), 6920–6923.
- (76) Almand, E. A.; Moore, M. D.; Outlaw, J.; Jaykus, L.-A. Human Norovirus Binding to Select Bacteria Representative of the Human Gut Microbiota. *PLoS One* **2017**, *12* (3), e0173124.
- (77) Secor, P. R.; Michaels, L. A.; Ratjen, A.; Jennings, L. K.; Singh, P. K. Entropically Driven Aggregation of Bacteria by Host Polymers Promotes Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (42), 10780–10785.
- (78) Velu, R.; Calais, T.; Jayakumar, A.; Raspall, F. A Comprehensive Review on Bio-Nanomaterials for Medical Implants and Feasibility Studies on Fabrication of Such Implants by Additive Manufacturing Technique. *Mater. (Basel, Switzerland)* **2019**, *13* (1), 92.
- (79) Mei, L.; Xu, Z.; Shi, Y.; Lin, C.; Jiao, S.; Zhang, L.; Li, P. Multivalent and Synergistic Chitosan Oligosaccharide-Ag Nanocomposites for Therapy of Bacterial Infection. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 10011.
- (80) Ahmed, S.; Ikram, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achiev. Life Sci.* **2016**, *10* (1), 27–37.
- (81) Wang, T.; Zheng, Y.; Shen, Y.; Shi, Y.; Li, F.; Su, C.; Zhao, L. Chitosan Nanoparticles Loaded Hydrogels Promote Skin Wound Healing through the Modulation of Reactive Oxygen Species. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2018**, *46* (sup1), 138–149.
- (82) Matica, M. A.; Aachmann, F. L.; Tøndervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019.
- (83) Mengoni, T.; Adrian, M.; Pereira, S.; Santos-Carballal, B.; Kaiser, M.; Goycoolea, F. M. A Chitosan-Based Liposome Formulation Enhances the In Vitro Wound Healing Efficacy of Substance P Neuropeptide. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4).
- (84) Jung, S. M.; Yoon, G. H.; Lee, H. C.; Shin, H. S. Chitosan Nanoparticle/PCL Nanofiber Composite for Wound Dressing and Drug Delivery. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2015**, *26* (4), 252–263.
- (85) Elgadir, M. A.; Uddin, M. S.; Ferdosh, S.; Adam, A.; Chowdhury, A. J. K.; Sarker, M. Z. I. Impact of Chitosan Composites and Chitosan Nanoparticle Composites on Various Drug Delivery Systems: A Review. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23* (4), 619–629.
- (86) Sun, T.; Zhan, B.; Zhang, W.; Qin, D.; Xia, G.; Zhang, H.; Peng, M.; Li, S. A.; Zhang, Y.; Gao, Y.; Lee, W. H. Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles Loaded with Bioactive Peptide OH-CATH30 Benefit Nonscar Wound Healing. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 5771–5786.

- (87) Golmohammadi, R.; Najar-Peerayeh, S.; Tohidi Moghadam, T.; Hosseini, S. M. J. Synergistic Antibacterial Activity and Wound Healing Properties of Selenium-Chitosan-Mupirocin Nanohybrid System: An in Vivo Study on Rat Diabetic Staphylococcus Aureus Wound Infection Model. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–10.
- (88) Hill, M.; Twigg, M.; Sheridan, E. A.; Hardy, J. G.; Elborn, J. S.; Taggart, C. C.; Scott, C. J.; Migaud, M. E. Alginate/Chitosan Particle-Based Drug Delivery Systems for Pulmonary Applications. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (8).
- (89) Gaspar, D. P.; Gaspar, M. M.; Eleutério, C. V.; Grenha, A.; Blanco, M.; Gonçalves, L. M. D.; Taboada, P.; Almeida, A. J.; Remuñán-López, C. Microencapsulated Solid Lipid Nanoparticles as a Hybrid Platform for Pulmonary Antibiotic Delivery. *Mol. Pharm.* **2017**, *14* (9), 2977–2990.
- (90) Grenha, A.; Al-Qadi, S.; Seijo, B.; Remuñán-López, C. The Potential of Chitosan for Pulmonary Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2010, pp 33–43.
- (91) Grenha, A.; Seijo, B.; Remuñán-López, C. Microencapsulated Chitosan Nanoparticles for Lung Protein Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *25* (4–5), 427–437.
- (92) Rasul, R. M.; Tamilarasi Muniandy, M.; Zakaria, Z.; Shah, K.; Chee, C. F.; Dabbagh, A.; Rahman, N. A.; Wong, T. W. A Review on Chitosan and Its Development as Pulmonary Particulate Anti-Infective and Anti-Cancer Drug Carriers. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd 2020, p 116800.
- (93) Garg, T.; Rath, G.; Goyal, A. K. Inhalable Chitosan Nanoparticles as Antitubercular Drug Carriers for an Effective Treatment of Tuberculosis. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2016**, *44* (3), 997–1001.
- (94) Tatlow, D.; Tatlow, C.; Tatlow, S.; Tatlow, S. A Novel Concept for Treatment and Vaccination against Covid-19 with an Inhaled Chitosan-Coated DNA Vaccine Encoding a Secreted Spike Protein Portion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2020**, *47* (11), 1874–1878.
- (95) Gaspar, M. C.; Sousa, J. J. S.; Pais, A. A. C. C.; Cardoso, O.; Murtinho, D.; Serra, M. E. S.; Tewes, F.; Olivier, J. C. Optimization of Levofloxacin-Loaded Crosslinked Chitosan Microspheres for Inhaled Aerosol Therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 65–75.
- (96) Gaspar, D. P.; Vital, J.; Leiva, M. C.; Gonçalves, L. M. D.; Taboada, P.; Remuñán-López, C.; Vítor, J.; Almeida, A. J. Transfection of Pulmonary Cells by Stable PDNA-Polycationic Hybrid Nanostructured Particles. *Nanomedicine* **2019**, *14* (4), 407–429.
- (97) Fernández Fernández, E.; Santos-Carballal, B.; Weber, W. M.; Goycoolea, F. M. Chitosan as a Non-Viral Co-Transfection System in a Cystic Fibrosis Cell Line. *Int. J. Pharm.* **2016**, *502* (1–2), 1–9.
- (98) Koli, U.; Nilgiriwala, K.; Sriraman, K.; Jain, R.; Dandekar, P. Targeting Tuberculosis Infection in Macrophages Using Chitosan Oligosaccharide Nanoplexes. *J. Nanoparticle Res.* **2019**, *21* (9), 1–12.
- (99) Zhang, A.; Mu, H.; Zhang, W.; Cui, G.; Zhu, J.; Duan, J. Chitosan Coupling Makes Microbial Biofilms Susceptible to Antibiotics. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 3364.
- (100) Muslim, S. N.; Kadmy, I. M. S. A.; Ali, A. N. M.; Salman, B. K.; Ahmad, M.; Khazaal, S. S.; Hussein, N. H.; Muslim, S. N. Chitosan Extracted from Aspergillus Flavus Shows Synergistic Effect, Eases Quorum Sensing Mediated Virulence Factors and Biofilm against Nosocomial Pathogen Pseudomonas Aeruginosa. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107* (PartA), 52–58.
- (101) Pattnaik, S.; Barik, S.; Muralitharan, G.; Busi, S. Ferulic Acid Encapsulated Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Attenuate Quorum Sensing Regulated Virulence and

- Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *IET Nanobiotechnology* **2018**, 12 (8), 1056–1061.
- (102) Thanh Nguyen, H.; Goycoolea, F. Chitosan/Cyclodextrin/TPP Nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* **2017**, 22 (11), 1975.
- (103) Omwenga, E. O.; Hensel, A.; Shitandi, A.; Goycoolea, F. M. Chitosan Nanoencapsulation of Flavonoids Enhances Their Quorum Sensing and Biofilm Formation Inhibitory Activities against an E.Coli Top 10 Biosensor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, 164, 125–133.
- (104) Singh, N.; Romero, M.; Travanut, A.; Monteiro, P. F.; Jordana-Lluch, E.; Hardie, K. R.; Williams, P.; Alexander, M. R.; Alexander, C. Dual Bioresponsive Antibiotic and Quorum Sensing Inhibitor Combination Nanoparticles for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in Vitro and Ex Vivo. *Biomater. Sci.* **2019**, 7 (10), 4099–4111.
- (105) Devescovi, G.; Kojic, M.; Covaceuszach, S.; Cámara, M.; Williams, P.; Bertani, I.; Subramoni, S.; Venturi, V. Negative Regulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium Violaceum*. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 349.
- (106) Lozano, G. L.; Guan, C.; Cao, Y.; Handelsman, J.; Borlee, B. R.; Broderick, N. A.; Stabb, E. V. A Chemical Counterpunch: *Chromobacterium Violaceum* ATCC 31532 Produces Violacein in Response to Translation-Inhibiting Antibiotics. *MBio* **2020**, 11 (3), e00948-20.
- (107) Ciprandi, A.; Da Silva, W. M.; Santos, A. V.; De Castro Pimenta, A. M.; Carepo, M. S. P.; Schneider, M. P. C.; Azevedo, V.; Silva, A. *Chromobacterium Violaceum*: Important Insights for Virulence and Biotechnological Potential by Exoproteomic Studies. *Curr. Microbiol.* **2013**, 67 (1), 100–106.
- (108) Chen, Y.; Ho, J. M. L.; Shis, D. L.; Gupta, C.; Long, J.; Wagner, D. S.; Ott, W.; Josić, K.; Bennett, M. R. Tuning the Dynamic Range of Bacterial Promoters Regulated by Ligand-Inducible Transcription Factors. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1), 1–8.
- (109) Helander, I. ; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Ahvenainen, R.; Rhoades, J.; Roller, S. Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, 71 (2–3), 235–244.
- (110) Lee, J. H.; Rhee, J. E.; Park, U.; Ju, H. M.; Lee, B. C.; Kim, T. S.; Jeong, H. S.; Choi, S. H. Identification and Functional Analysis of *Vibrio Vulnificus* SmcR, a Novel Global Regulator. *J Microbiol Biotechnol* **2007**, 17.
- (111) Gomes, L. P.; Anjo, S. I.; Manadas, B.; Coelho, A. V.; Paschoalin, V. M. F. Proteomic Analyses Reveal New Insights on the Antimicrobial Mechanisms of Chitosan Biopolymers and Their Nanosized Particles against *Escherichia Coli*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 21 (1), 225.
- (112) Attjioui, M.; Gillet, D.; El Gueddari, N. E.; Moerschbacher, B. M. Synergistic Antimicrobial Effect of Chitosan Polymers and Oligomers. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2021**, MPMI-07-20-0185-R.
- (113) Ho, S. H.; Tirrell, D. A. Enzymatic Labeling of Bacterial Proteins for Super-Resolution Imaging in Live Cells. *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5 (12), 1911–1919.
- (114) Mengoni, T.; Adrian, M.; Pereira, S.; Santos-Carballal, B.; Kaiser, M.; Goycoolea, F. M. A Chitosan-Based Liposome Formulation Enhances the in Vitro Wound Healing Efficacy of Substance P Neuropeptide. *Pharmaceutics* **2017**, 9 (4).
- (115) SL, S. Small RNA-Based Regulation of Bacterial Quorum Sensing and Biofilm Formation. In *Regulating with RNA in Bacteria and Archaea*; 2018; Vol. 6, pp 283–304.
- (116) Bernheim, A. G.; Libis, V. K.; Lindner, A. B.; Wintermute, E. H. Phage-Mediated

- Delivery of Targeted SRNA Constructs to Knock down Gene Expression in E. Coli. *J. Vis. Exp.* **2016**, 2016 (109).
- (117) Høyland-Kroghsbo, N. M.; Mærkedahl, R. B.; Svenningsen, S. Lo. A Quorum-Sensing-Induced Bacteriophage Defense Mechanism. *MBio* **2013**, 4 (1).
- (118) Zhao, X.; Lu, C.; Yang, S.; Zhang, J. Bioconjugation of Aptamer to Fluorescent Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Bacterial Detection. *Mater. Lett.* **2020**, 264, 127330.
- (119) Fuenzalida, J. P.; Weikert, T.; Hoffmann, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Moerschbacher, B. M.; Goycoolea, F. M.; Kolkenbrock, S. Affinity Protein-Based FRET Tools for Cellular Tracking of Chitosan Nanoparticles and Determination of the Polymer Degree of Acetylation. *Biomacromolecules* **2014**, 15 (7).
- (120) Lei, J.; Sun, L. C.; Huang, S.; Zhu, C.; Li, P.; He, J.; Mackey, V.; Coy, D. H.; He, Q. Y. The Antimicrobial Peptides and Their Potential Clinical Applications. *American Journal of Translational Research*. 2019, pp 3919–3931.





9. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



CONCLUSIONES

Las evidencias recogidas a lo largo de la tesis, en relación con nuestros dos objetivos principales (**Objetivos I y II**), nos llevaron a las siguientes conclusiones.

Objetivo I: *Puesta a punto del funcionamiento del biosensor. Esto conllevó el análisis y comprensión de las posibles interferencias sobre su mecanismo de quorum sensing (QS) a partir de ensayos en cultivos in vivo y de simulaciones in silico en los que se modelaron diferentes escenarios de inhibición del QS.*

Conclusiones:

Con relación al funcionamiento del biosensor *E. coli*:

1. La respuesta del biosensor a la inducción exógena con acil-homoserín lactona (AHL) seguía una cinética de tipo percolativo. Concretamente, hemos mostrado que la porción inicial de la curva de fluorescencia normalizada por la densidad (FI/OD₆₀₀) del biosensor en respuesta a la inducción con AHL, se ajustaba a una función de percolación.
2. Los valores calculados para el tiempo crítico de percolación, t_c , mostraron que el sistema percola inmediatamente, o tras un corto lapso corto de tiempo, tras la inducción con AHL. Además, los valores estimados del exponente β se situaban en un rango estrecho y próximo al valor universal 0.83, correspondiente a un sistema de percolación de cinco dimensiones.
3. Las simulaciones *in silico* basadas en agentes nos permitieron elucidar una serie de claves importantes para comprender y racionalizar la respuesta de QS del biosensor como un fenómeno de percolación. En concreto, nuestro modelo *in silico* predijo que

- la formación de dímeros activos de LuxR en el biosensor tenía lugar en forma de estallidos de tipo percolativo.
4. La hipótesis de la “trampa de AHL” nos sirvió para racionalizar el establecimiento de una red de moléculas activadas de LuxR en la cual la AHL actuaba como el “agente capacitador de la percolación”.
 5. El modelo *in silico* fue asimismo capaz de recrear la acumulación lineal de AHL en el interior de las células, en concordancia con hipótesis de la “trampa de AHL”. Este comportamiento lineal aportó, por tanto, una base sólida a nuestra asunción matemática de la existencia de una relación lineal entre el tiempo (t) y la acumulación del “agente capacitador de la percolación” (p).
 6. La respuesta de tipo percolativo del biosensor era el resultado de la activación, prácticamente sincronizada, de la totalidad de las células de la población. La rápida orquestación celular sería consecuencia de los elevados niveles de expresión de *luxR* existentes en las células, a partir de un plásmido con alto número de copias, previamente a la inducción con AHL.
 7. Nuestras simulaciones preliminares de un modelo de copia única del gen *luxR*, así como el análisis de datos publicados a partir de cepas bacterias con una o bajo número de copias del mismo, nos han llevado a proponer la hipótesis de que los niveles de LuxR podrían ser determinantes tanto del tiempo necesario para el establecimiento de la respuesta de QS, como del tipo de respuesta de la misma (estocástica o determinista) a nivel de las células individuales.

Con relación al uso del biosensor para medir actividad QQ:

8. Utilizamos *trans*-cinamaldehído (CA), un compuesto con actividad QQ reconocida, para medir sus efectos sobre la respuesta de QS del biosensor. Reunimos evidencias, tanto experimentales como *in silico*, de que el CA retrasaba el inicio de la respuesta de QS del biosensor.
9. Nuestras simulaciones basadas en agentes nos permitieron proponer un novedoso mecanismo teórico de acción del CA, por el cual el

incremento en el valor de t_c sería el resultado del secuestro transitorio de AHL en complejos inactivos con LuxR y CA unido covalentemente a éstos. Los esfuerzos futuros encaminados a testar este modelo hipotético podrían confirmar este novedoso modo de inhibición, que podría ser explotado para el diseño de estrategias de control microbiano de nueva generación.

El conocimiento generado durante la caracterización del biosensor y los experimentos de QQ descritos anteriormente, nos hizo confiar en la solidez de nuestro diseño experimental para testar la bioactividad de las nanopartículas de quitosano (CS NPs) en un modelo de QS con potencial traslación a futuras aplicaciones para el control de la virulencia de bacterias patógenas.

Objetivo II: *Evaluar la bioactividad de las CS NPs sobre el crecimiento y la respuesta de QS del biosensor.*

Conclusiones:

Hemos desarrollado CS NPs a base de hidrocloreto de quitosano (grado de acetilación ~14%, Mw ~92 kDa, PD ~2.5) de alta pureza con características biofísicas definidas para aplicaciones antimicrobianas y/o de QQ.

En una primera estrategia, comparamos las propiedades fisicoquímicas y la bioactividad de dos tipos relacionados de CS NPs, concretamente, NPs de CS entrecruzadas iónicamente con TPP (IC-NPs, del inglés *ionically crosslinked nanoparticles*) y NPs de CS entrecruzadas iónica y covalentemente con TPP+genipina (GNP), denominadas CC-NPs (del inglés, *co-crosslinked nanoparticles*). Observamos que, a pesar de las similitudes en su composición, estos dos sistemas mostraron comportamientos coloidales y biológicos muy diferentes:

10. Las CC-NPs mostraron una notable mayor estabilidad coloidal que las IC-NPs durante el proceso de centrifugación y resuspensión y durante la incubación en medio de cultivo microbiológico. En estas

condiciones, las CC-NPs mantuvieron un diámetro medio en el rango de ~200 nm. Por el contrario, las IC-NPs se agregaron y mostraron inestabilidad en estas condiciones.

11. En relación a su bioactividad, las CC-NPs mostraron una toxicidad significativamente inferior, en torno al ~50% , a la de las IC-NPs. Por otro lado, la actividad QQ de las CC-NPs fue muy inferior a la de las IC-NPs, las cuales ejercían un potente efecto QQ en el biosensor, independientemente de la dosis aplicada.

Por medio de análisis de sincrotrón SAXS de alto brillo, hemos sido capaces de elucidar diferencias ultraestructurales importantes entre las IC-NPs y las CC-NPs. En concreto, la estabilización a largo plazo de una estructura pre-existente, pero muy lábil, de tipo núcleo-corteza, por medio del entrecruzamiento covalente con GNP en las CC-NPs.

12. La estabilidad coloidal mejorada y las diferentes propiedades biológicas entre las IC-NPs y las CC-NPs, podrían ser resultado de la presencia de la estructura núcleo-corteza. En este sentido, nuestro trabajo ha puesto de manifiesto la influencia de la ultraestructura de las CS NPs en sus propiedades coloidales y biológicas.
13. Este trabajo ha reflejado, además, que las IC-NPs mantenían la actividad QQ del CS polimérico, a pesar de su mayor tamaño en relación con el CS molecular en disolución. Teniendo esto en consideración, las IC-NPs podrían servir como chasis para el desarrollo de nanosistemas a base de CS para aplicaciones en QQ. Por su parte, las características fisicoquímicas superiores de las CC-NPs, junto con su mayor estabilidad en condiciones biológicas y su menor toxicidad, las hacen en principio más adecuadas para el diseño de nanovehículos de liberación de fármacos dirigidos a aplicaciones microbiológicas distintas a la interferencia con el QS.

Como estrategia para mejorar las propiedades coloidales de las IC-NPs, manteniendo su actividad QQ, desarrollamos un método alternativo para modificar covalentemente CS NPs con GNP. Este mecanismo novedoso de fabricación se basó en el pre-entrecruzamiento covalente

del CS con GNP en condiciones próximas al punto crítico de gelificación. Al pre-entrecruzamiento le siguió la formación de NPs (PC-NPs; del inglés, *pre-crosslinked nanoparticles*), por el procedimiento de gelificación iónica en presencia de TPP.

14. Este nuevo procedimiento representó una estrategia mejorada sobre los métodos descritos anteriormente para manipular el CS en forma de NPs de pequeño tamaño, así como para combinar la estabilidad coloidal de las NPs co-entrecruzadas con GNP con la capacidad QQ de las IC-NPs.

