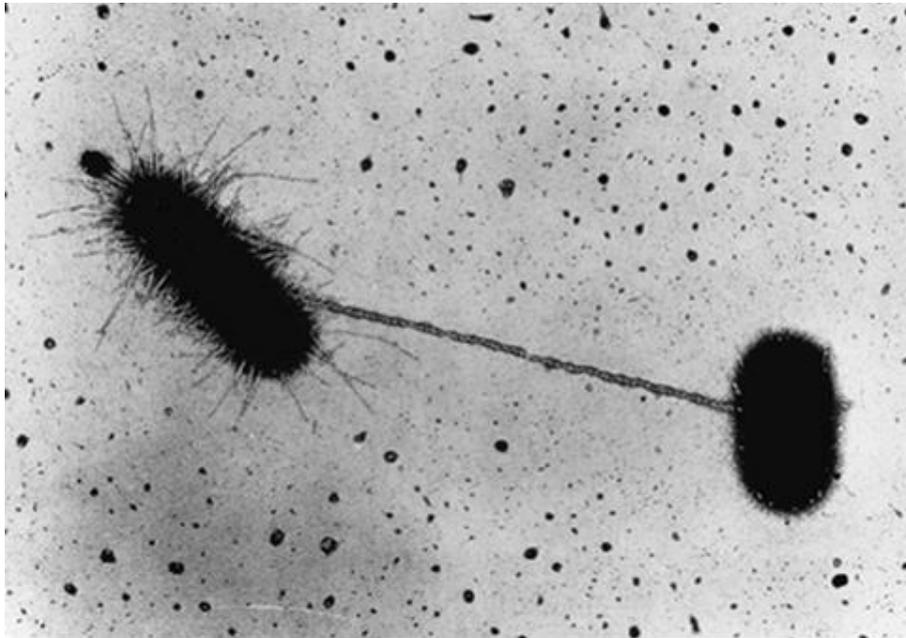


## Inhibición de la conjugación bacteriana como estrategia para prevenir la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos

### Inhibition of bacterial conjugation as a strategy to prevent the dissemination of antimicrobial resistance



Microfotografía electrónica en la que se muestra la formación de una pareja de acoplamiento durante la conjugación bacteriana. Tomada de Madigan *et al.*, 2015.

Trabajo de Fin de Grado.

**Sheila Viera Oval**

Tutorizado por Eduardo Pérez Roth.

Grado en Biología. Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Universidad de La Laguna. Junio 2022.

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>2</b>
1.1. Problemática de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos.....	2
1.1.1. Papel de la transferencia génica horizontal en la dispersión de las resistencias a los antibióticos.....	4
1.2. Necesidad de nuevos fármacos para luchar contra la resistencia a los microbianos.....	5
1.2.1. Nuevas estrategias.....	6
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>8</b>
2.1. Objetivo general.....	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
<b>3. Metodología.....</b>	<b>9</b>
3.1. Estrategia de búsqueda y criterios de selección bibliográfica.....	9
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>10</b>
4.1. Conjugación bacteriana.....	10
4.1.1. Sistema de secreción tipo IV.....	12
4.1.2. Potenciales dianas para la inhibición de la conjugación.....	14
4.2. Métodos para monitorizar la conjugación y evaluar posibles inhibidores...	16
4.2.1. Medición de la conjugación plasmídica empleando selección con antibióticos.....	16
4.2.2. Medición de la conjugación empleando genes reporteros fluorescentes..	16
4.3. Estudios de inhibición de la conjugación bacteriana “in vitro”.....	17
4.3.1. Uso de anticuerpos para la inhibición de la conjugación.....	17
4.3.2. Inhibidores de la conjugación derivados de plantas.....	18
4.3.3. Inhibición dirigida a la maquinaria de secreción.....	19
4.3.3.1. Inhibición de la formación del pili conjugativo.....	21
4.3.4. Ácidos grasos insaturados como inhibidores de las ATPasas conjugativas.....	21
4.4. Estudios de inhibición de la conjugación bacteriana “in vivo”.....	23
4.5. Perspectivas futuras.....	25
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Conclusions.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>28</b>

## **Resumen**

Los antibióticos son utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a dichos medicamentos se produce cuando las bacterias, que inicialmente eran sensibles a un determinado antibiótico, dejan de responder frente al mismo. Esto provoca que dichas bacterias no se eliminen con el tratamiento. Uno de los principales factores que contribuye de manera decisiva a la rápida dispersión de la resistencia, es la enorme capacidad que tienen las bacterias para compartir genes. Concretamente, los genes ubicados en plásmidos que confieren resistencia a los antimicrobianos pueden ser fácilmente transferidos mediante el proceso de conjugación bacteriana. Por tanto, intentar bloquear la conjugación se ha propuesto como una estrategia potencialmente útil para luchar contra la resistencia a los antibióticos. En este trabajo se planteó realizar una revisión bibliográfica para conocer los últimos avances encaminados a impedir la conjugación bacteriana. La mayor parte de los estudios se han realizado *in vitro* y se han descrito numerosos compuestos inhibidores de la conjugación. Para algunos de estos compuestos se ha podido identificar la diana molecular sobre la que actúan. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que evalúen la utilidad de dichos inhibidores en ambientes naturales.