La inhibición aparente ejercida por las PC-NPs sobre el crecimiento de cultivos del biosensor era compatible con la existencia de una relación estequiométrica NP/bacteria, la cual se produciría de manera natural durante el crecimiento, en consonancia con trabajos previos de nuestro grupo llevados a cabo en nanocápsulas recubiertas con quitosano. Profundizamos sobre este efecto para encontrar que:

15. La relación estequiométrica se establecía sistemáticamente en un momento concreto durante el crecimiento bacteriano, el cual dependía de la concentración inicial de PC-NPs.
16. El hecho de que el establecimiento de la relación estequiométrica mostrase una clara co-dependencia de la dosis de PC-NPs y la densidad bacteriana, así como que el tiempo para dicho establecimiento pueda ser controlado, implica que las PC-NPs podrían ser ideales para aplicaciones de control microbiano dirigidas a densidades celulares específicas.
17. En el contexto actual de expansión de resistencias a antibióticos y en la búsqueda de nuevas estrategias de interferencia con el QS de bacterias patógenas, consideradas entre las opciones más prometedoras para interferir en forma selectiva con la virulencia, creemos que la capacidad QQ de las NPs basadas en CS merece especial atención.
18. El trabajo presentado en esta tesis expande además el horizonte para el diseño de nanovehículos basados en CS con capacidad para

incorporar, liberar y dirigir moléculas bioactivas en aplicaciones de control de la virulencia y crecimiento de patógenos bacterianos.





CONCLUSIONS

The evidences gathered along the thesis in relation with our two main objectives (**Objectives I and II**) led us to the following conclusions.

Objective I: *To test and prepare the experimental conditions necessary to understand possible perturbations on the LuxR-regulated fluorescence response of the Escherichia coli biosensor both in vivo and in silico. This objective included modelling different quorum quenching (QQ) scenarios to be compared to CS-NP-induced QQ.*

Conclusions:

On the functioning of the *E. coli* biosensor:

1. The response of the biosensor to external AHL was governed by percolation kinetics. Specifically, we have shown that the initial part of the FI/OD₆₀₀ response curve displayed by an acyl-homoserine lactone (AHL)-sensing biosensor after induction with AHL can be approximated by the percolation scaling law function.
2. The critical threshold percolation time, t_c , values showed that the system percolated immediately or very shortly after AHL induction and the value of the β exponent assumed values that lied closely to a conserved universal value of 0.83, corresponding with a five-dimensional percolating system.
3. *In silico* agent-based modeling led us to discover important clues to glean understanding and rationalize the biosensor's quorum sensing (QS) response as a percolation phenomenon. Specifically, our model predicted that LuxR dimer formation in the biosensor occurred in percolation-like bursts.

4. The “AHL trap” hypothesis helped us to rationalize the establishment of a network of activated LuxR molecules in which AHL acted as the “percolation enabling agent”.
5. The *in silico* model was also able to recreate the linear accumulation of AHL inside the cells, in agreement with the “AHL trap” hypothesis. This behavior therefore provided a strong support to our mathematical assumption of a linear relationship between time (t) and the accumulation of the “percolation-enabling agent” (p).
6. The percolation-like response was the result of the almost synchronous activation of the whole cell population. The rapid orchestration was likely the consequence of the high levels of LuxR expression present in the cells ahead of their activation with AHL.
7. Our preliminary simulations of the QS response of a biosensor carrying a single copy of the *luxR* gene, together with the analysis of published data from bacterial strains carrying single-copy or low copy numbers of *luxR*, led us to hypothesize that LuxR levels could determine both the time required for the establishment of the QS response, and the type of response thereof (stochastic or deterministic) in individual cells. Future research with strains carrying stochastic *luxR* expression systems will allow us to test this hypothesis. We believe that such realization could represent a new way of understanding QS, with respect to the prevailing view of the mechanism relying mostly on the levels of autoinducer.

On the use of the biosensor to measure QQ:

8. We used the known QS inhibitor *trans*-cinnamaldehyde (CA) to measure QQ and gathered experimental and *in silico* evidence that *trans*-cinnamaldehyde (CA) delayed the onset of the biosensor’s QS response.
9. Our agent-based simulations enabled us to draw a novel mode of action of CA, by which the increase of t_c was a result of transient sequestration of AHL into inactive complexes with LuxR and covalently-bound CA. Future testing of this hypothetical model

could confirm it as a novel mode of inhibition that could be used for the design of new-generation antimicrobial strategies.

The success of biosensor characterization and of the above QQ experiments, made us confident in the robustness of our experimental design to test the bioactivity of the CS NPs in a microbiologically relevant model system.

Objective II: *To test the bioactivity of chitosan nanoparticles (CS NPs) on the growth and QS response of the biosensor.*

Conclusions:

We have developed CS NPs using a biomedical grade ultrapure fully characterised chitosan hydrochloride salt (DA ~14%, Mw ~92 kDa, PD ~2.5) with defined biophysical characteristics intended for antimicrobial and/or QQ purposes.

In our first attempt, we compared the physicochemical properties and the biological performance of two related types of CS nanosystems, namely ionically (TPP) crosslinked (IC-NPs) and dually (TPP+genipin; GNP) co-crosslinked (CC-NPs). We observed that, despite the similarities in their composition, both systems had widely different behaviour:

10. CC-NPs showed a remarkable enhanced colloidal stability during the process of centrifugation and resuspension and upon incubation in microbiological medium, maintaining their average diameter in the range of ~200 nm. In contrast, IC-NPs aggregated and were highly unstable in these conditions.
11. Regarding their biological performance, CC-NPs displayed half of the toxicity of IC-NPs. On the other hand, the QQ activity of CC-NPs was much lower than that of IC-NPs which had strong QQ activity independently of the dose.

By means of high-brilliance synchrotron SAXS analysis, we were able to elucidate important ultrastructural differences between IC-NPs and

CC-NPs, namely the long-term stabilization of a pre-existing, but labile core-shell structure upon crosslinking with GNP in CC-NPs.

12. The improved colloidal stability and the different biological properties of the IC-NPs and CC-NPs appeared to arise from the presence of such a core-shell structure. Thus, our work underscored the influence of the NP's ultrastructure on the colloidal and biological properties of the final product.
13. This work indicated that the IC-NPs, satisfactorily maintained the QQ activity of free CS in solution, despite their large size (in comparison to CS). Thus, IC-NPs could serve as the chassis for microbiologically relevant CS-NPs capable to interfere with QS. In contrast, the superior physico-chemical features of CC-NPs, together with their higher stability under biological conditions and lower toxicity make these NPs better suited for microbiological work than IC-NPs. For example, CC-NPs constitute a promising chassis for the design of smart drug delivery nanocarriers under conditions in which QQ is not desired.

Following up on these results, we developed an alternative method to covalently modify CS NPs with GNP, as a strategy to improve the colloidal properties of IC-NPs, while maintaining their QQ activity. The novel fabrication method involved covalent crosslinking of CS with GNP close to the critical gelling condition, followed by the formation of CS NPs by ionic gelation with TPP. The resulting NPs were named pre-crosslinked NPs (PC-NPs).

14. This new approach represented an improved strategy over the previously reported methods to manipulate CS into small NPs, by combining the colloidal stability of GNP-co-crosslinked NPs with the QS inhibition activity of IC-NPs.

The apparent growth inhibition of PC-NPs on biosensor cultures was consistent with the existence of a stoichiometric ratio (SR) of NP/bacterium during cell growth, on keeping with previous studies by

our research group conducted on chitosan-coated nanocapsules. We dwelled on this effect to find out that:

15. The SR was clearly established at a certain point during bacterial growth, whose timing depended on the initial PC-NP concentration.
16. The fact that the establishment of this SR displayed clear dose dependence on bacterial density and that its timing could be controlled, implies that these NPs could be ideal for applications in which the targeting of bacterial populations at specific cell densities is desired.
17. We believe that the QQ capacity of CS-based NPs deserves further attention as part of the search for novel anti-QS strategies that can be used to counteract the virulence of bacterial pathogens in the context of the spread of antimicrobial resistance.
18. The work presented in the thesis also expands the available strategies for the design of nanomaterials with the capacity to carry and deliver locally bioactive molecules against pathogenic bacteria virulence.



10. ANEXO 1
(Anexo a la Introducción)



El QS mediado por AHLs juega un papel importante en numerosas interacciones hospedador-huésped en bacterias Gram negativas, tanto de tipo simbiótico como patogénico. En el caso de la simbiosis, destacan los fenotipos de bioluminiscencia y nodulación radicular en interacciones con animales y plantas, respectivamente. En cuanto a la patogénesis, numerosos patógenos, tanto de plantas como de animales, emplean sistemas de QS para regular procesos implicados en la virulencia, mediante el ataque coordinado del hospedador. Además, el QS está implicado en procesos como la biosíntesis de antibióticos, la motilidad de tipo nado y de tipo “*swarming*”, la producción de biopelículas o la transferencia conjugativa de plásmidos ^{1,2}. Los genes y fenotipos regulados por QS son enormemente diversos, incluso entre taxones altamente emparentados. En líneas generales se pueden clasificar en cuatro categorías principales: 1) procesos relacionados con el metabolismo (*e. g.*, producción de exoenzimas y sideróforos, resistencia a estrés o condiciones tróficas limitantes); 2) organización celular (*e. g.*, esporulación, producción de biopelículas, adhesión y dispersión, motilidad); 3) transferencia horizontal de genes (conjugación de plásmidos, competencia); y 4) interacciones con el hospedador u otros microorganismos (*e. g.*, producción de factores de virulencia y exopolisacárido, bioluminiscencia, factores necesarios para la colonización y la simbiosis) ³. La siguiente tabla recoge un listado de sistemas de regulación mediados por AHLs en diversas cepas de bacterias proteobacterias y permite hacerse una idea de la enorme heterogeneidad en cuanto a las sintasas y reguladores involucrados y a los fenotipos que estos sistemas controlan incluso entre taxones incluso altamente emparentados. La información recogida en la tabla ha sido utilizada para elaborar los diagramas de la **Lámina 4 de la Introducción**.

Tabla 1. Sistemas de regulación de *quorum sensing* mediados por AHLs a lo largo de la filogenia de las proteobacterias

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	α -Proteobacteria; Rhizobiales.	3-oxo-C8-HSL	Tral/TraR	Transferencia conjugativa de plásmidos inductores de tumores (Ti). Regulación del número de copias de plásmidos de virulencia	Fitopatógeno. Crecimiento de tumores de tipo agalla en plantas hospedadoras	2,4-7
<i>Agrobacterium vitis</i> cepa F2/5	Grupo <i>Rhizobium</i> / <i>Agrobacterium</i>	posiblemente: C16:1-HSL o 3-oxo- C16:1HSL, C12-HSL, 3-oxo-C8-HSL	AvsI/AvsR (homólogo de SinI/SinR de <i>S. meliloti</i> Rm1021) AviR; AvhR (LuxR huérfanos)	Transferencia de ADN-T (ADN de transferencia) desde plásmidos Ti a la planta hospedadora	Fitopatógeno. Crecimiento de tumores de tipo agalla y necrosis en plantas de la vid. Respuesta hipersensible en plantas de tabaco	5,6,8-10

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Rhizobium rhizogenes</i> ⁱ	α-Proteobacteria; Rhizobiales.	–	Tral/TraR	Virulencia e interacción planta-patógeno. Transferencia de ADN-T desde plásmidos inductores de crecimiento de pelos radiculares (Ri)	Fitopatógeno. Crecimiento de pelos y tumores radiculares en plantas	4,11-15
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Grupo <i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	3-OH-7-cis-C14-HSL,	CinI/CinS/ CinR/BisR (LuxR huérfanos)	Nodulación en la rizosfera. Simbiosis. Transferencia de plásmidos. Producción de bacteriocina. Supervivencia en fase estacionaria	Fijación simbiótica de nitrógeno en plantas leguminosas	
		C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL,	RhiI/RhiR Tral/TraR Rail/RaiR			
		–	ExpR (LuxR huérfano)			

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Rhizobium etli</i> cepa CNPAF512		AHL de cadena larga: 3-OH-(scl)-HSL, AHLs de cadena corta	CinI/CinR RaiI/RaiR	Fijación de nitrógeno. Simbiosis. Inhibición del crecimiento de otras cepas de bacterias		
<i>Rhizobium etli</i> cepa CFN42	α -Proteobacteria; Rhizobiales.	3-oxo-C8-HSL, 3-OH-C8-HSL	Tral/TraR	Transferencia de plásmidos	Fijación simbiótica de nitrógeno en plantas leguminosas	4,11-16
<i>Rhizobium sp.</i> cepa NGR234	Grupo <i>Rhizobium</i> / <i>Agrobacterium</i>	3-oxo-C8-HSL, otras AHLs no identificadas	Tral/TraR (y otras proteínas sin identificar)	Transferencia de plásmidos. Inhibición del crecimiento de otras cepas de bacterias		

Espece	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa Rm1021	α-Proteobacteria; Rhizobiales.	3-oxo-C14-HSL, C16:1-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL, 3-oxo-C16-HSL, C18-HSL, C12-HSL	SinI/SinR	Producción de exopolisacárido. Motilidad de tipo "swarming". Nodulación		
		C16:1-HSL	ExpR (LuxR huérfano)			
	Grupo <i>Sinorhizobium/Ensifer</i>	C8-HSL, AHLs de cadena corta	Mel		Fijación simbiótica de nitrógeno en plantas leguminosas	4,11-16
<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa Rm41		3-oxo-C8-HSL	TraI/TraR	Transferencia de plásmidos		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> cepa RU 10/406		AHL desconocida	VisN/VisR	Motilidad, quimiotaxis. Regulación de genes flagelares		

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	α-Proteobacteria; Rhodobacterales	7,8-cis-N-C14-HSL	CerI/CerR	Regulación negativa de la agregación celular, formación de exopolisacárido y polihidroxiacetato	Bacteria de vida libre, con alto valor biotecnológico: Producción de H ₂ , ubiquinona, polihidroxiacetato, fijación de N ₂ y CO ₂ y biorremediación de contaminación radioactiva	14,17-20
<i>Ruegeria sp. KLH11</i>	α-Proteobacteria; Rhodobacterales	3-OH-C14-HSL, 3-OH-C14:1 HSL, 3-OH-C12-HSL, 3-OH-C13-HSL, 3-oxo-C16 HSL, 3-oxo-C16:1-HSL	SsaI/SsaR SsbI/SsbR SscI	Regulación positiva de la movilidad flagelar. Regulación negativa de formación de biopelículas. Control del crecimiento en el interior del hospedador.	Endosimbionte de esponjas	14,21

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	β-Proteobacteria; Burkholdderiales. Complejo Burkholderia cepacia (Bcc)	C6-HSL, C8-HSL	CepI/CepR CciI/CciR	Formación de biopelículas, motilidad "swarming", virulencia, actividad proteasa. Regulación negativa de la producción de sideróforos	Bacteria de la rizosfera, fijadora de N ₂ . Patógeno oportunista en humanos, causa de infección en pacientes de fibrosis quística. Patógeno ocasional en plantas	2,4,6,22
<i>Burkholderia ambifaria</i>		C6-HSL, C8-HSL	CepI/CepR	Actividad proteasa, y degradadora del colesterol, producción de compuestos antifúngicos y antimicrobianos, formación de colonias rugosas. Regulación negativa de la producción de sideróforos.	Bacteria de la rizosfera, fijadora de N ₂ y promotora del crecimiento en plantas. Patógeno oportunista en pacientes de fibrosis quística o inmunodeprimidos	

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	β-Proteobacteria; Burkholdderiales. Complejo <i>Burkholderia cepacia</i> (Bcc)	C8-HSL, C6-HSL C10-HSL, C12-HSL	CepI/CepR Bvii/BviR	—	Bacteria del suelo, asociada a la rizosfera, fijadora de N ₂ . Patógeno oportunista en pacientes de fibrosis quística o inmunodeprimidos	6,23,24
<i>Burkholderia thailandensis</i>	β-Proteobacteria; Burkholderiales. Complejo <i>Burkholderia pseudomallei</i> (Bptm)	C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-OH-C8-HSL —	BtaI1/BtaR1 BtaI2/BtaR2 BtaI3/BtaR3 BtaR4, BtaR5 (LuxR huérfanos)	Producción de bactobolina, maleilactona, quinolona, proteínas de unión a quitina y lipasa. Motilidad de nado y de tipo "swarming"	Patógeno ocasional causante de meliodosis	4,5,25-30

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	β-Proteobacteria; Burkholderiales. Complejo <i>Burkholderia pseudomallei</i> (Bptm)	C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-OH-C8-HSL, C10-HSL, 3-OH-C14-HSL —	BpsI1/BpsR1 BpsI2/BpsR2 BpsI3/BpsR3 PmlI/PmlR BpsR4, BpsR5 (LuxR huérfanos)	Producción de metaloproteasa, fosfolipasa, factores de virulencia, sideróforos, lipopolisacárido, bactobolina, maleilactona, quinolona y proteínas de unión a la quitina. Patogénesis	Patógeno oportunista causante de melioidosis	4,5,25-30
<i>Burkholderia mallei</i>		C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, —	Bmal1/ Bmar1 Bmal3/ Bmar3 Bmar4, Bmar5 (LuxR huérfanos)	Producción de factores de virulencia, maleilactona y proteínas de unión a la quitina. Transición de la fase de infección aguda a crónica.	Patógeno animal causante de zoonosis	

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Paraburkholderia unamae</i>		3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL	Bra _{UNA} / BraR _{UNA}	Regulación positiva de la producción de exopolisacárido y degradación de fenoles. Regulación negativa de la formación de biopelículas	Especie endofítica fijadora de N ₂ . No patógena.	
<i>Paraburkholderia kururiensis</i>	β-Proteobacteria; Burkholderiales	3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL	Bra _{KUR} / BraR _{KUR}	Regulación positiva de la producción de exopolisacárido y la formación de biopelículas. Colonización endofítica de la planta hospedadora	Bacteria endófito de la planta de arroz. Fijadora de N ₂	5,6,29,30
<i>Paraburkholderia xenovorans</i>		3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL	Bra _{XEN} / BraR _{XEN}	Producción de exopolisacárido	Especie no patogénica asociada a la rizosfera. Fijadora de N ₂	

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Ralstonia solanacearum</i> ⁱⁱ	β-Proteobacteria; Burkholderiales	C6-HSL, C8-HSL	SolI/SolR	El sistema de autoinducción SolI/SolR dependiente de AHLs forma parte del regulón PhcA, inducible por 3-OH PAME y que controla la expresión de factores de virulencia, exopolisacárido y endoglucanasa	Patógeno de más de 200 especies de plantas, causante de marchitez bacteriana	14,17,31,32
<i>Chromobacterium violaceum</i>	β-Proteobacteria; Neisseriales. Grupo <i>Chromobacterium</i>	C6-HSL	CviI/CviR	Producción de exoenzimas, antibióticos, cianida, violaceina	Patógeno ocasional en humanos, causante de lesiones cutáneas y sepsis	2,4,7,13,33

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Acidithibacillus ferroxidans</i>	Proteobacteria; Acidithiobacillales	3-OH-C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-OH-C12-HSL, C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-OH-C14-HSL, 3-OH-C16-HSL	AfeI/AfeR	Adhesión celular a sustratos sólidos y formación de biopelículas	Especie quimiolitotrófica acidófila implicada en la biolixiviación de minerales sulfuros metálicos	13,34,35
<i>Aeromonas hydrophila</i>	γ-Proteobacteria; Aeromonadales	C4-HSL	AhyI/AhyR	Producción de exoproteasa y metaloproteasa, formación de biopelículas, producción de factores de virulencia del sistema de secreción tipo VI	Patógeno de animales y humanos. Causante de infecciones cutáneas y gastroenteritis	7,13,36,37

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	γ-Proteobacteria; Aeromonadales	C4-HSL	AsaI/AsaR	Producción de proteasa tóxica AsaP1, factor citotóxico y pigmento	Patógeno de peces	7,13,38
<i>Hafnia alvei</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacteriales	3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL	Hall/HalR	Formación de biopelículas	Patógeno oportunista, causante de infecciones nosocomiales en heridas, infecciones entéricas y del tracto urinario y respiratorio. Contaminante de carnes, pescados y productos lácteos refrigerados	39-41

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Escherichia coli</i> K12	γ-Proteobacteria; Enterobacteriales	—	SdiA: Homólogo de LuxR. responde a AHLs producidas por otras especies. Se desconoce la presencia de sintasas de AHLs	Regulación positiva de la isla genómica de resistencia al ácido. Regulación negativa de genes flagelares.	La mayoría de cepas de <i>E. coli</i> , como la K12, forman parte de la microflora comensal en el tracto intestinal de mamíferos. Dentro de las cepas patogénicas, la enterohemorrágica (EHEC) produce toxinas de tipo Shiga, causantes de enfermedad severa tras la ingesta de quesos y carnes contaminadas	14,42-44
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 (EHEC)					Regulación positiva de la isla genómica de patogenicidad que incluye el locus de destrucción del enterocito	

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>gypsophila</i>		C4-HSL, C6-HSL		Virulencia, probablemente a través del control del sistema de secreción tipo III	Fitopatógeno, causante de agallas en <i>Gypsophila spp.</i> y de reacción hipersensible en <i>Beta vulgaris</i> (remolacha)	
<i>Pantoea agglomerans</i> YS19	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	3-oxo-C8-HSL	PagI/PagR: alto grado de homología con el sistema Smal/SmaR de <i>S. marcescens</i> cepa ATCC 39006	Promoción del crecimiento celular y formación de simplasmata (agregados multicelulares de resistencia al estrés y adaptación a la asociación endofítica). Colonización y promoción del crecimiento de la planta. Motilidad de tipo “swarming” y de nado.	Bacteria endofítica de la planta de arroz. Fijación simbiótica de nitrógeno y producción de fitohormonas	13,45,46

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pantoea stewartii</i> <i>subsp. Stewartii</i>		3-oxo-C6-HSL	EsaI/EsaR SdiA			
<i>Pectobacterium carotovorum</i> <i>subsp. carotovorum</i> ⁱⁱⁱ <i>cepa Pcc SCC3193</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR1/ ExpR2	Producción de exopolisacárido de la cápsula (stewartan) y cubierta celular, adhesión y motilidad en superficies, respuesta a estrés	Fitopatógeno específico del maíz. Causante de marchitamiento y tizón foliar	13,47
<i>cepa Pcc EC153</i>		3-oxo-C8-HSL	AhII/ExpR			
<i>cepa Pcc 71</i>		3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C6-HSL	AhII/ExpR1/ ExpR2			
<i>cepa Pcc SCRI193</i>		3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR1/ ExpR2			
<i>cepa Pcc ATCC390048</i>		3-oxo-C6-HSL	Carl/CarR ExpR/VirR			

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> cepa Pba SCRI1043	γ-Proteobacteria; Enterobacteriales	3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR/ VirR	Producción de enzimas degradadoras de la pared celular vegetal. Expresión del gen <i>nip</i> , involucrado en patogénesis y necrosis.	Fitopatógeno, causante común de maceración y putrefacción de frutas y verduras	2,4,7,41,48,49
<i>Pectobacterium betavasculatorum</i> ^{iv}		3-oxo-C6-HSL	EcbI/EcbR/ VirR	Capacidad de causar putrefacción. Actividad proteasa		
<i>Pectobacterium</i> <i>sp.</i> cepa A2JM		3-oxo-C6-HSL	Proteínas LuxI/LuxR homólogas a las de <i>P. betavasculatorum</i> y <i>P. carotovorum</i> Pcc 71)	Regulación de la actividad proteolítica, pectinolítica y celulítica. Producción de sideróforos		

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Dickeya dadantii</i> cepa 3937 ^v	γ-Proteobacteria; Enterobacteriales	3-oxo-C6-HSL, C6-HSL	ExpI/ExpR	Capacidad de maceración. Producción de pectinasas, proteasas, celulasas y factores de virulencia. Existe otro Sistema Vfm, no homólogo al modelo LuxI/LuxR. implicado en el control de la virulencia y motilidad	Fitopatógeno, causante de putrefacción blanda en cultivos de frutas y hortalizas	14,50-52
<i>Dickeya solani</i>		3-oxo-C6-HSL, C6-HSL	ExpI/ExpR	Control negativo de la motilidad de tipo "swarming" y de nado. Inducción de la formación de agregados celulares y virulencia	Fitopatógeno, causante de putrefacción blanda y de inhibición de la germinación en cultivos de arroz	53,54
<i>Dickeya zeae</i> cepa EC1		3-oxo-C6-HSL	ExpI/ExpR			

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Salmonella enterica ser. Typhimurium</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	—	SdiA: Homólogo de LuxR. responde a AHLs producidas por otras especies. Se desconoce la presencia de sintasas de AHLs	Regulación positiva del locus <i>rck</i> (de resistencia a la muerte mediada por complemento, codificado en un plásmido de virulencia) y del gen cromosómico <i>srgE</i> (función hipotética en la regulación del sistema de secreción de tipo III). Detección de AHLs exógenas	Patógeno entérico	14,42-44
<i>Serratia ATCC 39006</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	C4-HSL, C6-HSL	SmaI/SmaR CarR_{sma} (LuxR huérfano)	Producción de los antibióticos carbapenema y prodigiosina. Producción de enzimas celulolíticas	Cepa utilizada como modelo de producción de antibióticos. Patógeno de plantas y animales	2,13,55-58

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Serratia marcescens</i> <i>cepa MG1</i> ^{vi}	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	C4-HSL, C6-HSL	SwrI/SwrR	Motilidad de tipo "swarming". Producción de proteasa y proteínas de la capa S. Formación de biopelículas. Fermentación de butanodiol	Patógeno, causante habitual de infecciones nosocomiales:	2,13,55-58
<i>cepa AS-1</i>		C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	SpnI/SpnR	Motilidad de tipo "swarming", producción de prodigiosina, formación de biopelículas	neumonía, infecciones asociadas a catéteres intravenosos, infecciones del tracto urinario, osteomielitis, endocarditis y sepsis asociada a transfusiones sanguíneas	
<i>cepa 12</i>		C4-HSL, C6-HSL	SmaI/SmaR	Motilidad de tipo "swarming". Actividad hemolítica. Producción de caseinasa, quitinasa y biopelículas		

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Serratia plymuthica</i> cepa IC1270	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	3-OH-C6-HSL, 3-OH-C8-HSL	SpII/SpIR	Producción de nucleasa, quitinasa, proteasa y compuesto antimicrobiano.	Patógeno oportunista, causante de peritonitis, neumonía, sepsis e infecciones de heridas.	2,13,55-58
cepa RVH1		C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	SpII/SpIR	Fermentación de butanodiol		
<i>Serratia proteomaculans</i> cepa B5a		C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	SpRI/SprR	Producción de lipasa, proteasa y quitinasa	Especie psicotrófila, causante del deterioro de pescados y lácteos refrigerados. Patógeno oportunista	
<i>Yersinia enterocolitica</i>		3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL	YenI/YenR	Motilidad de tipo "swarming" y de nado, por medio del control del gen de la flagelina <i>fleB</i> . No está claro si existe vinculación la patogénesis	Patógeno, causante de enteritis, linfadenitis mesentérica o ileitis terminal en humanos	59-61

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Yersinia ruckeri</i> cepa 150	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	3-oxo-C8-HSL (dominante) 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C10 HSL, 3-oxo-C7-HSL, C8-HSL, C6-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C9-HSL	YruI/YruR (posiblemente exista algún otro circuito paralelo formando parte de un sistema jerárquico de QS)	—	Patógeno, causante de la enfermedad entérica de la boca roja en peces	59-61
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C7-HSL 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL (y otras AHLs sin función conocida)	YpsI/YpsR YtbI/YtbR	Agregación celular. Control del inicio del nado por medio de la expresión ,dependiente de temperatura, del operón flagelar <i>flhDC</i> y el factor sigma <i>fliA</i>	Enteropatógeno, causante de gastroenteritis en humanos e infecciones sistémicas crónicas y artritis reactiva, en especial en pacientes inmunodeprimidos	62

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Yersinia pestis</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacterales	3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL, C8-HSL	YpeI/YpeR YepI/YepR (elevada homología con el sistema <i>Y. pseudotuberculosis</i>)	Control de la ruta del glioxilato (probable adaptación a la limitación de nutrientes durante el parasitismo). Posible papel en patogénesis y virulencia.	Parásito en mamíferos y pulgas. Patógeno causante de plagas zoonóticas neumónicas, bubónicas y septicémicas, principalmente transmitidas a humanos desde roedores infectados por pulgas	13,59,60,63,64
<i>Shigella flexneri</i>		—	SdiA: Homólogo de LuxR. responde a AHLs exógenas. Se desconoce la presencia de sintasas de AHLs	—	Patógeno entérico, causante de shigelosis en humanos	14

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Shigella sonnei</i>	γ-Proteobacteria; Enterobacteriales	—	SdiA (ver especie anterior)	—	Patógeno entérico, causante de shigelosis en humanos	14
<i>Shigella dysenteriae</i>						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-HSL 3-oxo-C12-HSL	RhII/RhIR LasI/LasR QscR (LuxR huérfano)	Producción de elastasa, proteasas, exotoxinas, factores de virulencia, ramnolípidos, lectinas, ác. cianhídrico, piocianina. Expresión del sistema de secreción tipo II. Formación de biopelículas. Síntesis de RpoS.	Patógeno oportunista en humanos, causante principal de infecciones nosocomiales adquiridas en hospitales (tracto urinario, oído)	2,4,7,656667,68

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pseudomonas putida</i>	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas putida</i>	3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C8-HS, 3-oxo-C6-HSL	PpuI/PpuR	Formación de biopelículas. Motilidad	Saprófito del suelo no patógeno, utilizado en biorremediación de suelos contaminados con solventes orgánicos	2,4,13,65,69
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	C6-HSL	PhzI/PhzR CsaI/CsaR	Biosíntesis de fenacina y componentes de la superficie celular. Producción de proteasa. Capacidad de colonización de la rizosfera	Especie asociada a la rizosfera, capaz de suprimir infecciones fúngicas gracias a la producción de fenacina. Alta importancia en biocontrol	13,14,70-73
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas syringae</i>	3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C10-HSL, C10-HSL, C12-HSL	PfvI/PfvR PfsI/PfsR	Patogénesis	Fitopatógeno, causante de la pudrición de la vaina marrón en plantas de arroz	13,74

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. syringae</i> <i>cepa B728</i>	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas syringae</i>	3-oxo-C6-HSL	AhII/AhIR	Resistencia a estrés por desecación y estrés oxidativo, colonización foliar y adaptación a la vida epifítica, virulencia. Producción de exopolisacárido (alginato) y represión de la motilidad de tipo "swarming".	Fitopatógeno epifítico, causante de la enfermedad foliar de la mancha parda en fabáceas	75-79
<i>pv. maculicola</i> <i>cepa CFBP 10912-9</i>		3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL	PsmI/PsmR	Producción de exopolisacárido (alginato) y represión de la motilidad de tipo "swarming".	Fitopatógeno causante de la enfermedad de mancha foliar en crucíferas	
<i>pv. tabaci</i> <i>cepa 6605</i>		C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL	Psyn/PsynR	Formación de biopelículas. Captación de hierro dependiente de pioverdina	Fitopatógeno, causante de la enfermedad del fuego salvaje en plantas de tabaco	

Espece	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Pseudomonas fluorescens</i> cepa NCIMB 10586	γ-Proteobacteria; Pseudomonadales Grupo <i>Pseudomonas fluorescens</i>	3-OH-C14-HSL, C10-HSL, C6-HSL	MupI/MupR	Producción de los antibióticos mupirocina y fenazina-1 ácido carboxílico. Autorregulación positiva de la expresión de <i>phzR</i>	Especie psicrotrófica causante del deterioro de lácteos refrigerados y potencialmente patógena	14,17,73,80-87
cepa 2-79		3-OH-C6-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-OH-C10-HSL, C6-HSL, C8-HSL	PhzI/PhzR			
cepa F113		3-OH-C14:1-HSL, C10-HSL, C6-HSL	HdtS (sintasa no de tipo LuxI)	—	Cepas asociadas a la rizosfera, promotoras del crecimiento en plantas, supresoras de infecciones fúngicas. Alta importancia en biocontrol	
cepa 2P42		3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL	PcoI/PcoR (homólogos de MupI/MupR de la cepa NCIMB 10586)	Producción de biopelículas. Colonización de la rizosfera y supresión de infecciones fúngicas		
cepa 5064		3-OH-C8-HSL	—	Producción de biosurfactante	Fitopatógeno, causante de putrefacción blanda en el brócoli	

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Aliivibrio fischeri</i> ^{vii}	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-oxo-C6-HSL, C8-HSL También se han reportado en cantidades minoritarias de 3-OH-C8-HSL y C10-HSL	LuxI/LuxR AinS/AinR/ LitR (no de tipo LuxI/LuxR; ver Lámina 6)	Bioluminiscencia	Especie bioluminiscente. Producción simbiótica de luz en el interior de órganos especializados de peces monocéntricos y cefalópodos sepiólidos	2,4,13,88,89
<i>Aliivibrio logei</i> cepa <i>KCh1</i> ^{viii}	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-oxo-C6-HSL, C4-HSL, 3-oxo-C4-HSL, C6-HSL, 3-OH-C6-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-OH-C10-HSL	LuxI/LuxR1/ LuxR2 (homólogos del sistema de <i>A. salmonicida</i>)	Bioluminiscencia	Simbionte de numerosos cefalópodos y peces. Especie principal en el órgano luminoso de calamares del género <i>Sepiola</i>	89-93

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Aliivibrio salmonicida</i> ^{ix}	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-oxo-C4-HSL, C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, C8-HLS, 3-oxo-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL	LuxI/LuxR1/ LuxR2 (dos copias de <i>luxR</i> . Estructura del operón <i>lux</i> diferente de <i>A. fischeri</i>)	Bioluminiscencia, interacción con el hospedador y virulencia.	Especie psicrófila. No bioluminiscente de forma natural, únicamente tras adición de aldehído alifático al cultivo. Patógeno del salmón con importantes implicaciones en acuicultura.	89-93
		3-OH-C10-HSL	AinS/LitR (no de tipo LuxI/LuxR)			
<i>Aliivibrio wodanis</i> ^x		3-oxo-C4-HSL, 3-oxo-C6-HSL, C6-HSL, 3-OH-C6-HSL, C8-HLS, 3-oxo-C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-OH-C12-HSL	—	—	Especie psicrófila, patógeno de peces	89,94

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio harveyi</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales. Grupo <i>Vibrio harveyi</i>	3-OH-C4-HSL	LuxM/LuxN (LuxM es homólogo de AinS de <i>V. fischeri</i>)	Circuito multicanal de QS con dos sistemas adicionales no dependientes de AHL. En última instancia, el regulador maestro LuxR (no homólogo, de LuxR de <i>V. fischeri</i> , sino a LitR del mismo) controla la bioluminiscencia, el sistema de virulencia de secreción tipo III, la producción de sideróforos, metaloproteasa, exopolisacárido, biopelículas y la motilidad flagelar	Patógeno de numerosas especies de peces y crustáceos marinos. Causante de vasculitis, gastroenteritis y lesiones oculares en peces y de vibriosis luminiscente en camarones, con importantes implicaciones en acuicultura	2,95-99

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales. Grupo <i>Vibrio harveyi</i>	-	LuxM/LuxN (Homólogo del sistema de <i>V. harveyi</i>)	El regulador maestro OpaR (homólogo de LuxR de <i>V. harveyi</i>) controla el sistema de secreción de tipo VI y la producción de polisacárido de la cápsula. Regulación negativa del sistema de secreción de tipo III y la motilidad tipo "swarming".	Patógeno ocasional en humanos, causante de gastroenteritis asociada a alimentos contaminados y de infecciones cutáneas. Habitante de ambientes marinos y estuarios	13,99,100
<i>Vibrio anguillarum</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-oxo-C10-HSL, C6-HSL, 3-OH-C6-HSL, 3-OH-C10-HSL	VanI/VanR VanM/VanN (homólogo del sistema LuxM/LuxN de <i>V. harveyi</i>)	Producción de pigmento y metaloproteasa EmpA. Formación de biopelículas	Patógeno de peces y otros animales acuáticos, causante de vibriosis y de pérdidas económicas en pesquerías. Patógeno oportunista en humanos	13,101,102

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio alginolyticus</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales. Grupo <i>Vibrio harveyi</i>	—	LuxM/LuxN (Homólogo del sistema de <i>V. harveyi</i>)	Circuito multicanal de QS con dos sistemas adicionales no dependientes de AHL. El regulador maestro LuxR _{val} (homólogo de LuxR de <i>V. harveyi</i>) controla la producción de factores de virulencia y la movilidad celular	Patógeno ocasional en humanos, causante de otitis e infecciones oculares y de heridas en ambientes marinos. Endosimbionte de peces globo	88,103
<i>Vibrio scophthalmi</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-OH-C12-HSL (posiblemente otras especies de AHLs, por caracterizar)	Sin caracterizar	Circuito multicanal, con un sistema adicional no dependiente de AHL homólogo del de <i>V. vulnificus</i> . Posible papel en la adaptación a la vida mutualista.	Bacteria mutualista asociada a la microbiota intestinal del rodaballo	104

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio fluvialis</i>	γ-Proteobacteria; Vibrionales	3-oxo-C10-HSL (mayoritaria), C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Vfql/VfqR	Circuito multicanal de QS con dos sistemas adicionales no dependientes de AHL. El regulador maestro HapR (homólogo de LuxR de <i>V. harveyi</i>) controla negativamente el canal Vfql/VfqR y positivamente la producción de proteasa. El canal dependiente de AHLs regula positivamente la producción de hemolisina y activa la citotoxicidad en células hospedadoras.	Patógeno emergente en humanos, asociado a alimentos contaminados, ambientes acuáticos y aguas fecales. Causa deshidratación moderada, vómitos, fiebre, dolor abdominal y diarreas	100

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio vulnificus</i> biotipos 1 y 2	γ-Proteobacteria; Vibrionales	C4-HSL	Sin caracterizar	Circuito multicanal, con un sistema adicional no dependiente de AHL. El regulador maestro SmcR (homólogo de LuxR de <i>V. harveyi</i>) controla la virulencia, luminiscencia, motilidad, producción de hemolisina, proteasa, elastasa, biopelículas y respuestas a estrés. Los niveles de AHL aumentan en presencia de componentes de la sangre. Posible papel en infección	Patógeno acuático causante de vibriosis en peces y humanos, que puede desencadenar en septicemia letal en personas con enfermedad hepática e inmunodeprimidas	88,99,105

Especie	Grupo de Proteobacterias	Tipo de AHL	Sintasa/ Receptor de AHLs	Fenotipo de QS	Efectos de la cepa en humanos y medio ambiente	Referencias
<i>Vibrio brasiliensis</i> cepa T33	γ-Proteobacteria; Vibrionales. Grupo <i>Vibrio orientalis</i>	C6-HSL, 3-oxo-C10-HSL	Sin caracterizar	Posible función en la formación de biopelículas	Bacteria asociada a animales acuáticos de ambientes marinos y de acuicultura tropicales. Patógeno potencial de peces y crustáceos	106,107
<i>Vibrio tasmaniensis</i> cepa LGP32 ^{xi}	γ-Proteobacteria; Vibrionales	C10-HSL 3-oxo-C12-HSL 3-OH-C12-HSL C14:1-HSL	Sin caracterizar la conexión entre las AHLs y sus sintasas	Circuito multicanal, con dos sistemas adicionales no dependientes de AHL (homólogo al sistema de <i>V. harveyi</i>). El canal dependiente de AHLs controla la producción de metaloproteasas en procesos de virulencia	Bacteria marina asociada a la flora intestinal de numerosas especies de peces y mariscos. Causante de mortalidad en cultivos de ostras del Pacífico	108-110

- ⁱ Anteriormente, *Agrobacterium rhizogenes*
- ⁱⁱ Anteriormente *Pseudomonas solanacearum*
- ⁱⁱⁱ Anteriormente, *Erwinia carotovora*
- ^{iv} Anteriormente, *Erwinia carotovora subsp. betavasculorum*
- ^v Anteriormente, *Erwinia chrysanthemi*; *Pectobacterium chrysanthemi*
- ^{vi} Anteriormente, *Serratia liquefaciens MGI*
- ^{vii} Anteriormente, *Vibrio fischeri*
- ^{viii} Anteriormente, *Vibrio logei*
- ^{ix} Anteriormente, *Vibrio salmonicida*
- ^x Anteriormente, *Vibrio wodanis*
- ^{xi} Anteriormente, *Vibrio splendidus*

10.1. REFERENCIAS

- (1) Swift, S.; Downie, J. A.; Whitehead, N. A.; Barnard, A. M.; Salmond, G. P.; Williams, P. Quorum Sensing as a Population-Density-Dependent Determinant of Bacterial Physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **2001**, *45*, 199–270.
- (2) Galloway, W. R. J. D.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Welch, M.; Spring, D. R. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (1), 28–67.
- (3) Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS Microbiology Reviews.* 2015.
- (4) Geske, G. D.; O'Neill, J. C.; Blackwell, H. E. Expanding Dialogues: From Natural Autoinducers to Non-Natural Analogues That Modulate Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1432–1447.
- (5) Suarez-Moreno, Z. R.; Caballero-Mellado, J.; Venturi, V. The New Group of Non-Pathogenic Plant-Associated Nitrogen-Fixing Burkholderia Spp. Shares a Conserved Quorum-Sensing System, Which Is Tightly Regulated by the RsaL Repressor. *Microbiology* **2008**, *154* (7), 2048–2059.
- (6) Suárez-Moreno, Z. R.; Devescovi, G.; Myers, M.; Hallack, L.; Mendonça-Previato, L.; Caballero-Mellado, J.; Venturi, V. Commonalities and Differences in Regulation of N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing in the Beneficial Plant-Associated Burkholderia Species Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76* (13), 4302–4317.
- (7) University of Nottingham. The Quorum Sensing site. Table of organisms with homologues of the luxI and luxR genes from *Vibrio fischeri* <https://www.nottingham.ac.uk/quorum/table.htm> (accessed Sep 16, 2018).
- (8) Hao, G.; Burr, T. J. Regulation of Long-Chain N-Acyl-Homoserine Lactones in *Agrobacterium Vitis*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188* (6), 2173–2183.
- (9) Li, Y.; Gronquist, M. R.; Hao, G.; Holden, M. R.; Eberhard, A.; Scott, R. A.; Savka, M. A.; Szegedi, E.; Sule, S.; Burr, T. J. Chromosome and Plasmid-Encoded N-Acyl Homoserine Lactones Produced by *Agrobacterium Vitis* Wildtype and Mutants That Differ in Their Interactions with Grape and Tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2006**,