**Palabras clave:** resistencia a antibióticos, plásmidos, conjugación, inhibidores.

## **Abstract**

Antibiotics are used to prevent and treat bacterial infections. Resistance to these drugs occurs when bacteria, which were initially sensitive to a particular antibiotic, stop responding to it. In this way, these bacteria are not eliminated with treatment. One of the main factors that decisively contributes to the rapid spread of resistance is the enormous capacity of bacteria to share genes. Specifically, genes located on plasmids that confer resistance to antimicrobials can be easily transferred through the process of bacterial conjugation. Therefore, attempting to block conjugation has been proposed as a potentially useful strategy to combat antibiotic resistance. A bibliographic review was proposed to assess the latest advances aimed at preventing bacterial conjugation. Most of the studies have been carried out *in vitro* and numerous conjugation inhibitor compounds have been described. For some of these compounds the molecular target has been identified. However, additional studies are needed to evaluate the usefulness of these inhibitors in natural environments.

**Keywords:** antibiotic resistance, plasmids, conjugation, inhibitors.

## 1. Introducción

### 1.1. Problemática de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos

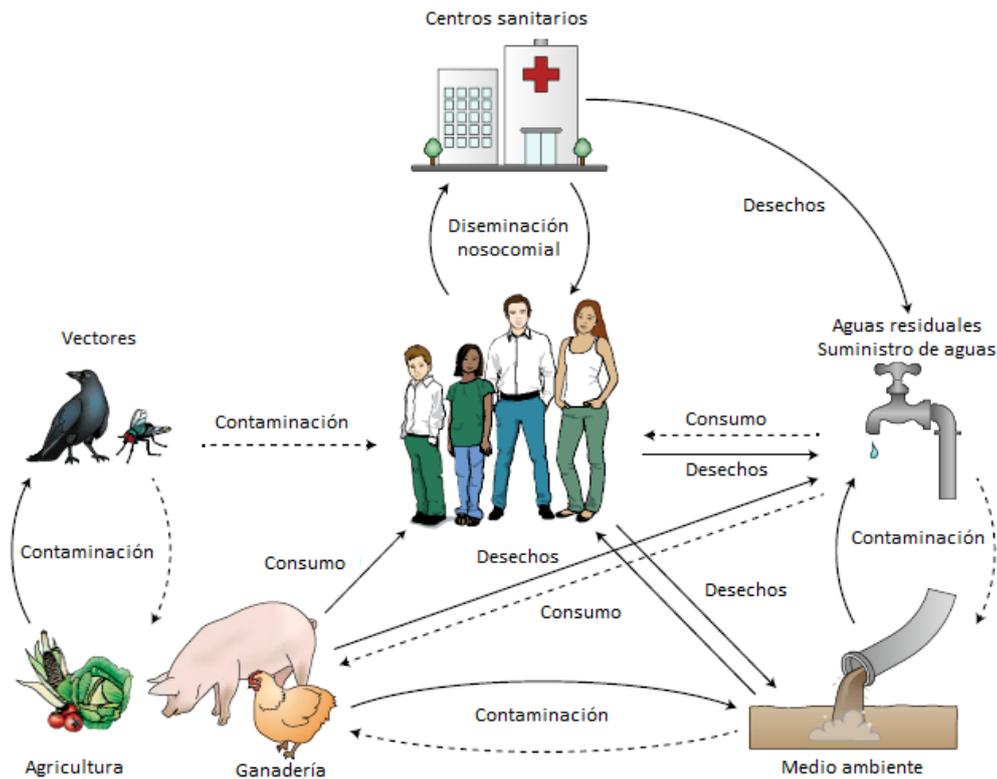
Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) “los antimicrobianos son compuestos empleados para la prevención y el tratamiento de enfermedades en humanos, animales y plantas. Incluyen los antibióticos, antivirales, antifúngicos y antiparásitos”.

El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en el siglo XX dio paso a la “Era de los antibióticos”. A partir de entonces y hasta el día de hoy, los antibióticos han ido adquiriendo gran relevancia. Sin embargo, las infecciones provocadas por bacterias resistentes a los antibióticos han ido en aumento en los últimos años. Estas bacterias resistentes son insensibles a la acción de los antibióticos, pudiendo multiplicarse y causar infecciones en su presencia. Concretamente, son preocupantes aquellas bacterias que han desarrollado resistencia frente a varios antibióticos simultáneamente, las denominadas bacterias multirresistentes o “superbacterias” (Wang *et al.*, 2020).