- 67 (6), 284–290.
- (10) Lowe, N.; Gan, H. M.; Chakravartty, V.; Scott, R.; Szegedi, E.; Burr, T. J.; Savka, M. A. Quorum-Sensing Signal Production by *Agrobacterium* Vitis Strains and Their Tumor-Inducing and Tartrate-Catabolic Plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *296* (1), 102–109.
 - (11) Sanchez-Contreras, M.; Bauer, W. D.; Gao, M.; Robinson, J. B.; Allan Downie, J. Quorum-Sensing Regulation in Rhizobia and Its Role in Symbiotic Interactions with Legumes. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2007**, *362* (1483), 1149–1163.
 - (12) Edwards, A.; Frederix, M.; Wisniewski-Dyé, F.; Jones, J.; Zorreguieta, A.; Downie, J. A. The Cin and Rai Quorum-Sensing Regulatory Systems in *Rhizobium Leguminosarum* Are Coordinated by ExpR and CinS, a Small Regulatory Protein Coexpressed with CinI. *J. Bacteriol.* **2009**, *191* (9), 3059–3067.
 - (13) Suárez-Moreno, Z. R.; González, J. F.; Devescovi, G.; Venturi, V. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Signals, Role and Networking. In *Bacterial Regulatory Networks*; Filloux, A. A. M., Ed.; Norfolk, UK, 2012; pp 87–121.
 - (14) Lerat, E.; Moran, N. A. The Evolutionary History of Quorum-Sensing Systems in Bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **2004**, *21* (5), 903–913.
 - (15) Subramoni, S.; Nathoo, N.; Klimov, E.; Yuan, Z.-C.; Gelvin, S. B.; Deeken, R. *Agrobacterium Tumefaciens* Responses to Plant-Derived Signaling Molecules. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5* (322).
 - (16) Moris, M.; Braeken, K.; Schoeters, E.; Verreth, C.; Beullens, S.; Vanderleyden, J.; Michiels, J. Effective Symbiosis between *Rhizobium Etli* and *Phaseolus Vulgaris* Requires the Alarmones PpGpp. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (15), 5460–5469.
 - (17) Gray, K. M.; Garey, J. R. The Evolution of Bacterial LuxI and LuxR Quorum Sensing Regulators. *Microbiology* **2001**, *147* (8), 2379–2387.
 - (18) Puskas, A.; Greenberg, E. P.; Kaplan, S.; Schaefer, A. L. A Quorum-Sensing System in the Free-Living Photosynthetic Bacterium *Rhodospirillum Rubrum*. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (23), 7530–7537.
 - (19) Imam, S.; Noguera, D. R.; Donohue, T. J. Global Insights into Energetic and Metabolic Networks in *Rhodospirillum Rubrum*. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7*, 89.
 - (20) Kho, D.-H.; Jang, J.-H.; Kim, H.-S.; Kim, K.-S.; Lee, J. K. Quorum Sensing of *Rhodospirillum Rubrum* Negatively Regulates Cellular Poly- β -Hydroxybutyrate Content Under Aerobic Growth Conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13* (3), 477–481.
 - (21) Zan, J.; Cicirelli, E. M.; Mohamed, N. M.; Sibhatu, H.; Kroll, S.; Choi, O.; Choi, O.; Uhlson, C. L.; Wysoczynski, C. L.; Wysoczynski, C. L.; Murphy, R. C.; Churchill, M. E. A.; Hill, R. T.; Fuqua, C. A Complex LuxR-LuxI Type Quorum Sensing Network in a Roseobacterial Marine Sponge Symbiont Activates Flagellar Motility and Inhibits Biofilm Formation. *Mol. Microbiol.* **2012**, *85* (5), 916–933.
 - (22) Chapalain, A.; Vial, L.; Laprade, N.; Dekimpe, V.; Perreault, J.; Deziel, E. Identification of Quorum Sensing-Controlled Genes in *Burkholderia Ambifaria*. *Microbiologyopen* **2013**, *2* (2), 226–242.
 - (23) Conway, B.-A.; Greenberg, E. P. Quorum-Sensing Signals and Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia Vietnamensis*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (4), 1187–1191.
 - (24) Malott, R. J.; Sokol, P. A. Expression of the BviIR and CepIR Quorum-Sensing Systems of *Burkholderia Vietnamensis*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (8), 3006–3016.
 - (25) Majerczyk, C. D.; Brittnacher, M. J.; Jacobs, M. A.; Armour, C. D.; Radey, M. C.; Bunt, R.; Hayden, H. S.; Bydalek, R.; Greenberg, E. P. Cross-Species Comparison of the *Burkholderia Pseudomallei*, *Burkholderia Thailandensis*, and *Burkholderia Mallei*

- Quorum-Sensing Regulons. *J. Bacteriol.* **2014**, *196* (22), 3862–3871.
- (26) Lumjiaktase, P.; Diggle, S. P.; Loprasert, S.; Tungpradabkul, S.; Daykin, M.; Camara, M.; Williams, P.; Kunakorn, M. Quorum Sensing Regulates DpsA and the Oxidative Stress Response in *Burkholderia Pseudomallei*. *Microbiology* **2006**, *152* (Pt 12), 3651–3659.
- (27) Challacombe, J. F.; Stubben, C. J.; Klimko, C. P.; Welkos, S. L.; Kern, S. J.; Bozue, J. A.; Worsham, P. L.; Cote, C. K.; Wolfe, D. N. Interrogation of the *Burkholderia Pseudomallei* Genome to Address Differential Virulence among Isolates. *PLoS One* **2014**, *9* (12), e115951.
- (28) Chan, Y. Y.; Bian, H. S.; Tan, T. M. C.; Mattmann, M. E.; Geske, G. D.; Igarashi, J.; Hatano, T.; Suga, H.; Blackwell, H. E.; Chua, K. L. Control of Quorum Sensing by a *Burkholderia Pseudomallei* Multidrug Efflux Pump. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (11), 4320–4324.
- (29) De Meyer, S. E.; Briscoe, L.; Martínez-Hidalgo, P.; Agapakis, C. M.; de-los Santos, P. E.; Seshadri, R.; Reeve, W.; Weinstock, G.; O'Hara, G.; Howieson, J. G.; Hirsch, A. M. Symbiotic *Burkholderia* Species Show Diverse Arrangements of Nif/Fix and Nod Genes and Lack Typical High-Affinity Cytochrome Cbb3 Oxidase Genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2016**, *29* (8), 609–619.
- (30) Angus, A. A.; Agapakis, C. M.; Fong, S.; Yerrapragada, S.; Estrada-de los Santos, P.; Yang, P.; Song, N.; Kano, S.; sus Caballero-Mellado, J.; de Faria, S. M.; Dakora, F. D.; Weinstock, G.; Hirsch, A. M. Plant-Associated Symbiotic *Burkholderia* Species Lack Hallmark Strategies Required in Mammalian Pathogenesis. *PLoS One* **2014**, *9* (1), e83779.
- (31) Flavier, A. B.; Ganova-Raeva, L. M.; Schell, M. A.; Denny, T. P. Hierarchical Autoinduction in *Ralstonia Solanacearum*: Control of Acyl-Homoserine Lactone Production by a Novel Autoregulatory System Responsive to 3-Hydroxypalmitic Acid Methyl Ester. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (22), 7089–7097.
- (32) Kai, K. Bacterial Quorum Sensing in Symbiotic and Pathogenic Relationships with Hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82* (3), 363–371.
- (33) The Complete Genome Sequence of *Chromobacterium Violaceum* Reveals Remarkable and Exploitable Bacterial Adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (20), 11660–11665.
- (34) Farah, C.; Vera, M.; Morin, D.; Haras, D.; Jerez, C. A.; Guiliani, N. Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus Ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (11), 7033–7040.
- (35) Mamani, S.; Moinier, D.; Denis, Y.; Soulère, L.; Queneau, Y.; Talla, E.; Bonnefoy, V.; Guiliani, N. Insights into the Quorum Sensing Regulon of the Acidophilic *Acidithiobacillus Ferrooxidans* Revealed by Transcriptomic in the Presence of an Acyl Homoserine Lactone Superagonist Analog. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1365.
- (36) Garde, C.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Jakobsen, T. H.; Hentzer, M.; Claussen, A.; Sneppen, K.; Ferkinghoff-Borg, J.; Sams, T. Quorum Sensing Regulation in *Aeromonas Hydrophila*. *J. Mol. Biol.* **2010**, *396* (4), 849–857.
- (37) Khajanchi, B. K.; Sha, J.; Kozlova, E. V.; Erova, T. E.; Suarez, G.; Sierra, J. C.; Popov, V. L.; Horneman, A. J.; Chopra, A. K. N-Acylhomoserine Lactones Involved in Quorum Sensing Control the Type VI Secretion System, Biofilm Formation, Protease Production, and in Vivo Virulence in a Clinical Isolate of *Aeromonas Hydrophila*. *Microbiology* **2009**, *155* (Pt 11), 3518–3531.
- (38) Schwenteit, J.; Gram, L.; Nielsen, K. F.; Fridjonsson, O. H.; Bornscheuer, U. T.; Givskov, M.; Gudmundsdottir, B. K. Quorum Sensing in *Aeromonas Salmonicida*

- Subsp. *Achromogenes* and the Effect of the Autoinducer Synthase *AsaI* on Bacterial Virulence. *Vet. Microbiol.* **2011**, *147* (3), 389–397.
- (39) Tan, J.-Y.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Quorum Sensing Activity of *Hafnia Alvei* Isolated from Packed Food. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14* (4), 6788–6796.
- (40) Souza Viana, E.; Martino Campos, M. E.; Reis Ponce, A.; Cuquetto Mantovani, H.; Dantas Vanetti, M. C. Biofilm Formation and Acyl Homoserine Lactone Production in *Hafnia Alvei* Isolated from Raw Milk. *Biol. Res.* **2009**, *42* (4), 427–436.
- (41) Rasch, M.; Andersen, J. B.; Nielsen, K. F.; Flodgaard, L. R.; Christensen, H.; Givskov, M.; Gram, L. Involvement of Bacterial Quorum-Sensing Signals in Spoilage of Bean Sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71* (6), 3321–3330. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3321-3330.2005>.
- (42) Sabag-Daigle, A.; Soares, J. A.; Smith, J. N.; Elmasry, M. E.; Ahmer, B. M. M. The Acyl Homoserine Lactone (AHL) Receptor, SdiA, of *E. Coli* and *Salmonella* Does Not Respond to Indole, but at High Concentrations Indole Can Interfere with AHL Detection. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**.
- (43) Yamamoto, K.; Yata, K.; Fujita, N.; Ishihama, A. Novel Mode of Transcription Regulation by SdiA, an *Escherichia Coli* Homologue of the Quorum-Sensing Regulator. *Mol. Microbiol.* **2008**, *41* (5), 1187–1198.
- (44) Michael, B.; Smith, J. N.; Swift, S.; Heffron, F.; Ahmer, B. M. M. SdiA of *Salmonella* Enterica Is a LuxR Homolog That Detects Mixed Microbial Communities. *J. Bacteriol.* **2001**, *183* (19), 5733–5742.
- (45) Chalupowicz, L.; Manulis-Sasson, S.; Itkin, M.; Sacher, A.; Sessa, G.; Barash, I. Quorum-Sensing System Affects Gall Development Incited by *Pantoea Agglomerans* Pv. *Gypsophilae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2008**, *21* (8), 1094–1105.
- (46) Jiang, J.; Wu, S.; Wang, J.; Feng, Y. AHL-Type Quorum Sensing and Its Regulation on Symplasmata Formation in *Pantoea Agglomerans* YS19. *J. Basic Microbiol.* **2015**, *55* (5), 607–616.
- (47) Ramachandran, R.; Burke, A. K.; Cormier, G.; Jensen, R. V.; Stevens, A. M. Transcriptome-Based Analysis of the *Pantoea Stewartii* Quorum-Sensing Regulon and Identification of EsaR Direct Targets. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80* (18), 5790–5800.
- (48) Pöllumaa, L.; Alamäe, T.; Mäe, A. Quorum Sensing and Expression of Virulence in *Pectobacteria*. *Sensors (Basel)*. **2012**, *12* (3), 3327–3349.
- (49) Burr, T.; Barnard, A. M. L.; Corbett, M. J.; Pemberton, C. L.; Simpson, N. J. L.; Salmond, G. P. C. Identification of the Central Quorum Sensing Regulator of Virulence in the Enteric Phytopathogen, *Erwinia Carotovora*: The VirR Repressor. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59* (1), 113–125.
- (50) Nasser, W.; Bouillant, M. L.; Salmond, G.; Reverchon, S. Characterization of the *Erwinia Chrysanthemi* ExpI-ExpR Locus Directing the Synthesis of Two N-Acyl-Homoserine Lactone Signal Molecules. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29* (6), 1391–1405.
- (51) Potrykus, M.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N.; Lojkowska, E. Interplay of Classic Exp and Specific Vfm Quorum Sensing Systems on the Phenotypic Features of *Dickeya Solani* Strains Exhibiting Different Virulence Levels. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, *19* (5), 1238–1251.
- (52) Nasser, W.; Dorel, C.; Wawrzyniak, J.; Van Gijsegem, F.; Groleau, M.-C.; Déziel, E.; Reverchon, S. Vfm a New Quorum Sensing System Controls the Virulence of *Dickeya Dadantii*. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15* (3), 865–880.
- (53) Hussain, M. B. B. M.; Zhang, H.-B.; Xu, J.-L.; Liu, Q.; Jiang, Z.; Zhang, L.-H. The Acyl-Homoserine Lactone-Type Quorum-Sensing System Modulates Cell Motility

- and Virulence of *Erwinia Chrysanthemi* Pv. Zeae. *J. Bacteriol.* **2008**, *190* (3), 1045–1053.
- (54) Samson, R.; Legendre, J. B.; Christen, R.; Fischer-Le Saux, M.; Achouak, W.; Gardan, L. Transfer of *Pectobacterium Chrysanthemi* (Burkholder et Al. 1953) Brenner et Al. 1973 and *Brenneria Paradisiaca* to the Genus *Dickeya* Gen. Nov. as *Dickeya Chrysanthemi* Comb. Nov. and Delineation of *Dickeya Paradisiaca* Comb. Nov. and Delineation of Four Novel Species, Dick. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55* (Pt 4), 1415–1427.
- (55) Van Houdt, R.; Givskov, M.; Michiels, C. W. Quorum Sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31* (4), 407–424.
- (56) Morohoshi, T.; Shiono, T.; Takidouchi, K.; Kato, M.; Kato, N.; Kato, J.; Ikeda, T. Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia Marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (20), 6339–6344.
- (57) Fineran, P. C.; Iglesias Cans, M. C.; Ramsay, J. P.; Wilf, N. M.; Cossyleon, D.; McNeil, M. B.; Williamson, N. R.; Monson, R. E.; Becher, S. A.; Stanton, J.-A. L.; Brügger, K.; Brown, S. D.; Salmond, G. P. C. Draft Genome Sequence of *Serratia* Sp. Strain ATCC 39006, a Model Bacterium for Analysis of the Biosynthesis and Regulation of Prodigiosin, a Carbapenem, and Gas Vesicles. *Genome Announc.* **2013**, *1* (6).
- (58) Christensen, A. B.; Riedel, K.; Eberl, L.; Flodgaard, L. R.; Molin, S.; Gram, L.; Givskov, M. Quorum-Sensing-Directed Protein Expression in *Serratia Proteamaculans* B5a. *Microbiology* **2003**, *149* (2), 471–483.
- (59) Atkinson, S.; Sockett, R. E.; Camara, M.; Williams, P. Quorum Sensing and the Lifestyle of *Yersinia*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2006**, *8* (1), 1–10.
- (60) Atkinson, S.; Williams, P. Quorum Sensing and Social Networking in the Microbial World. *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6* (40), 959–978.
- (61) Kastbjerg, V. G.; Nielsen, K. F.; Dalsgaard, I.; Rasch, M.; Bruhn, J. B.; Givskov, M.; Gram, L. Profiling Acylated Homoserine Lactones in *Yersinia Ruckeri* and Influence of Exogenous Acyl Homoserine Lactones and Known Quorum-Sensing Inhibitors on Protease Production. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102* (2), 363–374.
- (62) Atkinson, S.; Chang, C.-Y.; Patrick, H. L.; Buckley, C. M. F.; Wang, Y.; Sockett, R. E.; Cámara, M.; Williams, P. Functional Interplay between the *Yersinia Pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI Quorum Sensing Systems Modulates Swimming Motility by Controlling Expression of FlhDC and FliA. *Mol. Microbiol.* **2008**, *69* (1), 137–151.
- (63) LaRock, C. N.; Yu, J.; Horswill, A. R.; Parsek, M. R.; Minion, F. C. Transcriptome Analysis of Acetyl-Homoserine Lactone-Based Quorum Sensing Regulation in *Yersinia Pestis*. *PLoS One* **2013**, *8* (4), e62337.
- (64) Bobrov, A. G.; Khweek, A. A.; Perry, R. D.; Parrish, K. D.; Fetherston, J. D.; Bearden, S. W. Functional Quorum Sensing Systems Affect Biofilm Formation and Protein Expression in *Yersinia Pestis*. In *The Genus Yersinia: From Genomics to Function*; Perry, R. D., Fetherston, J. D., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2007; pp 178–191.
- (65) Lee, J.; Zhang, L. The Hierarchy Quorum Sensing Network in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Protein Cell* **2015**, *6* (1), 26–41.
- (66) Greenberg, E. P.; Schuster, M. LuxR-Type Proteins in *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing: Distinct Mechanisms with Global Implications. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; ASM Press: Washington, DC, 2008; pp 133–144.
- (67) Wagner, V. E.; Frelinger, J. G.; Barth, R. K.; Iglewski, B. H. Quorum Sensing:

- Dynamic Response of *Pseudomonas Aeruginosa* to External Signals. *Trends Microbiol.* **2006**, *14* (2), 55–58.
- (68) Smith, K. M.; Bu, Y.; Suga, H. Induction and Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing by Synthetic Autoinducer Analogs. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (1), 81–89.
- (69) Cárcamo-Oyarce, G.; Lumjiaktase, P.; Kümmerli, R.; Eberl, L. Quorum Sensing Triggers the Stochastic Escape of Individual Cells from *Pseudomonas Putida* Biofilms. *Nat Commun* **2015**, *6* (5945).
- (70) Zhang, Z.; Pierson III, L. S. A Second Quorum-Sensing System Regulates Cell Surface Properties but Not Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas Aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (9), 4305–4315.
- (71) Pierson, L. S.; Pierson, E. A. Phenazine Antibiotic Production in *Pseudomonas Aureofaciens*: Role in Rhizosphere Ecology and Pathogen Suppression. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *136* (2), 101–108.
- (72) Maddula, V. S. R. K.; Zhang, Z.; Pierson, E. A.; Pierson, L. S. Quorum Sensing and Phenazines Are Involved in Biofilm Formation by *Pseudomonas Chlororaphis* (*Aureofaciens*) Strain 30-84. *Microb. Ecol.* **2006**, *52* (2), 289–301.
- (73) Venturi, V. Regulation of Quorum Sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30* (2), 274–291.
- (74) Mattiuzzo, M.; Bertani, I.; Ferluga, S.; Cabrio, L.; Bigirimana, J.; Guarnaccia, C.; Pongor, S.; Maraite, H.; Venturi, V. The Plant Pathogen *Pseudomonas Fuscovaginae* Contains Two Conserved Quorum Sensing Systems Involved in Virulence and Negatively Regulated by RsaL and the Novel Regulator RsaM. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13* (1), 145–162.
- (75) Elasri, M.; Delorme, S.; Lemanceau, P.; Stewart, G.; Laue, B.; Glickmann, E.; Oger, P. M.; Dessaux, Y. Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* Spp. than among Soilborne *Pseudomonas* Spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (3), 1198–1209.
- (76) Quiñones, B.; Pujol, C. J.; Lindow, S. E. Regulation of AHL Production and Its Contribution to Epiphytic Fitness in *Pseudomonas Syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2004**, *17* (5), 521–531.
- (77) Quiñones, B.; Dulla, G.; Lindow, S. E. Quorum Sensing Regulates Exopolysaccharide Production, Motility, and Virulence in *Pseudomonas Syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2005**, *18* (7), 682–693.
- (78) Taguchi, F.; Suzuki, T.; Inagaki, Y.; Toyoda, K.; Shiraishi, T.; Ichinose, Y. The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas Syringae* Pv. Tabaci 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. *J. Bacteriol.* **2010**, *192* (1), 117–126.
- (79) Dulla, G. F. J.; Krasileva, K. V.; Lindow, S. E. Interference of Quorum Sensing in *Pseudomonas Syringae* by Bacterial Epiphytes That Limit Iron Availability. *Environ. Microbiol.* **2010**, *12* (6), 1762–1774.
- (80) Wei, H.-L.; Zhang, L.-Q. Quorum-Sensing System Influences Root Colonization and Biological Control Ability in *Pseudomonas Fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2006**, *89* (2), 267–280.
- (81) Picot, L.; Abdelmoula, S. M.; Merieau, A.; Leroux, P.; Cazin, L.; Orange, N.; Feuilloley, M. G. *Pseudomonas Fluorescens* as a Potential Pathogen: Adherence to Nerve Cells. *Microbes Infect.* **2001**, *3* (12), 985–995.
- (82) El-Sayed, A. K.; Hothersall, J.; Thomas, C. M. Quorum-Sensing-Dependent Regulation of Biosynthesis of the Polyketide Antibiotic Mupirocin in *Pseudomonas Fluorescens* NCIMB 10586. *Microbiology* **2001**, *147* (8), 2127–2139.
- (83) Diggle, S. P.; Heeb, S.; Dubern, J. F.; Fletcher, M. P.; Crusz, S. A.; Williams, P.;

- Cámara, M. Quorum Sensing in Pseudomonads. In *Pseudomonas : model organism, pathogen, cell factory*; Rehm, B. H. A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim (Germany), 2008; pp 167–195.
- (84) Khan, S. R.; Mavrodi, D. V.; Jog, G. J.; Suga, H.; Thomashow, L. S.; Farrand, S. K. Activation of the Phz Operon of *Pseudomonas Fluorescens* 2-79 Requires the LuxR Homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-Homoserine Lactone Produced by the LuxI Homolog PhzI, and a Cis-Acting Phz Box. *J. Bacteriol.* **2005**, *187* (18), 6517–6527.
- (85) Laue, B. E.; Jiang, Y.; Chhabra, S. R.; Jacob, S.; Stewart, G. S. A. B.; Hardman, A.; Downie, J. A.; O’Gara, F.; Williams, P. The Biocontrol Strain *Pseudomonas Fluorescens* F113 Produces the *Rhizobium* Small Bacteriocin, N-(3-Hydroxy-7-Cis-Tetradecenyl)Homoserine Lactone, via HdtS, a Putative Novel N-Acylhomoserine Lactone Synthase. *Microbiology* **2000**, *146* (10), 2469–2480.
- (86) Cui, X.; Harling, R.; Mutch, P.; Darling, D. Identification of N-3-Hydroxyoctanoyl-Homoserine Lactone Production in *Pseudomonas Fluorescens* 5064, Pathogenic to Broccoli, and Controlling Biosurfactant Production by Quorum Sensing. *Eur. J. Plant Pathol.* **2005**, *111* (4), 297–308.
- (87) Martins, M. L.; Pinto, U. M.; Riedel, K.; Vanetti, M. C. D.; Mantovani, H. C.; de Araújo, E. F. Lack of AHL-Based Quorum Sensing in *Pseudomonas Fluorescens* Isolated from Milk. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45* (3), 1039–1046.
- (88) Liu, H.; Srinivas, S.; He, X.; Gong, G.; Dai, C.; Feng, Y.; Chen, X.; Wang, S. Quorum Sensing in *Vibrio* and Its Relevance to Bacterial Virulence. *J. Bacteriol. Parasitol.* **2013**, *4* (3), 1000172.
- (89) Purohit, A. A.; Johansen, J. A.; Hansen, H.; Leiros, H.-K. S.; Kashulin, A.; Karlsen, C.; Smalås, A.; Haugen, P.; Willassen, N. P. Presence of Acyl-Homoserine Lactones in 57 Members of the Vibrionaceae Family. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115* (3), 835–847.
- (90) Manukhov, I. V.; Khrul’nova, S. A.; Baranova, A.; Zavl’gelsky, G. B. Comparative Analysis of the Lux Operons in *Aliivibrio Logei* KCh1 (a Kamchatka Isolate) and *Aliivibrio Salmonicida*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (15), 3998–4001.
- (91) Fidopiastis, P. M.; von Boletzky, S.; Ruby, E. G. A New Niche for *Vibrio Logei*, the Predominant Light Organ Symbiont of Squids in the Genus *Sepioloa*. *J. Bacteriol.* **1998**, *180* (1), 59–64.
- (92) Bjelland, A. M.; Sørum, H.; Tegegne, D. A.; Winther-Larsen, H. C.; Willassen, N. P.; Hansen, H. LitR of *Vibrio Salmonicida* Is a Salinity-Sensitive Quorum-Sensing Regulator of Phenotypes Involved in Host Interactions and Virulence. *Infect. Immun.* **2012**, *80* (5), 1681–1689.
- (93) Hansen, H.; Purohit, A. A.; Leiros, H.-K. S.; Johansen, J. A.; Kellermann, S. J.; Bjelland, A. M.; Willassen, N. P. The Autoinducer Synthases LuxI and AinS Are Responsible for Temperature-Dependent AHL Production in the Fish Pathogen *Aliivibrio Salmonicida*. *BMC Microbiol.* **2015**, *15* (1), 69.
- (94) Lunder, T.; Sørum, H.; Holstad, G.; Steigerwalt, A. G.; Mowinckel, P.; Brenner, D. J. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Vibrio Viscosus* Sp. Nov. and *Vibrio Wodanis* Sp. Nov. Isolated from Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) with “Winter Ulcer”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50 Pt 2* (2), 427–450.
- (95) Austin, B.; Zhang, X. H. *Vibrio Harveyi*: A Significant Pathogen of Marine Vertebrates and Invertebrates. *Lett Appl Microbiol* **2006**, *43*.
- (96) Hammer, B.; Bassler, B. L. Signal Integration in the *Vibrio Harveyi* and *Vibrio Cholerae* Quorum-Sensing Circuits. In *Chemical Communication among Bacteria*; Winans, S. C., Bassler, B. L., Eds.; American Society of Microbiology: Washington

- DC: ASM Press, 2008; pp 323–332.
- (97) Swaminath Srinivas, H. L.; Guoli Gong, X. H. Quorum Sensing in *Vibrio* and Its Relevance to Bacterial Virulence. *J. Bacteriol. Parasitol.* **2013**, *04* (03).
- (98) Yang, Q.; Defoirdt, T. Quorum Sensing Positively Regulates Flagellar Motility in Pathogenic *Vibrio Harveyi*. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17* (4).
- (99) Gode-Potratz, C. J.; McCarter, L. L. Quorum Sensing and Silencing in *Vibrio Parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (16), 4224–4237.
- (100) Wang, L.; Zhou, D.; Mao, P.; Zhang, Y.; Hou, J.; Hu, Y.; Li, J.; Hou, S.; Yang, R.; Wang, R.; Qiu, J. Cell Density- and Quorum Sensing-Dependent Expression of Type VI Secretion System 2 in *Vibrio Parahaemolyticus*. *PLoS One* **2013**, *8* (8), e73363.
- (101) Milton, D. L.; Chalker, V. J.; Kirke, D.; Hardman, A.; Cámara, M.; Williams, P. The LuxM Homologue VanM from *Vibrio Anguillarum* Directs the Synthesis of N-(3-Hydroxyhexanoyl)Homoserine Lactone and N-Hexanoylhomoserine Lactone. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*.
- (102) Croxatto, A.; Pride, J.; Hardman, A.; Williams, P.; Cámara, M.; Milton, D. L. A Distinctive Dual-Channel Quorum-Sensing System Operates in *Vibrio Anguillarum*. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52* (6), 1677–1689.
- (103) Rui, H.; Liu, Q.; Ma, Y.; Wang, Q.; Zhang, Y. Roles of LuxR in Regulating Extracellular Alkaline Serine Protease A, Extracellular Polysaccharide and Mobility of *Vibrio Alginolyticus*. **2008**.
- (104) García-Aljaro, C.; Eberl, L.; Riedel, K.; Blanch, A. R. Detection of Quorum-Sensing-Related Molecules in *Vibrio Scophthalmi*. *BMC Microbiol.* **2008**, *8* (1), 1–11.
- (105) Valiente, E.; Bruhn, J. B.; Nielsen, K. F.; Larsen, J. L.; Roig, F. J.; Gram, L.; Amaro, C. *Vibrio Vulnificus* Produces Quorum Sensing Signals of the AHL-Class. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *69* (1), 16–26.
- (106) Tan, W.-S.; Yunos, N. Y. M.; Tan, P.-W.; Mohamad, N. I.; Adrian, T.-G.-S.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Characterisation of a Marine Bacterium *Vibrio Brasiliensis* T33 Producing N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing Molecules. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14* (7), 12104–12113.
- (107) Thompson, F. L.; Li, Y.; Gomez-Gil, B.; Thompson, C. C.; Hoste, B.; Vandemeulebroecke, K.; Rupp, G. S.; Pereira, A.; De Bem, M. M.; Sorgeloos, P.; Swings, J. *Vibrio Neptunius* Sp. Nov., *Vibrio Brasiliensis* Sp. Nov. and *Vibrio Xuii* Sp. Nov., Isolated from the Marine Aquaculture Environment (Bivalves, Fish, Rotifers and Shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53* (1), 245–252.
- (108) De Decker, S.; Reynaud, Y.; Saulnier, D. First Molecular Evidence of Cross-Species Induction of Metalloprotease Gene Expression in *Vibrio* Strains Pathogenic for Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* Involving a Quorum Sensing System. *Aquaculture* **2013**, *392–395*, 1–7.
- (109) Le Roux, F.; Binesse, J.; Saulnier, D.; Mazel, D. Construction of a *Vibrio Splendidus* Mutant Lacking the Metalloprotease Gene *vsm* by Use of a Novel Counterselectable Suicide Vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (3), 777–784.
- (110) Girard, L.; Blanchet, É.; Intertaglia, L.; Baudart, J.; Stien, D.; Suzuki, M.; Lebaron, P.; Lami, R. Characterization of N-Acyl Homoserine Lactones in *Vibrio Tasmaniensis* LGP32 by a Biosensor-Based UHPLC-HRMS/MS Method. *Sensors (Basel)*. **2017**, *17* (4).

11. ANEXO 2
(Anexo a la Introducción)





La Nanotecnología aplicada a la interferencia con el *quorum sensing* (QS) es una disciplina en auge. La siguiente Tabla recoge una revisión de la bibliografía existente sobre el uso de nanosistemas con aplicaciones en *quorum quenching* (QQ), incluyendo nanopartículas a base de metales, óxidos metálicos y metaloides, así como nanomateriales de naturaleza lipídica y a base de polímeros sintéticos y naturales (ver Epígrafe 1.6.1.4 de la **Introducción**).



Tabla 2. Nanosistemas dirigidos a la inhibición del QS

Nanosistema	Método de preparación y características fisicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés y aplicación potencial	Refs.
(a) NPs metálicas, de óxidos metálicos y metaloides						
NPs de plata (Ag NPs) decoradas con aminocelulosa y acilasa	Reducción en solución acuosa y autoensamblaje "capa por capa" (LbL) de la cubierta de aminocelulosa y acilasa Tamaño: 30-35 nm Potencial ζ : -29.97 mV	(1) <i>C. violaceum</i> CV026, (2) <i>P. aeruginosa</i>	A dosis sub-letales: Hidrólisis de AHLs e inhibición de la producción de violaceína (1). Inhibición de la formación de biopelículas (2)	MIC = 1.25×10^8 NPs/mL (2). Alteración de la morfología celular.	Alteración de la membrana externa y pérdida de material citoplasmático. Biocompatibilidad mejorada gracias a la incorporación de aminocelulosa	1
Ag NPs	Fabricación biogénica en extractos de corteza de <i>Crataeva nurvala</i> Tamaño: 15.2 ± 1.01 nm	(1) <i>C. violaceum</i> MTCC-2656, (2) <i>P. aeruginosa</i> cepas clínicas	A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de violaceína, biopelículas, piocianina, proteasa y hemolisina	MIC = 30 μ g/mL (2)	Aplicación potencial: Tratamiento de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>	2

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de plata y dióxido de titanio	Método sol-gel Tamaño: 6-7 nm	<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de violaceína y biopelículas. Alteración de los niveles de AHLs	Actividad bacteriostática [NPs]=100-1500 µg/mL. Actividad bactericida [NPs] ≥2000 µg/mL	Aplicación potencial: Nanomateriales para el empaquetamiento y preservación de alimentos.	3
AgNPs	Fabricación biogénica en extractos de raíces de <i>Vetiveria zizanioides</i> Tamaño: 78.53 nm Potencial ζ: -28.1 mV	<i>S. marcescens</i> PS1, cepa clínica	A dosis sub-letales: Atenuación de la producción de prodigiosina, proteasa, lipasa y exopolisacárido. Inhibición de formación de biopelículas. Reducción de la transcripción de los genes de factores de virulencia. Reducción de hidrofobicidad celular. Inhibición de la motilidad tipo "swarming".	MIC= 4 µg/mL	Potencial aplicación: Inhibición de biopelículas en el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por <i>S. marcescens</i> . Alternativa a los antibióticos clásicos	4

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
AgNPs	<p>Fabricación biogénica en extractos de hojas de <i>Piper betle</i></p> <p>Tamaño: 14-48 nm</p>	<p>(1) <i>C. violaceum</i> 12472, (2) <i>P. aeruginosa</i> PAO1</p>	<p>A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de violaceína (1). Reducción de la producción de pirocianina, elastasa y biopelículas (2). Inhibición de la motilidad de nado y tipo "swarming" (2).</p>	<p>MIC= 12.5 (2), 25 (1) µg/mL</p>	<p>Predicción <i>in silico</i> de elevados grados de interacción del eugenol derivado del extracto de <i>P. betle</i> y el sitio activo de las proteínas LasR, MvfR y LasI. Potencial aplicación: Tratamiento de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>.</p>	<p>5</p>
Ag NPs	<p>Síntesis biogénica en extractos de hojas de <i>Cymbopogon citratus</i></p> <p>Tamaño: 32 nm</p>	<p><i>S. aureus</i></p>	<p>Inhibición de la formación de biopelículas</p>	<p>—</p>	<p>Aplicación potencial: Eliminación de biopelículas</p>	<p>6</p>

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés Refs.	Refs.
AgNPs	Fabricación biogénica en micelios de <i>Rhizopus arrhizus</i> Tamaño: ~28 nm	(1) <i>C. violaceum</i> 12472, (2) <i>C. violaceum</i> CV026, (3) <i>P. aeruginosa</i>	A dosis no tóxicas: Inhibición de la producción de violaceína (1,2). Disminución de la expresión de genes de virulencia (3). Erradicación de biopelículas, proteasa, plicianina, y exopolisacárido (3). Inhibición de la motilidad de nado y tipo "swarming" (3). Reducción de la producción de AHLs (3).	Sin efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano ([AgNPs]=25 µg/mL). Cambios en la morfología celular ([AgNPs]=25 µg/mL). Toxicidad ([AgNPs]=50 µg/mL)	Capacidad de internalización celular y de mejorar la efectividad del antibiótico tobramicina en la eliminación de biopelículas maduras y resistentes a SDS.	7
Ag NPs (a) y nanotubos de carbono de pared simple (b)	Reducción en solución acuosa (a). Método de descarga de arco (b) Tamaño: 20 nm (a) -1.4 nm (b)	(1) <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000, (2) <i>P. stewartii</i>	A dosis sub-letales: Reducción de los niveles de AHLs (1a, 1b)	MICa = ~ 1 µg/mL, MICb = ~ 200 µg/mL	Aplicación potencial: Alteración de los mecanismos de señalización por AHLs en bacterias Gram negativas.	8

Nanosistema	Método de preparación y características fisicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
AgNPs	Tamaño: 8.3 nm	(1) <i>E. coli</i> AB1157, (2) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (3) <i>Serratia proteamaculans</i> 94	Inhibición de la formación de biopelículas (1,2)	MIC= 0.5 - 8.0 µg/mL	Las dianas. LuxI y LuxR no parecen entrañar un riesgo potencial al desarrollo de resistencias.	9
Nanocables de plata (SNWs)	Proceso de poliol en presencia de etilenglicol Tamaño: -200-250 nm	(1) <i>Bacillus subtilis</i> NCIM 2063, (2) <i>E. coli</i> NCIM 3931, (3) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472, (4) <i>P. aeruginosa</i> NCIM 2948	Reducción de la síntesis de violaceína (3). Reducción de la formación de biopelículas (4).	No significativa (1-4)	Aplicación potencial: Tratamiento de biopelículas e infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos clásicos	10

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de oro (AuNPs)	Fabricación biogénica en micelios del hongo <i>Laccaria fraterna</i> Tamaño: 79.69 nm	<i>P. aeruginosa</i>	Reducción del desarrollo de microcolonias y alteración de la estructura de biopelículas. Inhibición de la producción de pirocianina	No significativa	Aplicación potencial: Alternativa a los antibióticos clásicos para el tratamiento de infecciones agudas y crónicas causadas por <i>P. aeruginosa</i>	11
Au NPs decoradas con lactonasa AiiA	Reducción en solución acuosa Tamaño: 10-30 nm	(1) <i>Proteus spp.</i> , cepas clínicas resistentes (2) <i>C. violaceum CV026</i> , (3) <i>C. violaceum ATCC 12472</i>	Reducción de la producción de exopolisacárido (1). Inhibición de biopelículas (1). Hidrólisis de C6-HSL (2,3)	—	Baja toxicidad en macrófagos. Aplicación potencial: Inhibición de la formación de biopelículas en patógenos multirresistentes del tracto urinario	12

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
AuNPs decoradas con una bicapa lipídica de fosfatidilcolina y cargadas con gentamicina	<p>Reducción en solución acuosa en presencia de fosfatidilcolina</p> <p>Tamaño: ~180 nm Potencial ζ: -24.7 mV</p>	<p>(1) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (2) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114, (3) <i>S. aureus</i> ATCC 29213, (4) <i>E. coli</i> O157:H7, (5) <i>Salmonella typhimurium</i> SL1344</p>	<p>Inhibición de la formación de biopelículas y erradicación de biopelículas preformadas.</p>	<p>MIC= 32 (1), 16 (2), 1 (3), 2 (4), 2 (5) $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Mejora de la efectividad del antibiótico para erradicar biopelículas. Liberación controlada de gentamicina. Baja toxicidad en macrófagos. Potencial para ser dirigidas a bacterias intracelulares en macrófagos infectados.</p>	13
NPs de óxido de Zinc (ZnO NPs)	<p>Fabricación biogénica en extractos de semillas de <i>Butea monosperma</i></p> <p>Tamaño: 25 nm</p>	<p><i>P. aeruginosa</i>, cepas clínicas resistentes y cepa referencia PAO1</p>	<p>A dosis sub-letales: Reducción de la producción de piocianina, proteasa y hemolisina</p>	<p>MIC = 1600-3200 $\mu\text{g/mL}$</p>	<p>Aplicación potencial: Tratamiento de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i>.</p>	14

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
ZnO NPs	<p>Fabricación biogénica en extractos de hojas de <i>Ochradenus baccatus</i></p> <p>Tamaño: 16.02 nm</p>	<p>(1) <i>C. violaceum</i> ATCC 12472, (2) <i>E. coli</i> ATCC 25922, (3) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (4) <i>K. pneumoniae</i> ATCC700603, (5) <i>S. marcescens</i> ATCC13880, (6) <i>L. monocytogenes</i></p>	<p>Inhibición de la formación de biopelículas (1-6). Reducción de la producción de violaceína (1), prodigiosina (5), alginato (3) y exopolisacárido (1-6). Reducción de la capacidad de "swarming" (1-6)</p>	<p>MIC = 50 (2), 100 (5,6), 200 (1, 4), 400 (3) µg/mL</p>	<p>Baja toxicidad en ratones. Capacidad para unirse a la albúmina sérica humana sin cambiar la estructura. Aplicación potencial: Inhibición de la virulencia de patógenos resistentes a antibióticos y prevención de la contaminación de alimentos.</p>	15