La aparición de organismos multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR) resulta alarmante. Los genes de resistencia (ARGs, del inglés *Antibiotic Resistance Genes*) suelen encontrarse en elementos genéticos móviles que pueden transferirse entre cepas de la misma especie, así como entre especies e incluso entre diferentes géneros con gran facilidad (Lerminiaux & Cameron, 2019; Walsh, 2018).

La OMS ha establecido la necesidad de incrementar la investigación para la búsqueda de nuevos tratamientos frente a una serie de bacterias de prioridad crítica, tales como *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, resistentes a los carbapenémicos; las enterobacterias, productoras de ESBL ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido), resistentes a los carbapenémicos como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Otras bacterias con prioridad elevada son *Enterococcus faecium*, resistente a la vancomicina; *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina; *Helicobacter pylori*, resistente a la claritromicina; *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.*, resistentes a las fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a la cefalosporina, y a las fluoroquinolonas. Otras bacterias resistentes también son *Streptococcus pneumoniae*, sin sensibilidad a la penicilina; *Haemophilus influenzae*, resistente a la ampicilina; *Shigella spp.*, resistente a las fluoroquinolonas. Por lo tanto, muchas de las enfermedades hoy en día consideradas comunes, pueden volverse mortales al no poseer fármacos eficaces para el tratamiento de

estas bacterias (Lerminiaux & Cameron, 2019). El problema de la resistencia a los antimicrobianos no solo afecta al ser humano, sino que también afecta a los animales y el medio ambiente. Por lo tanto, en los últimos años el problema de la resistencia a los antibióticos se aborda desde una perspectiva "*One-health*", en la que se tiene en consideración las interacciones entre los humanos, los animales y el medio ambiente (**Figura 1**) (Walsh, 2018).



**Figura 1.** Interacciones complejas de AMR “desde un punto de vista “*One-health*””. Esquema de las posibles vías de transmisión de los genes de resistencia a los antibióticos entre reservorios, humanos, ganadería, agricultura y medio ambiente. Las líneas discontinuas indican posibles vías de transmisión. Modificada de: Walsh, 2018.

Además del ambiente hospitalario, existen ambientes donde la resistencia a los antibióticos se propaga con facilidad. Esta dispersión está directamente relacionada con el agua potable, la gestión de residuos y el uso de antibióticos en la industria alimentaria. Algunas de las causas que contribuyen a la dispersión de los genes de resistencia son el uso de antibióticos en los piensos para promover el crecimiento, así como prevenir y tratar enfermedades; la utilización de antimicrobianos, como por ejemplo, los antifúngicos en la agricultura, para aumentar la productividad de las cosechas, pudiéndose transmitir estas resistencias a través de la cadena alimentaria; la presencia de antibióticos en aguas no

tratadas, bien residuales o procedentes de hospitales; el uso excesivo de medicamentos y su eliminación inadecuada por parte de la población (Larsson & Flach, 2021).

El uso inadecuado de los antibióticos ha propiciado la aparición de bacterias resistentes a estos, dificultando cada vez más el tratamiento de muchas enfermedades. Abordar esta problemática requiere la elaboración de planes de acción para concienciar a la población de la situación actual, mayor vigilancia clínica, uso óptimo de los antibióticos y un control de las aguas residuales no tratadas para poder actuar en respuesta a la evolución de estos organismos (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Cabezón *et al.*, 2017).