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
ZnO NPs	<p>Formulación comercial (Sigma (St. Louis, MO, USA)</p> <p>Tamaño: 65 ± 17 nm Potencial ζ: -11.1 ± 1.65 mV</p>	<p>Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>: (1)INP-37, (2)INP-42, (3) INP-58M, (4) INP-57M, (5) INP-58R, (6) 5U, (7) INP-42R; cepas ambientales: (8) M10, (9) ID4365, (10) IGB83, (11) 148; cepas referencia (12) PA14 y (13) PA01</p>	<p>Reducción de la producción de elastasa (1-8, 10-13), pirocianina (2,-8, 10-13) y biopelículas (1-3, 5-13).</p>	<p>Reducción del crecimiento ≤20 % ([NP]= 1 mmol.l⁻¹)</p>	<p>La actividad anti-QS se mantiene en mutantes de la cepa PA01 carentes de los sistemas LasR, RhIR y PhzM, así como cepas PA01 resistentes al galio y a la furanona C-30. Aplicación potencial: Control de virulencia dirigida al regulador Czcr de cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes en infecciones nosocomiales.</p>	16

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
ZnO NPs	Fabricación biogénica, en extractos de semillas de <i>Nigella sativa</i> Tamaño: ~24 nm	(1) <i>C. violaceum</i> CV026, (2) <i>C. violaceum</i> 12472, (3) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (4) <i>L. monocytogenes</i> , cepas reporteras de actividad β -galactosidasa: (5) <i>E. coli</i> MG4/Pkdt17, (6) <i>E. coli</i> pEAL08-2	A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de violaceína (1,2). Inhibición de la producción elastasa, quitinasa, piocianina, alginato (3) y exopolisacárido (3-6). Reducción de la transcripción de <i>lasB</i> y <i>pqsA</i> (5,6). Reducción de la motilidad tipo "swarming" (1-6). Inhibición de formación de biopelículas y disrupción de biopelículas pre-formadas (1-6)	MIC = 128 (3), 256 (5, 6), 512 (1,2,4) $\mu\text{g}/\text{mL}$	Reducción del crecimiento bacteriano en modelos de contaminación de alimentos (1-6). Aplicación potencial: Desarrollo de materiales de empaquetamiento y preservación de alimentos.	17
NPs de dióxido de silicio modificadas con β -ciclodextrina (Si-NPs)	Conjugación entre los grupos -COOH de Si-NPs funcionalizadas y los grupos -OH de la β -ciclodextrina Tamaño: 50 nm	<i>A. fischeri</i> JB10	Reducción de la bioluminiscencia. Reducción de la transcripción de los genes <i>luxA</i> y <i>luxR</i>	No significativa	Mejora de la actividad QQ de la β -ciclodextrina. Aplicación potencial: Secuestro de AHLs.	18

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de selenio (SeNPs) conjugadas superficialmente con polifenoles de la miel	Formación de NPs por reducción en presencia de polifenoles. Tamaño: 13.5 ± 1.10 nm	(1) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (2) <i>C. violaceum</i> CV026, (3) <i>C. violaceum</i> CV12472, (4) cepa reportera de actividad β-galactosidasa <i>A. tumefaciens</i> NT1	A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de biopelículas (1). Reducción de la producción de exoproteasa, elastasa, piocianina y rhamnolípidos (1). Reducción de la transcripción de genes de formación de biopelículas y factores de virulencia (1). Inhibición de la motilidad tipo "swarming" (1). Inhibición de la producción de violaceína (2,3), inhibición de la respuesta de QS mediada por TraR-OddHL (4).	MIC= 10 (3) and 15 (1) µg/mL	Mejora de la cicatrización de heridas infectadas por <i>P. aeruginosa</i> PAO1. Predicción <i>in silico</i> de interacción de los polifenoles de la miel en el sitio activo de LasR. Aplicación potencial: Optimización de los perfiles de solubilidad, estabilidad y bioactividad de compuestos con actividad QQ dirigida al regulador LasR.	19

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de selenio (SeNPs; a) y telurio (TeNPs; b)	Reducción en solución acuosa en presencia de hidroxietilcelulosa. Tamaño: 90 ± 10 nm (a) 125 ± 40 nm (b)	(1) <i>C. violaceum</i> ATCC12472, (2) <i>C. violaceum</i> CV026, (3) <i>P. aeruginosa</i>	Inhibición de la producción de violaceína (1a, 1b, 2b). Reducción y alteración de la estructura de biopelículas maduras (3a,3b)	No significativa	Aplicación potencial: Interferencia con la producción y percepción de señales de QS.	20
(b) NPs lipídicas						
Liposomas para la liberación de ciprofloxacina y farnesol	Método de deshidratación-rehidratación. Tamaño: 536.8 ± 21 nm Potencial ζ: -0.11 mV	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Inhibición de la formación y alteración estructural de biopelículas.	Inhibición de la actividad metabólica y reducción de la viabilidad celular en las biopelículas. Alteración de la estructura celular y pérdida de material intracelular	Liberación controlada de ciprofloxacina y farnesol. Aplicación potencial: Tratamiento de infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con fibrosis quística.	21

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
Liposomas cargados con curcumina	Dispersión en película fina y extrusión de solvente. Tamaño: 159.3 ± 6.8 nm Potencial ζ : -39 ± 2.7 mV	(1) <i>Aeromonas sobria</i> , cepas biosensoras de AHLs (2) <i>C. violaceum</i> CV026, (3) <i>A. tumefaciens</i> A136,	A dosis sub-letales: Alteración del perfil de AHLs (1). Inhibición de la producción de violaceína (2) y <i>B</i> -galactosidasa (3). Reducción de la motilidad (1). Inhibición de producción de proteasas, sideróforos y biopelículas (1).	MIC= 400 (2), 420 (1), 460 (3) $\mu\text{g/mL}$	Predicción <i>in silico</i> de interacción entre la curcumina y LuxI. Aplicación potencial: Liberación dirigida de moléculas con capacidad QQ.	22
Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) cargadas con una molécula inhibidora de QS	Homogeneización en caliente Tamaño: < 100 nm Potencial ζ : entre -15 y -35 mV	<i>P. aeruginosa</i> PA14	Inhibición de la producción de pirocianina	No significativa	Liberación controlada y baja toxicidad en modelos pulmonares. Penetración en mucina. Potencial aplicación: nebulización pulmonar de compuestos inhibidores de QS.	23

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
Liposomas cargados con bismuto-etanoditol y tobramicina	Dispersión en película lipídica fina y extrusión de solvente Tamaño: 907.3 ± 40.1 nm	(1) <i>P. aeruginosa</i> PA-489122, cepas clínicas, (2) <i>S. aureus</i> ATCC 29213, (3) <i>A. tumefaciens</i> A136(pCF218)(pCF372) (Ti-), cepas biosensoras	A dosis sub-letales: Reducción de la producción de AHLs (1) y de la respuesta mediada por AHLs (3). Reducción de la actividad lipasa, quitinasa y proteasa LasA (1).	MIC= 1 µg/mL	Reducción de la la respuesta inflamatoria en un modelo animal. Aplicación potencial: Tratamiento de infecciones pulmonares crónicas de <i>P. aeruginosa</i> .	24
(b) NPs a base de polímeros sintéticos						
NPs de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)-xilitol	Evaporación de solvente Tamaño: 106.8-140.8 nm Potencial ζ: +30 mV	(1) <i>S. aureus</i> (ATCC 6538), (2) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Reducción de la formación de biopelículas (1,2)	Reducción de la viabilidad de las células inmersas en biopelículas (1,2)	Liberación de xilitol dependiente del pH. Aplicación potencial: Eliminación de biopelículas asociadas a heridas crónicas.	25

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de polietilenglicol (PEG)-PLGA cargadas con rutósido y benzamida	Emulsión de aceite en agua y evaporación de solvente. Tamaño: 285 ± 6 nm Potencial ζ : -17.6 ± 0.6 mV	(1) <i>S. aureus</i> MTCC 96, (2) <i>P. aeruginosa</i> MTCC 2488	A dosis sub-letales: Reducción de la producción de exopolisacárido y alteración de la estructura de las biopelículas (1,2)	MIC = 180 (1), 160 (2) $\mu\text{g/mL}$	Capacidad de liberación controlada. Baja toxicidad. Aplicación potencial: Tratamiento de biopelículas de patógenos resistentes.	26
NPs de núcleo de vitamina E y cubierta de polistireno-PEG, cargadas con autoinductor CAI-1	Nanoprecipitación flash: autoensamblaje de copolímeros de bloque sobre un núcleo lipofílico, y estabilización con una cubierta en cepillo de PEG Tamaño: 112 ± 1.7 nm	Cepa reportera de bioluminiscencia <i>V. cholerae</i> WN1102 $\Delta\text{cqsA}\Delta\text{luxQ/pBB1}$	Inducción de la bioluminiscencia. Inhibición de la producción de biopelículas.	No significativa	Penetración a través de la mucosa. Aplicación potencial: Liberación dirigida de compuestos anti-QS en la mucosa gastrointestinal en infecciones de <i>V. cholerae</i> .	27

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
Micelas poliméricas de Poloxamer 407	Autoensamblaje de las micelas en cultivos bacterianos Tamaño: 17.8 - 23.4 nm	(1) <i>S. marcescens</i> AS-1, (2) <i>S. marcescens</i> AS-1S, mutante carente de sintasa de AHL	Inhibición de la producción de prodigiosina mediada por AHL (1)	—	Capacidad de secuestro de AHL durante el autoensamblaje de las micelas en cultivos. Aplicación potencial: Eliminación de AHLs. Liberación de autoinductores o análogos de los mismos.	28
Nanogeles con impresión molecular y capacidad hidrolítica	Síntesis en fase sólida e inmovilización de la huella molecular análoga al estado de transición de la C6-HSL en un polímero de ácido metacrílico. Tamaño: 204 ± 4 nm	—	Capacidad <i>in vitro</i> de reconocimiento molecular de la C6-HSL en la cavidad impresa en las NPs, la cual estabiliza el estado de transición de la AHL y resulta en la hidrólisis de la misma	—	Aplicación potencial: Secuestro y degradación de AHLs de forma análoga a una lactonasa artificial.	29

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
Dendrímeros de poli(ε-lisina)	Síntesis de péptidos de fase sólida	(1) <i>P. aeruginosa</i> PAO1, (2) <i>P. aeruginosa</i> PAO-MW1	A dosis sub-letales: Inhibición de la formación de biopelículas (1,2). Reducción de la producción de pirocianina dependiente de <i>rhl</i> y <i>pqs</i> (2). Reducción de la actividad estafilolítica dependiente de LasA (1).	MIC= 14x10 ³ µg/mL	Elevada capacidad de penetración en biopelículas e internalización celular	30
(b) NPs a base de biopolímeros						
NPs de quitosano y tripolifosfato de sodio (CS-TPP NPs) cargadas con ácido ferúlico	Gelificación iónica Tamaño: 215.55 nm	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	A dosis sub-letales: Reducción de la producción de pirocianina y elastasa LasA. Alteración de la motilidad de nado y tipo "swarming". Inhibición de la producción de biopelículas, exopolisacárido y ramnolípidos. Reducción de la hidrofobicidad celular	MIC = 1000 µg/mL	Liberación controlada de ácido ferúlico. Aplicación potencial: Mejora de la efectividad de compuestos con actividad QQ frente a bacterias patógenas.	31

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de CS-TPP cargadas con kaempferol	Gelificación iónica Tamaño: 192.27±13.6 nm Potencial ζ : entre +18.5 y +38.1 mV	<i>C. violaceum</i> CV026	Inhibición de la producción de violaceína	—	Liberación controlada de kaempferol. Aplicación potencial: Descontaminación de superficies y tratamiento de infecciones bacterianas.	32
NPs de CS-TPP cargadas con <i>trans</i> -cinamaldehído	Gelificación iónica Tamaño: 208.12 nm	(1) <i>P. aeruginosa</i> PAO1	A dosis sub-letales: Inhibición de la producción de pirocianina, exopolisacárido y ramnolípidos. Disminución de la actividad estafilolítica mediada por LasA y la hidrofobicidad superficial. Inhibición de la motilidad de nado y tipo "swarming" y la formación de biopelículas.	MIC= 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A dosis sub-letales: disminución de la tasa de crecimiento	Liberación controlada de <i>trans</i> -cinamaldehído. Aplicación potencial: Mejora del perfil de efectividad de compuestos con actividad QQ.	33

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de CS-TPP y β -ciclodextrina cargadas con quercetina	Gelificación iónica Tamaño: 250-600 nm Potencial ζ : entre +31 y +40 mV	Cepa reportera fluorescente <i>E. coli</i> pSB1A3-Bba_T9002	Reducción de la fluorescencia mediada por LuxR-AHL	Reducción del crecimiento bacteriano que es más acusada (entre ~20-88%) a mayor grado de desacetilación del quitosano y mayor carga de quercetina	La β -ciclodextrina mejora la solubilidad de la quercetina y su liberación controlada. Aplicación potencial: Secuestro de AHLs	34
Nanocápsulas de CS cargadas con quercetina y baicaleína	Adsorción del CS a una nanoemulsión oleosa, por interacción electrostática entre el CS y la lecitina Tamaño: entre -185 y -194 nm Potencial ζ : entre ~+47.6 y ~+48.4 mV	Cepa reportera fluorescente <i>E. coli</i> pSB1A3-Bba_T9002	Inhibición de la fluorescencia mediada por LuxR-AHL. Inhibición de la formación de biopelículas	No significativa	Actividad QQ mejorada y menor toxicidad con respecto a los flavonoides en forma libre. Aplicación potencial: Liberación controlada de compuestos de QQ.	35

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
Nanocápsulas de CS	Adsorción del CS a una nanoemulsión oleosa. Tamaño: entre ~114 y ~155 nm Potencial ζ : ~+50 mV	Cepa reportera fluorescente <i>E. coli</i> pSB1A3-Bba_T9002	Inhibición de la fluorescencia mediada por LuxR-AHL	A dosis sub-letales: Agregación bacteriana, definida por una relación estequiométrica entre el número de nanocápsulas y la densidad de bacterias. Alteración de la carga eléctrica y alteración morfológica superficial de <i>E. coli</i> por interacción con las nanocápsulas.	Capacidad para encapsular y liberar AHLs. Aplicación potencial: Interferencia con el QS de manera dependiente de la densidad bacteriana.	36
Nanocápsulas de CS (CS NCs) cargadas con trans-cinamaldehído (CA)	Adsorción del CS a una nanoemulsión oleosa. Tamaño: ~167 nm Potencial ζ : ~+42 mV	Cepa reportera fluorescente <i>E. coli</i> pSB1A3-Bba_T9002	Inhibición de la fluorescencia mediada por LuxR-AHL	No significativa	Liberación controlada de CA. Aplicación potencial: Liberación controlada de compuestos de QQ.	37

Nanosistema	Método de preparación y características físicoquímicas	Cepa bacteriana	Actividad QQ	Actividad antimicrobiana	Otros hallazgos de interés	Refs.
NPs de alginato modificadas con un inhibidor de QS (QSI) y cargadas con ciprofloxacina (CIP)	Nanoprecipitación <i>in situ</i> Tamaño: 179 nm Potencial ζ : -44.8 mV	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Disrupción de biopelículas maduras. Reducción de la viabilidad celular en las biopelículas. Inhibición de la formación de biopelículas en un modelo de infección con queratinocitos y un modelo animal ex vivo de infección de la piel	No significativa en NPs sin antibiótico. MIC NPs ALGQSI CIP= 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Liberación controlada dependiente del pH. Aplicación potencial: Liberación combinada de antibióticos y agentes anti-QS para el tratamiento de patógenos multirresistentes	38

11.1. REFERENCIAS

- (1) Ivanova, A.; Ivanova, K.; Tied, A.; Heinze, T.; Tzanov, T. Layer-By-Layer Coating of Aminocellulose and Quorum Quenching Acylase on Silver Nanoparticles Synergistically Eradicate Bacteria and Their Biofilms. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (24), 2001284.
- (2) Ali, S. G.; Ansari, M. A.; Khan, H. M.; Jalal, M.; Mahdi, A. A.; Cameotra, S. S. Crataeva Nurvala Nanoparticles Inhibit Virulence Factors and Biofilm Formation in Clinical Isolates of Pseudomonas Aeruginosa. *J. Basic Microbiol.* **2017**, *57* (3), 193–203.
- (3) Naik, K.; Kowshik, M. Anti-Quorum Sensing Activity of AgCl-TiO₂ Nanoparticles with Potential Use as Active Food Packaging Material. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117* (4), 972–983.
- (4) Ravindran, D.; Ramanathan, S.; Arunachalam, K.; Jeyaraj, G. P.; Shunmugiah, K. P.; Arumugam, V. R. Phytosynthesized Silver Nanoparticles as Antiquorum Sensing and Antibiofilm Agent against the Nosocomial Pathogen Serratia Marcescens: An in Vitro Study. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *124* (6), 1425–1440.
- (5) Shah, S.; Gaikwad, S.; Nagar, S.; Kulshrestha, S.; Vaidya, V.; Nawani, N.; Pawar, S. Biofilm Inhibition and Anti-Quorum Sensing Activity of Phytosynthesized Silver Nanoparticles against the Nosocomial Pathogen Pseudomonas Aeruginosa. *Biofouling* **2019**, *35* (1), 34–49.
- (6) Masurkar, S. A.; Chaudhari, P. R.; Shidore, V. B.; Kamble, S. P. Effect of Biologically Synthesised Silver Nanoparticles on Staphylococcus Aureus Biofilm Quenching and Prevention of Biofilm Formation. *IET Nanobiotechnology* **2012**, *6* (3), 110–114.
- (7) Singh, B. R.; Singh, B. N.; Singh, A.; Khan, W.; Naqvi, A. H.; Singh, H. B. Mycofabricated Biosilver Nanoparticles Interrupt Pseudomonas Aeruginosa Quorum Sensing Systems. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 1–14.
- (8) Mohanty, A.; Tan, C. H.; Cao, B. Impacts of Nanomaterials on Bacterial Quorum Sensing: Differential Effects on Different Signals. *Environ. Sci. Nano* **2016**, *3* (2), 351–356.
- (9) Radzig, M. A.; Nadochenko, V. A.; Koksharova, O. A.; Kiwi, J.; Lipasova, V. A.; Khmel, I. A. Antibacterial Effects of Silver Nanoparticles on Gram-Negative Bacteria: Influence on the Growth and Biofilms Formation, Mechanisms of Action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2013**, *102*, 300–306.
- (10) Wagh, M. S.; Patil, R. H.; Thombre, D. K.; Kulkarni, M. V.; Gade, W. N.; Kale, B. B. Evaluation of Anti-Quorum Sensing Activity of Silver Nanowires. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (8), 3593–3601.
- (11) Samanta, S.; Singh, B. R.; Adholeya, A. Intracellular Synthesis of Gold Nanoparticles Using an Ectomycorrhizal Strain EM-1083 of Laccaria Fraterna and Its Nanoanti-Quorum Sensing Potential Against Pseudomonas Aeruginosa. *Indian J. Microbiol.* **2017**, *57* (4), 448–460.
- (12) Vinoj, G.; Pati, R.; Sonawane, A.; Vaseeharan, B. In Vitro Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles Coated with Functional Acyl Homoserine Lactone Lactonase Protein from Bacillus Licheniformis and Their Antibiofilm Activity against Proteus Species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (2), 763–771.
- (13) Mu, H.; Tang, J.; Liu, Q.; Sun, C.; Wang, T.; Duan, J. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 1–9.
- (14) Ali, S. G.; Ansari, M. A.; Alzohairy, M. A.; Alomary, M. N.; Jalal, M.; Alyahya, S.;

- Asiri, S. M. M.; Khan, H. M. Effect of Biosynthesized ZnO Nanoparticles on Multi-Drug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Antibiotics* **2020**, *9* (5).
- (15) Al-Shabib, N. A.; Husain, F. M.; Hassan, I.; Khan, M. S.; Ahmed, F.; Qais, F. A.; Oves, M.; Rahman, M.; Khan, R. A.; Khan, A.; Hussain, A.; Alhazza, I. M.; Aman, S.; Noor, S.; Ebaid, H.; Al-Tamimi, J.; Khan, J. M.; Al-Ghadeer, A. R. M.; Khan, M. K. A.; Ahmad, I. Biofabrication of Zinc Oxide Nanoparticle from *Ochradenus Baccatus* Leaves: Broad-Spectrum Antibiofilm Activity, Protein Binding Studies, and In Vivo Toxicity and Stress Studies. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*, 8612158.
- (16) García-Lara, B.; Saucedo-Mora, M. Á.; Roldán-Sánchez, J. A.; Pérez-Eretza, B.; Ramasamy, M.; Lee, J.; Coria-Jimenez, R.; Tapia, M.; Varela-Guerrero, V.; García-Contreras, R. Inhibition of Quorum-Sensing-Dependent Virulence Factors and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Pseudomonas Aeruginosa* Strains by ZnO Nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61* (3), 299–305.
- (17) Al-Shabib, N. A.; Husain, F. M.; Ahmed, F.; Khan, R. A.; Ahmad, I.; Alsharaeh, E.; Khan, M. S.; Hussain, A.; Rehman, M. T.; Yusuf, M.; Hassan, I.; Khan, J. M.; Ashraf, G. M.; Alsahme, A.; Al-Ajmi, M. F.; Tarasov, V. V.; Aliev, G. Biogenic Synthesis of Zinc Oxide Nanostructures from *Nigella Sativa* Seed: Prospective Role as Food Packaging Material Inhibiting Broad-Spectrum Quorum Sensing and Biofilm. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 36761.
- (18) Miller, K. P.; Wang, L.; Chen, Y. P.; Pellechia, P. J.; Benicewicz, B. C.; Decho, A. W. Engineering Nanoparticles to Silence Bacterial Communication. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (189).
- (19) Prateeksha; Singh, B. R.; Shoeb, M.; Sharma, S.; Naqvi, A. H.; Gupta, V. K.; Singh, B. N. Scaffold of Selenium Nanovectors and Honey Phytochemicals for Inhibition of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Formation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 93.
- (20) Gómez-Gómez, B.; Arregui, L.; Serrano, S.; Santos, A.; Pérez-Corona, T.; Madrid, Y. Selenium and Tellurium-Based Nanoparticles as Interfering Factors in Quorum Sensing-Regulated Processes: Violacein Production and Bacterial Biofilm Formation. *Metallomics* **2019**, *11* (6), 1104–1114.
- (21) Bandara, H. M. H. N.; Herpin, M. J.; Kolacny, D.; Harb, A.; Romanovicz, D.; Smyth, H. D. C. Incorporation of Farnesol Significantly Increases the Efficacy of Liposomal Ciprofloxacin against *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in Vitro. *Mol. Pharm.* **2016**, *13* (8), 2760–2770.
- (22) Ding, T.; Li, T.; Wang, Z.; Li, J. Curcumin Liposomes Interfere with Quorum Sensing System of *Aeromonas Sobria* and in Silico Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–16.
- (23) Nafee, N.; Husari, A.; Maurer, C. K.; Lu, C.; De Rossi, C.; Steinbach, A.; Hartmann, R. W.; Lehr, C. M.; Schneider, M. Antibiotic-Free Nanotherapeutics: Ultra-Small, Mucus-Penetrating Solid Lipid Nanoparticles Enhance the Pulmonary Delivery and Anti-Virulence Efficacy of Novel Quorum Sensing Inhibitors. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 131–140.
- (24) Alhariri, M.; Omri, A. Efficacy of Liposomal Bismuth-Ethanedithiol-Loaded Tobramycin after Intratracheal Administration in Rats with Pulmonary *Pseudomonas Aeruginosa* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (1), 569 LP – 578.
- (25) Anjum, A.; Chung, P.-Y.; Ng, S.-F. PLGA/Xylitol Nanoparticles Enhance Antibiofilm Activity via Penetration into Biofilm Extracellular Polymeric Substances. *RSC Adv.* **2019**, *9* (25), 14198–14208.
- (26) Deepika, M. S.; Thangam, R.; Sundarraj, S.; Sheena, T. S.; Sivasubramanian, S.; Kulandaivel, J.; Thirumurugan, R. Co-Delivery of Diverse Therapeutic Compounds

- Using PEG-PLGA Nanoparticle Cargo against Drug-Resistant Bacteria: An Improved Anti-Biofilm Strategy. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (1), 385–399.
- (27) Lu, H. D.; Spiegel, A. C.; Hurley, A.; Perez, L. J.; Maisel, K.; Ensign, L. M.; Hanes, J.; Bassler, B. L.; Semmelhack, M. F.; Prud'Homme, R. K. Modulating *Vibrio Cholerae* Quorum-Sensing-Controlled Communication Using Autoinducer-Loaded Nanoparticles. *Nano Lett.* **2015**, *15* (4), 2235–2241.
- (28) Okano, C.; Kato, N. Inhibition and Induction of Quorum Sensing Using Complexes between N -Acylhomoserine Lactone and Self-Assembled Polymer Micelles. *Chem. Lett.* **2015**, *44* (11), 1544–1546.
- (29) Garcia Lopez, J.; Piletska, E. V.; Whitcombe, M. J.; Czulak, J.; Piletsky, S. A. Application of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Degradation of the Bacterial Autoinducer: N-Hexanoyl Homoserine Lactone. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (18), 2664–2667.
- (30) Issa, R.; Meikle, S. T.; James, S.; Cooper, I. R. Poly(ϵ -Lysine) Dendrons as Modulators of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26* (5).
- (31) Pattnaik, S.; Barik, S.; Muralitharan, G.; Busi, S. Ferulic Acid Encapsulated Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Attenuate Quorum Sensing Regulated Virulence and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *IET Nanobiotechnology* **2018**, *12* (8), 1056–1061. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5114>.
- (32) Ilk, S.; Sağlam, N.; Özgen, M.; Korkusuz, F. Chitosan Nanoparticles Enhances the Anti-Quorum Sensing Activity of Kaempferol. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *94*, 653–662.
- (33) Pattnaik, S.; Barik, S.; Macha, C.; Chiranjeevi, P. V.; Siddhardha, B. Anti Quorum Sensing and Anti Biofilm Efficacy of Cinnamaldehyde Encapsulated Chitosan Nanoparticles against *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *LWT* **2018**, *97*, 752–759.
- (34) Thanh Nguyen, H.; Goycoolea, F. Chitosan/Cyclodextrin/TPP Nanoparticles Loaded with Quercetin as Novel Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* **2017**, *22* (11), 1975.
- (35) Omwenga, E. O.; Hensel, A.; Shitandi, A.; Goycoolea, F. M. Chitosan Nanoencapsulation of Flavonoids Enhances Their Quorum Sensing and Biofilm Formation Inhibitory Activities against an E.Coli Top 10 Biosensor. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *164*, 125–133.
- (36) Qin, X.; Engwer, C.; Desai, S.; Vila-Sanjurjo, C.; Goycoolea, F. M. An Investigation of the Interactions between an E. Coli Bacterial Quorum Sensing Biosensor and Chitosan-Based Nanocapsules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *149*, 358–368.
- (37) Qin, X.; Kräft, T.; Goycoolea, F. M. Chitosan Encapsulation Modulates the Effect of Trans-Cinnamaldehyde on AHL-Regulated Quorum Sensing Activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *169*, 453–461.
- (38) Singh, N.; Romero, M.; Travanut, A.; Monteiro, P. F.; Jordana-Lluch, E.; Hardie, K. R.; Williams, P.; Alexander, M. R.; Alexander, C. Dual Bioresponsive Antibiotic and Quorum Sensing Inhibitor Combination Nanoparticles for Treatment of *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms in Vitro and Ex Vivo. *Biomater. Sci.* **2019**, *7* (10), 4099–4111.



**12. ANEXO 3.
LOS RESULTADOS DE
ESTUDIOS PUBLICADOS
DE QUORUM SENSING
TAMBIÉN PUEDEN SER
DESCRITOS DESDE LA
TEORÍA DE LA PERCOLACIÓN***

* Una parte de los resultados mostrados en este Anexo han sido pre-publicados como *preprint* en el servidor en abierto para biología, bioRxiv como: Vila-Sanjurjo, C.^{1,2}, Engwer, C.¹, Qin, X.¹, Hembach, L.¹, Verdía-Cotelo³, T., Remuñán-López, C.², Vila-Sanjurjo, A.³ and F.M. Goycoolea¹. A single intracellular protein governs the critical transition from an individual to a coordinated population response during quorum sensing: Origins of primordial language. bioRxiv 074369; doi: <https://doi.org/10.1101/074369>

¹ Westfälische Wilhelms-Universität Münster. Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen, Schlossgarten 3, 48149 Münster, Germany.

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Vida, s/n, 15782 Santiago de Compostela Spain.

³ Grupo GIBE. Departamento de Biología Celular e Molecular, Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA). Universidade da Coruña. Campus Zapateira, s/n, 15071 A Coruña, Spain.



Basándonos en la aparente omnipresencia de la cinética de percolación en los procesos de *quorum sensing* (QS) estudiados en esta Tesis, así como en nuestro éxito a la hora de ajustar algunos datos publicados por otros autores a la función de percolación (**Capítulos 1, 4 y 5**), decidimos examinar la literatura del QS en busca de datos que permitiesen utilizar la función de percolación como modelo de ajuste del QS. En este Anexo aportamos evidencias adicionales que apoyan la idea de que los mecanismos de QS pueden ser descritos por medio de la teoría de la percolación. La **Tabla 1** resume la información más relevante de las fuentes de datos utilizadas para nuestros ajustes de percolación.

En primer lugar, centramos nuestra atención en experimentos clásicos de QS en los cuales se había estudiado el funcionamiento del circuito genético *luxR/luxI* en su hospedador natural, *Aliivibrio fischeri*. Kempner y Hanson ¹ analizaron la respuesta de *A. fischeri* por dos métodos diferentes: por un lado, midieron la bioluminiscencia *in vivo* (tiempo crítico de percolación, $t_c = 177.72$ min, puntos verdes en la **Figura 1A**) y por otro, los niveles de luciferasa ($t_c = 107.34$ min, puntos rojos en la **Figura 1A**). El mayor valor de t_c obtenido para la bioluminiscencia *in vivo* encaja con el lapso de tiempo esperado entre la entrada en funcionamiento del mecanismo de QS y la producción de la bioluminiscencia, el cual se debe a la expresión y maduración de los cinco genes involucrados en la bioluminiscencia ⁷. De manera similar a la producción de violaceína en la cepa biosensora *Chromobacterium violaceum* CV026 (**Capítulo 4**), no está del todo claro hasta qué punto el estallido de bioluminiscencia observado en *A. fischeri* es un reflejo de la cinética del proceso de QS precedente a la bioluminiscencia, de la de la propia bioluminiscencia, o de la convolución de ambas cinéticas. Por el contrario, el estallido de los niveles de la enzima luciferasa (puntos rojos en la **Figura 1A**) aporta una cinética mucho más próxima al proceso de QS precedente. El hecho de que tanto los niveles de enzima como los del producto de la reacción enzimática puedan ser ajustados a la función de percolación, sugiere que la dinámica de percolación observada refleja la naturaleza del proceso de QS.

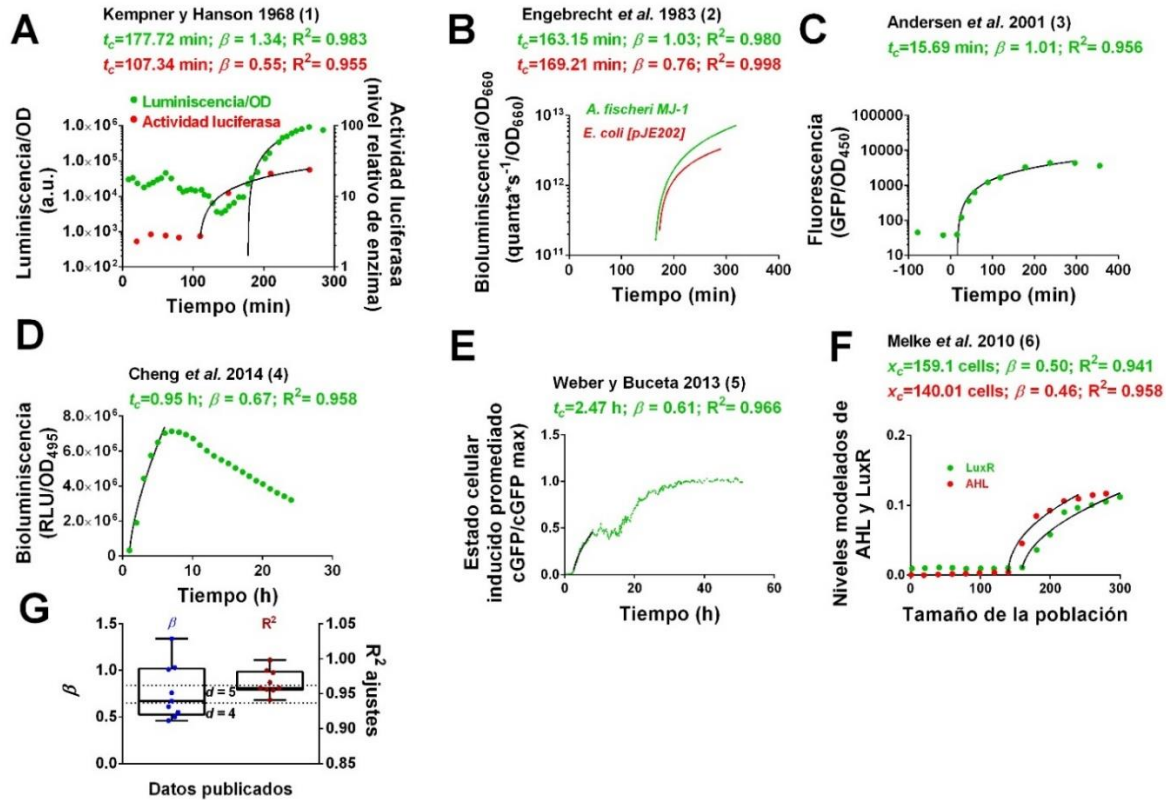


Figura 1. Ajustes a la función de percolación de respuestas de QS derivadas del circuito *lux* de *A. fischeri* publicadas en la literatura

Leyenda Figura 1: Ajustes a la función de percolación de respuestas de QS derivadas del circuito *lux* de *A. fischeri* publicadas en la literatura.

A. Ajuste de los resultados de Kempner y Hanson ¹ a la función de percolación. Luminiscencia normalizada por la densidad celular (verde) y actividad luciferasa (rojo) de la cepa salvaje de *A. fischeri*, con respecto al tiempo. Eje x = tiempo (min). Eje y izquierdo = Luminiscencia/OD₄₉₅ (RLU/OD₄₉₅). Eje y derecho = actividad luciferasa (nivel relativo de enzima). Círculos verdes y rojos: datos publicados, correspondientes a las Figuras 1 y 3 de Kempner y Hanson (*J Bacteriol.* 1968; 95(3):975-979. Permitido por la editorial ASM) ¹. Líneas sólidas: ajustes a la función de percolación.

B. Ajuste de los resultados de Engebrecht *et al.* ² a la función de percolación. Luminiscencia normalizada por la densidad de la cepa salvaje *A. fischeri* MJ-1 (verde) y de la cepa recombinante *E. coli* pJE202 (rojo), con respecto al tiempo. Eje x = tiempo (min). Eje y = bioluminiscencia/OD₆₀₀ (quanta x s⁻¹/OD₆₀₀). No se muestran los datos publicados, disponibles en la Figura 2 de Engebrecht *et al.* ². Líneas sólidas: ajustes a la función de percolación.

C. Ajuste de los resultados de Andersen *et al.* ³ a la función de percolación. Fluorescencia normalizada por la densidad de la cepa reportera *E. coli* MT102 portadora del plásmido pJBA132 en presencia de AHL 10 nM con respecto al tiempo. Eje x = Tiempo (min). Eje y = Fluorescencia/OD₄₅₀ (GFP/OD₄₅₀). Círculos verdes: datos publicados, correspondientes a la figura 3 de Andersen *et al.* (*Appl Environ Microbiol.* 2001;67(2):575-585. Permitido por la editorial ASM) ³. Línea sólida: ajuste a la función de percolación.

D. Ajuste de los resultados de Cheng *et al.* ⁴ a la función de percolación. Bioluminiscencia normalizada por la densidad con respecto al tiempo de la cepa reportera *E. coli* portadora del constructo pSB401. Eje x = tiempo (h). Eje y = bioluminiscencia/OD₄₉₅ (RLU/OD₄₉₅). Círculos verdes: datos publicados, correspondientes a la Figura 2 de Cheng *et al.* (*Sensors* 2014, 14(7), 12511-12522. Con licencia Creative Commons) ⁴. Línea sólida: ajuste a la función de percolación.

E. Ajuste de los resultados *in silico* de Weber y Buceta ⁵. Promedio de las trayectorias celulares individuales de un biosensor “mudo” simulado. Eje x = tiempo (h). Eje y = respuesta de QS normalizada, medida como cGFP/(cGFP máximo). Puntos verdes: datos publicados, correspondientes a la Figura 5 Weber y Buceta (*BMC Syst Biol* 7, 6 (2013). Con licencia Creative Commons) ⁵. Línea sólida: ajuste a la función de percolación.

F. Ajuste de los resultados *in silico* de Melke *et al.* ⁶. Niveles simulados de LuxR (verde) y AHL (rojo) con respecto al tamaño de la población. Eje x = concentración de especies AHL y LuxR en unidades arbitrarias (U.A.). Eje y = tamaño de la población (U.A.). Círculos verdes y rojos= datos publicados, correspondientes a la Figura 3 de Melke *et al.* (*PLoS Comput. Biol.* 2010, 6 (6), e1000819. Con licencia Creative Commons) ⁶. Línea sólida = ajuste a la función de percolación.

G. Gráfico de cajas y bigotes para la distribución de los valores del exponente de percolación β y de R^2 , obtenidos de los ajustes mostrados en A-F. Las líneas discontinuas muestran las posiciones de los valores universales de β para $d=4$ y $d=5$. La caja se extiende hasta los percentiles 25° y 75°. Los bigotes indican los valores máximo y mínimo. Los datos individuales se muestran como nube de puntos. La **Tabla 1** muestra detalles adicionales de los datos publicados.

En la **Figura 1B**, ajustamos los datos de Engebrecht *et al.*² obtenidos a partir de dos cepas bacterianas: la cepa salvaje de *A. fischeri* y una cepa de *Escherichia coli* portadora del circuito genético de QS de *A. fischeri*. En ambos casos, la respuesta de QS se produjo durante la fase exponencial del crecimiento² y pudo ser ajustada satisfactoriamente a la función de percolación, dando lugar a valores similares de t_c ; concretamente 163.15 min (línea verde) 169.21 (línea roja), para *A. fischeri* y *E. coli*, respectivamente. Estos resultados muestran que el mismo proceso percolativo observado en el sistema natural se puede engranar en un organismo heterólogo, como *E. coli*, en consonancia con nuestras propios resultados en el **Capítulo 1**. Mientras Engebrecht *et al.*² usaron una cepa de *E. coli* strain portadora del par intacto de genes *luxR* y *luxI*, *i.e.* células con habilidad tanto de “escucha” como de “habla”²; en sus trabajos, Andersen *et al.*³ y Cheng *et al.*⁴ hicieron uso de biosensores de QS basados en *E. coli* “mudos” (carentes del gen *luxI*), sistemas más próximos a nuestro biosensor (**Capítulo 1**). Los valores de t_c estimados a partir del ajuste de los datos de Andersen *et al.*³ y Cheng *et al.*⁴ a la función de percolación resultaron muy inferiores a los calculados para los datos de Engebrecht *et al.*², concretamente 15.69 (**Figura 1C**) y 57 min (0.95 h en la **Figura 1D**), respectivamente. Los menores valores de t_c se pueden explicar por la pérdida de necesidad en estos sistemas “mudos” de acumular señal de manera que el mecanismo de respuesta de QS se acelera en presencia de señal exógena. A pesar de esto, los valores de t_c son significativamente superiores a los estimados en el **Capítulo 1**. La causa más plausible para esta discrepancia es la diferencia entre el número de copias del plásmido en los sistemas de la **Figura 1C-D** de ~20 copias/célula (**Tabla 1**), frente a las ~200 copias/célula en nuestro biosensor (**Capítulo 1**). Esta diferencia traería como resultado niveles muy superiores de LuxR en las células de nuestro biosensor y un incremento concomitante de la fuerza de la “trampa de AHL”, descrita en el **Capítulo 1**.

También ajustamos a la función de percolación datos publicados de experimentos *in silico*. Por medio de un modelo estocástico, Weber y Buceta⁵ simularon la respuesta inducida por AHL en células virtuales

Tabla 1. Detalles experimentales de los datos publicados

Figuras	Respuesta medida	Temperatura	Organismo hospedador	Sistema genético	Número de copias del gen <i>luxR</i>	Número de Figura en la referencia original	Ref.
1A	Bioluminiscencia normalizada por la densidad (n.d.) vs. tiempo	24°C	Cepa salvaje <i>A. fischeri</i> .; probabl. <i>A. fischeri</i> ATCC®7744™ 7	Operón <i>lux</i> natural de <i>A. fischeri</i>	Copia única	Fig. 1; círculos vacíos	1
	Actividad Luciferasa vs. tiempo					Fig. 3; círculos vacíos	
1B	Bioluminiscencia (n.d) vs. OD ₆₀₀	Temperatura ambiente	Cepa salvaje <i>A. fischeri</i> MJ-1	Operón <i>lux</i> natural de <i>A. fischeri</i>	Copia única	Fig. 2; círculos y triángulos vacíos	2
		30 °C	Cepa recombinante <i>E. coli</i> ED8654 portadora del constructo pJE201	pJE202: plásmido paCYC184 portador del operón <i>lux</i> de <i>A. fischeri</i>	~20 copias/cél.		

Figuras	Respuesta medida	Temperatura	Organismo hospedador	Sistema genético	Número de copias del gen <i>luxR</i>	Número de Figura en la referencia original	Ref.
1C	Fluorescencia (n.d.) vs. tiempo tras la inducción	30°C	Cepa recombinante reportera de fluorescencia <i>E. coli</i> MT102, portadora del constructo pJBA132	pJBA132:Tc ^r ; pME6031- <i>luxR</i> -P _{luxI} -RBSII- <i>gfp</i> (ASV)-T ₀ -T ₁	~20 copias/cél.	Fig. 3A; círculos vacíos	3
1D	Bioluminiscencia (n.d.) vs. tiempo	28°C	Cepa recombinante reportera de bioluminiscencia <i>E. coli</i> , portadora del constructo pSB401	pSB401: plásmido paCYC184 portador del constructo <i>luxRluxI'</i> :: <i>luxCD ABE</i>	~20 copias/cél.	Fig. 2; círculos	4

Figuras	Respuesta medida	Temperatura	Organismo hospedador	Sistema genético	Número de copias del gen <i>luxR</i>	Número de Figura en la referencia original	Ref.
1E	Fracción de células que se encuentran por debajo o por encima de un umbral de expresión de GFP inducido por AHL. (cGFP/cGFPmax vs. tiempo)	—	Modelo estocástico <i>in silico</i> de la cepa recombinante <i>E.coli</i> MG1655-01S	Inserción cromosómica lux01 portadora de los genes <i>luxR</i> y <i>gfp</i>	Copia única	Figura 5; línea naranja	5
1F	Niveles modelados de AHL y LuxR vs. tamaño de población	—	Modelo <i>in silico</i> de síntesis y recepción de AHL controladas por LuxR	Circuito virtual: autoinducción con dos bucles de retro-alimentación positiva	—	Figura 3; cuadrados vacíos	6

“mudas” portadoras de una copia única del gen *luxR*. Los datos mostrados en **Figura 1E** se corresponden con el promedio de las trayectorias de inducción de QS de las células individuales ⁵.

El buen ajuste de estos datos a la función de percolación (**Figura 1E**) nos sugiere que el hecho de que las respuestas de QS se puedan describir desde la teoría de la percolación podría interpretarse como la convergencia de trayectorias individuales en un comportamiento coordinado emergente de la población de células. Por último, hemos encontrado que los datos de las simulaciones deterministas de Melke *et al.* ⁶ podían asimismo ajustarse a percolación (**Figura 1F**). Estos autores simularon los niveles de LuxR y AHL en una población virtual de células que crecían en forma de colonias sésiles ⁶.

El gráfico de cajas mostrado en la **Figura 1G** muestra la distribución de los exponentes β y los valores R^2 estimados a partir de los ajustes a la función de percolación de la **Figura 1A-F**. La mayoría de los valores de β se sitúan en un rango próximo a los valores universales correspondientes a las dimensiones $d=4$ and $d=5$ ⁸. La elucidación del significado de estos resultados escapa del alcance de esta Tesis, dadas las enormes diferencias en el diseño de los experimentos compilados en la **Figura 1**. Sin embargo, esta tendencia podría apuntar a la existencia de algunos principios fundamentales inherentes a las respuestas de QS basadas en el operón *lux*, los cuales podrían ser explicados por medio de un análisis más profundo desde el marco de la teoría de la percolación.

En resumen, hemos mostrado que los datos publicados en la literatura concuerdan con nuestra observación de que los mecanismos de QS se aproximan a procesos de percolación. Estos resultados inspirarán el diseño de experimentos futuros encaminados a desentrañar las respuestas de QS a la luz de la teoría de la percolación.

12.1. METODOLOGÍA

El análisis de percolación de los datos publicados se llevó a cabo de acuerdo con el método explicado en el **Capítulo 4**. En el caso de los análisis de experimentos de bioluminiscencia, los cuales muestran una caída característica de la actividad luciferasa inmediatamente anterior al aumento exponencial (**Figura 1A y 1B** ^{1,2,9}), estos datos iniciales

fueron excluidos del ajuste. En todos los casos se emplearon las escalas utilizadas en los gráficos originales.

12.2. REFERENCIAS

- (1) Kempner, E. S.; Hanson, F. E. Aspects of Light Production by Photobacterium Fischeri. *J. Bacteriol.* **1968**, *95* (3), 975–979.
- (2) Engebrecht, J.; Nealson, K.; Silverman, M. Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from Vibrio Fischeri. *Cell* **1983**, *32*, 773–781.
- (3) Andersen, J. B.; Heydorn, A.; Hentzer, M.; Eberl, L.; Geisenberger, O.; Christensen, B. B.; Molin, S.; Givskov, M. Gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (2), 575–585.
- (4) Cheng, H. J.; Ee, R.; Cheong, Y. M.; Tan, W.-S.; Yin, W.-F.; Chan, K.-G. Detection of Quorum Sensing Activity in the Multidrug-Resistant Clinical Isolate Pseudomonas Aeruginosa Strain GB11. *Sensors (Basel)*. **2014**, *14* (7), 12511–12522.
- (5) Weber, M.; Buceta, J. Dynamics of the Quorum Sensing Switch: Stochastic and Non-Stationary Effects. *BMC Syst. Biol.* **2013**, *7* (1), 6.
- (6) Melke, P.; Sahlin, P.; Levchenko, A.; Jönsson, H. A Cell-Based Model for Quorum Sensing in Heterogeneous Bacterial Colonies. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (6), e1000819.
- (7) Hastings, J. W.; Riley, W. H.; Massa, J. The Purification Properties, and Chemiluminescent Quantum Yield of Bacterial Luciferase. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1473–1481.
- (8) Stauffer, D.; Aharony, A. Cluster Numbers. In *Introduction to Percolation Theory.*; Stauffer, D., Aharony, A., Eds.; London: UK Taylor & Francis Ltd., 1994; pp 15–59.
- (9) Nealson, K. H.; Platt, T.; Hastings, J. W. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *J. Bacteriol.* **1970**, *104* (1), 313–322.



13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

**13. DECLARACIONES:
CONFLICTO DE INTERESES,
USO DE IMÁGENES Y
CONTENIDO PUBLICADO**



CONFLICTO DE INTERESES:

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

USO DE IMÁGENES:

Las imágenes no originales incluidas en la tesis están apropiadamente citadas al pie de las figuras con referencia a la fuente original y a su copyright.

CONTENIDO PUBLICADO:

Una parte del contenido de esta tesis es una reproducción de publicaciones derivadas de la investigación predoctoral de la doctoranda. A continuación se especifican las secciones publicadas, junto con los criterios de calidad de las publicaciones:

Lista de publicaciones:

1. **Capítulos 1 y 4 y Anexo 3.** Incluyen resultados pre-publicados como *preprint* en el servidor bioRxiv, sin revisión por pares.
2. **Capítulo 2.** Está publicado como artículo de investigación en una revista revisada por pares.
3. **Capítulo 3.** Está publicado como artículo de investigación en una revista revisada por pares.

Título:

1. “A single intracellular protein governs the critical transition from an individual to a coordinated population response during quorum sensing: Origins of primordial language”.
2. “Effect of the ultrastructure of chitosan nanoparticles in colloidal stability, quorum quenching and antibacterial activities”.
3. “Covalently and ionically, dually crosslinked chitosan nanoparticles block quorum sensing and affect bacterial cell growth on a cell-density dependent manner”.

Año:

1. 2016
2. 2019
3. 2020

Revista:

1. bioRxiv, servidor de preprints para biología (sin revisión por pares).
2. Journal of Colloid and Interface Science
3. Journal of Colloid and Interface Science

Doi, Volumen, páginas y número de artículo:

1. doi: <https://doi.org/10.1101/074369>
2. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.05.075>, volumen 578, páginas 171-183
3. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.061>, volume 556, páginas 592-605

Contribución de la doctoranda a las publicaciones:

1. Conceptualización, metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos microbiológicos, racionalización e implementación de simulaciones *in silico*, exceptuando el diseño y desarrollo del algoritmo de las simulaciones, el cual fue desarrollado por el coautor Christoph Engwer y publicado como software de código abierto (<https://www.engwer.net/d/response.html>). Adquisición y análisis de datos, redacción del manuscrito original.
2. Conceptualización, metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos microbiológicos y de fabricación de nanopartículas. Adquisición y análisis de datos. Redacción del manuscrito original.
3. Conceptualización, metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos microbiológicos y de fabricación de nanopartículas. Adquisición y análisis de datos. Redacción del manuscrito original.

Índices de calidad:

1. N/A (*preprint* sin revisión por pares)
2. La revista donde fue publicado el Capítulo 2 presenta actualmente un índice de impacto de 7.489 (2019 Journal Citation Reports), un índice CiteScore de 13.6 (calculado por Scopus el 2 de marzo de 2021) y las siguientes posiciones en las siguientes categorías: cuartil 1 (Q1) en Biomateriales (SJR 2019 1.45) calculado por Scimago:
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=26950&tip=sid>)
3. La revista donde fue publicado el Capítulo 2 presenta actualmente un índice de impacto de 7.489 (2019 Journal Citation Reports), un índice CiteScore de 13.6 (calculado por Scopus el 2 de marzo de 2021) y las siguientes posiciones en las siguientes categorías: cuartil 1 (Q1) en Biomateriales (SJR 2019 1.45) calculado por Scimago:
<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=26950&tip=sid>), Posición 7/120

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

PERMISOS:

1. N/A (*preprint* sin revisión por pares, disponible en un servidor abierto)
2. La revista Journal of Colloid and Interface Science, perteneciente a la editorial Elsevier, donde se ha publicado el Capítulo 2, permite la reutilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis:



Effect of the ultrastructure of chitosan nanoparticles in colloidal stability, quorum quenching and antibacterial activities

Author: C. Vila-Sanjurjo, L. David, C. Remuñán-López, A. Vila-Sanjurjo, F.M. Goycoolea

Publication: Journal of Colloid and Interface Science

Publisher: Elsevier

Date: 15 November 2019

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

3. La revista Journal of Colloid and Interface Science, perteneciente a la editorial Elsevier, donde se ha publicado el Capítulo 3, permite la reutilización del artículo por parte de la autora como parte de su tesis:



Covalently and ionically, dually crosslinked chitosan nanoparticles block quorum sensing and affect bacterial cell growth on a cell-density dependent manner

Author: C. Vila-Sanjurjo, L. Hembach, J. Netzer, C. Remuñán-López, A. Vila-Sanjurjo, F.M. Goycoolea

Publication: Journal of Colloid and Interface Science

Publisher: Elsevier

Date: 15 October 2020

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>


BACK

CLOSE WINDOW

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Permisos para el uso de imágenes no originales:

Lámina 1-Introducción (pág. 13). Neelson *et al.* (*J Bacteriol.* 1970;104 (1):313-322. Permitido por Editorial ASM:



**AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY**

Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System
Author: Kenneth H. Neelson, Terry Platt, J. Woodland Hastings
Publication: Journal of Bacteriology
Publisher: American Society for Microbiology
Date: Oct 1, 1970
Copyright © 1970, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

CELINA VILA SANJURJO

Lámina 2-Introducción (pág. 18). Rémy *et al.* 64 (Front Pharmacol. 2018 Mar 7;9:203. Con licencia Creative Commons):

Copyright © 2018 Rémy, Mion, Plener, Elias, Chabrière and Daudé. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Lámina 6-Introducción (pág. 31). Liu *et al.* J Bacteriol Parasitol 2013, 4:3. Editorial: *Longdom Publishing S.L.*

Copyright

As a member of Publisher International Linking Association, PILA, Longdom Publishing follows the Creative Commons Attribution License and Scholars Open Access publishing policies. All the works published by Longdom Publishing are under the terms of the Creative Commons Attribution License. Most of the journals follows CC-BY and few journals follows the derivatives of CC-BY.

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Lámina 8-Introducción (pág. 59). Ostrowska-Czubenko *et al.* (*J Polym Res* **22**, 153 (2015). Con licencia Creative Commons

Rights and permissions

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

[Reprints and Permissions](#)

About this article



Check for
updates

Cite this article

Ostrowska-Czubenko, J., Gierszewska, M. & Pieróg, M. pH-responsive hydrogel membranes based on modified chitosan: water transport and kinetics of swelling. *J Polym Res* **22**, 153 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0786-3>

Rights and permissions

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 2.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[Reprints and Permissions](#)

About this article

Cite this article

Gallardo, M.J., Staforelli, J.P., Meza, P. *et al.* Characterization of *Chromobacterium violaceum* pigment through a hyperspectral imaging system. *AMB Expr* **4**, 4 (2014). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-4-4>

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Figure 3B-Chapter 4 (pág. 276). Lozano et al. (*MBio* 2020, 11 (3): e00948-20. Con licencia Creative Commons



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

A Chemical Counterpunch: *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 Produces Violacein in Response to Translation-Inhibiting Antibiotics

Author: Gabriel L. Lozano, Changhui Guan, Yanzhuan Cao, Bradley R. Borlee, Nichole A. Broderick, Eric V. Stabb, Jo Handelsman

Publication: mBio

Publisher: American Society for Microbiology

Date: May 19, 2020

Copyright © 2020, American Society for Microbiology

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

Lámina 2A-Discusión (pág. 308). Ferkinghoff-Borg y Sams 22 (*Mol. BioSyst.*, 2014, **10**, 103-109).
Publicado por The Royal Society of Chemistry. Con licencia Creative Commons

×

Size of quorum sensing communities

J. Ferkinghoff-Borg and T. Sams, *Mol. BioSyst.*, 2014, **10**, 103

DOI: 10.1039/C3MB70230H

This article is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence](#). Material from this article can be used in other publications provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

Reproduced material should be attributed as follows:

- For reproduction of material from NJC:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the RSC.
- For reproduction of material from PCCP:
[Original citation] - Published by the PCCP Owner Societies.
- For reproduction of material from PPS:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry (RSC) on behalf of the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and RSC.
- For reproduction of material from all other RSC journals:
[Original citation] - Published by The Royal Society of Chemistry.



13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Lámina 2B y Lámina 3C-Discusión (págs. 308 y 311). Kindler *et al.* 21 (*Sci Rep* **9**, 12077 (2019). Con licencia Creative Commons.

SPRINGER NATURE

Burst statistics in an early biofilm quorum sensing model: the role of spatial colony-growth heterogeneity

Author: Oliver Kindler et al

Publication: Scientific Reports

Publisher: Springer Nature

Date: Aug 19, 2019

Copyright © 2019, The Author(s)

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

Figura 1A-Anexo 3 (pág. 435). Kempner y Hanson (*J Bacteriol.* 1968; 95(3):975-979. Permitido por la editorial ASM



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Aspects of Light Production by *Photobacterium fischeri*

Author: E. S. Kempner, F. E. Hanson

Publication: Journal of Bacteriology

Publisher: American Society for Microbiology

Date: Mar 1, 1968

Copyright © 1968, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

BACK

CLOSE WINDOW

UNIVERSIDAD DE SANTO TOMÁS DE COMPOSTELA

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Figura 1C-Anexo 3 (pág. 435). Andersen *et al.* (*Appl Environ Microbiol.* 2001;67(2):575-585. Permitido por la editorial ASM



**AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY**

gfp-Based *N*-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication

Author: Jens Bo Andersen, Arne Heydorn, Morten Hentzer, Leo Eberl, Otto Geisenberger, Bjarke Bak Christensen, So/ren Molin, Michael Givskov

Publication: Applied and Environmental Microbiology

Publisher: American Society for Microbiology

Date: Feb 1, 2001

Copyright © 2001, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

CELINA VILA SANJURJO

Figura 1D-Anexo 3 (pág. 435). Cheng *et al.* (*Sensors* **2014**, *14*(7), 12511-12522. Publicado por la Editorial MDPI. Con licencia Creative Commons

Permissions

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI.

Figura 1E-Anexo 3 (pág. 435). Weber y Buceta (*BMC Syst Biol* **7**, 6 (2013). Con licencia Creative Commons

SPRINGER NATURE

Dynamics of the quorum sensing switch: stochastic and non-stationary effects

Author: Marc Weber et al

Publication: BMC Systems Biology

Publisher: Springer Nature

Date: Jan 16, 2013

Copyright © 2013, Weber and Buceta; licensee BioMed Central Ltd.

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Springer Nature](#)

13. Declaraciones:
Conflicto de intereses,
uso de imágenes y contenido publicado

Figura 1F-Anexo 3 (pág. 435). Melke *et al.* (*PLoS Comput. Biol.* **2010**, 6 (6), e1000819. Con licencia Creative Commons

Citation: Melke P, Sahlin P, Levchenko A, Jönsson H (2010) A Cell-Based Model for Quorum Sensing in Heterogeneous Bacterial Colonies. *PLoS Comput Biol* 6(6): e1000819. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000819>

Editor: Stanislav Shvartsman, Princeton University, United States of America

Received: January 31, 2010; **Accepted:** May 14, 2010; **Published:** June 17, 2010

Copyright: © 2010 Melke et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



**14. LISTAS
DE VERIFICACIÓN**

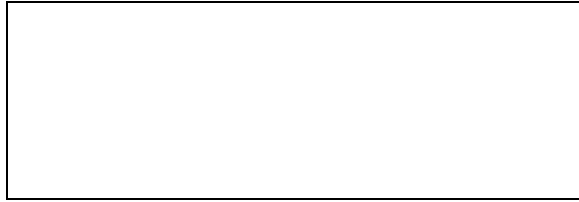


Lista de verificación de recomendaciones para **Tesis EDI saúde. GENERAL**

Sí-No-N/A		Página
Para todas las Tesis		
Sí	Declaración de potenciales conflictos de interés por parte del autor	445
Sí	Declaración sobre el origen y copyright de las figuras no originales y permiso en caso necesario. Incluirlos en el pie de cada figura no original.	445
Sí	Lista de adecuación estadística en caso de no cubrir ninguna de las otras tres checklist específicas.	454
Para Tesis que implican a seres humanos, sus muestras o sus datos de carácter personal		
N/A	Declaración sobre su aprobación por el comité de ética de la investigación	
N/A	Código de registro del estudio	
N/A	Copia del informe favorable	
N/A	Declaración de que los datos se basan en información anónima y por tanto no se necesita aprobación del comité de ética de la investigación	
N/A	Si el estudio es observacional, checklist STROBE	
Para Tesis que describen un ensayo clínico		
N/A	Declaración sobre su autorización por la Agencia Española de Medicamentos y productos sanitarios.	
N/A	Copia de la autorización	
N/A	Checklist CONSORT	
Para Tesis que usan células troncales humanas, embrionarias o inducidas		
N/A	Declaración sobre su autorización	
N/A	Referencia de la autorización	
N/A	Copia de la autorización	
Para Tesis que incluyen estudios con animales de experimentación		
N/A	Declaración de su autorización	
N/A	Número de la autorización del proyecto de experimentación animal	
N/A	Registro del centro de usuario autorizado si es español	
N/A	Copia del certificado de capacitación si los experimentos los ha hecho el doctorando	
N/A	Indicación de la persona, empresa o servicio que llevó a cabo el experimento en su caso	
N/A	Checklist ARRIVE	

Firma doctorando

14. Listas de verificación



Lista de verificación **análisis estadístico**

	Sí/No
Test utilizado	
Se definen claramente las comparaciones de interés	Sí
Se nombran las pruebas estadísticas que se aplican	Sí
Los métodos estadísticos se describen adecuadamente	Sí
Se justifica el porqué de los tests que se utilizan	Sí
Los tests cumplen con las asunciones de aplicación (normalidad, muestras pequeñas)	Sí
Se explican los ajustes para pruebas múltiples	Sí
Test detalles	
Se reporta el tamaño muestral (n) al inicio y para cada uno de los análisis	Sí
Se justifica el tamaño muestral	Sí
Se describe el nivel de error alfa	Sí
Las pruebas se definen como uni o bilaterales	Sí
Se describen los procedimientos de aleatorización u otros para intentar eliminar sesgos	N/A
Resumen de la estadística descriptiva	
Se establece la n para cada paquete de datos	Sí
Se describen las medidas de tendencia central (media, mediana)	Sí
Se describen las medidas de variabilidad (desvío estándar, rango, percentiles ...)	Sí
Se identifica lo que viene a continuación del \pm como error o desvío estándar	Sí
Extras	
Se define claramente cualquier método estadístico poco habitual o complejo	Sí
Se explican de forma clara la exclusión de observaciones	Sí
Se describen las discrepancias en el tamaño de los grupos	Sí
Se describen las transformaciones de los datos (logarítmica,)	Sí
Gráficos	
Se explica claramente cualquier distorsión o truncamiento de los datos	Sí
Se adjuntan barras de los errores o intervalos de confianza	Sí

Firma doctorando

14. Listas de verificación