### **1.1.1. Papel de la transferencia génica horizontal en la dispersión de las resistencias a los antibióticos**

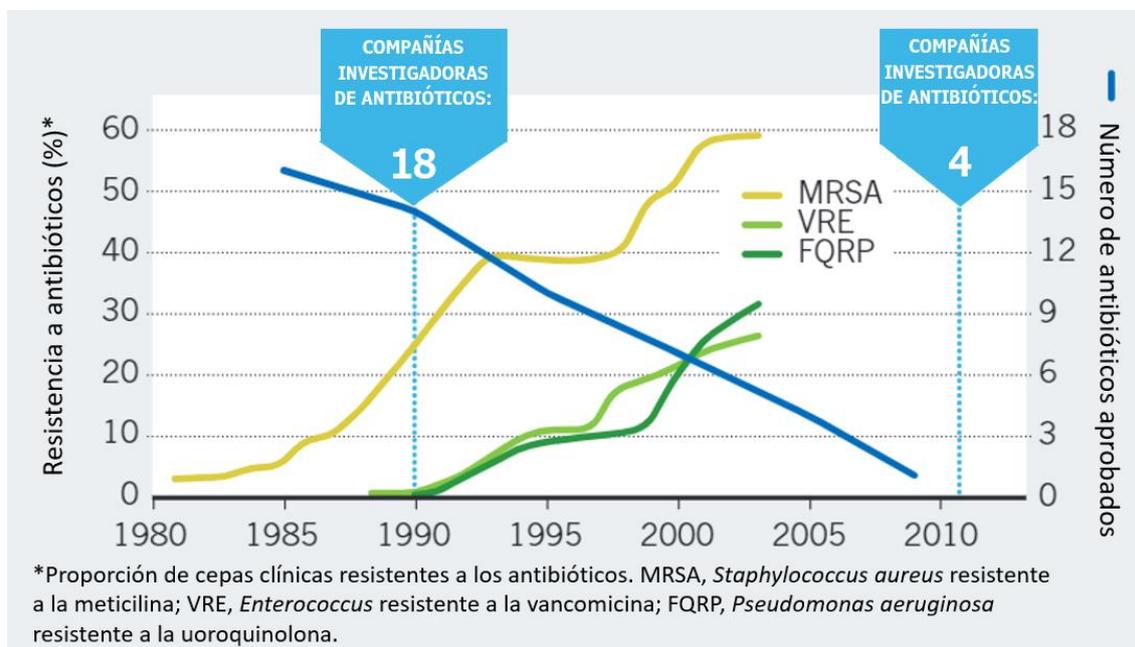
Las bacterias pueden modificar su material genético en respuesta al ambiente. Para ello emplean 3 mecanismos principales: mutaciones en genes asociados con el mecanismo de acción del fármaco, reordenamientos genéticos y, por último, adquisición de nuevo material genético a través de la transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*). Todas estas estrategias proporcionan al organismo un genoma más diverso y, por tanto, una mejor aptitud en condiciones desfavorables (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Munita & Arias, 2016).

La adquisición de nuevo material genético mediante la HGT es uno de los procesos más relevantes en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos. Ocurre principalmente mediante 3 procesos: la transformación, la transducción y la conjugación (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020). La conjugación es el proceso más importante en la diseminación de la resistencia a los antibióticos en el entorno hospitalario. Requiere el contacto físico entre la célula donadora y la receptora para permitir la transferencia de plásmidos (Munita & Arias, 2016).

La conjugación está mediada por elementos genéticos móviles (MGEs, del inglés, *Mobile Genetic Elements*). Los MGEs poseen genes encargados de codificar todas las proteínas necesarias para mediar el intercambio de genes entre bacterias o dentro de la misma. Entre estos podemos destacar los plásmidos y los transposones que suelen estar relacionados con organismos clínicamente relevantes. Los plásmidos son moléculas de ADN circulares y autorreplicantes que proporcionan mejor aptitud en situaciones adversas (como puede ser la presencia de antibióticos) a aquellos organismos que los poseen (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Munita & Arias, 2016).

## 1.2. Necesidad de nuevos fármacos para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos

En los últimos años, las bacterias resistentes a los antibióticos, especialmente las multirresistentes, han supuesto una gran amenaza para la medicina moderna y la salud pública. La causa principal es la facilidad que tienen estos organismos para evolucionar y contrarrestar el efecto de los fármacos. Además, el incremento de la resistencia ha ido en paralelo a una drástica caída del desarrollo de nuevos antibióticos en las últimas décadas (**Figura 2**). Esto se debe a múltiples factores, entre los que destacan la dificultad para descubrir y desarrollar nuevos fármacos eficaces y la rápida aparición de resistencias, que reduce drásticamente la utilidad de los mismos (Getino *et al.*, 2016).



**Figura 2.** El aumento de las resistencias a los antibióticos y la disminución de los equipos de investigación en los últimos años dedicados a la investigación en antibióticos. Modificada de: Cooper & Shlaes, 2011.

En vista de las dificultades que supone el desarrollo de nuevos antibióticos, se está intentando abordar esta problemática desde otros puntos de vista. La comunidad científica advierte de la necesidad de emplear nuevas estrategias destinadas al control de la aparición y diseminación de la resistencia a los antibióticos, que ayuden a controlar esta “pandemia silenciosa”.

### 1.2.1. Nuevas estrategias

En los últimos años ha quedado patente la necesidad de abordar el problema de la resistencia empleando nuevas estrategias, ya que el uso de antibióticos es cada vez más limitado. Se están evaluando múltiples estrategias novedosas, cuyos objetivos incluyen destruir las bacterias patógenas o sensibilizarlas de nuevo a los antibióticos existentes.

Actualmente se están probando algunas terapias con bacteriófagos que afectan y destruyen de forma específica a las bacterias patógenas. Los bacteriófagos se replican en el lugar de la infección para lisar a los patógenos, al contrario que los antibióticos que recorren todo el organismo, afectando a la microbiota del hospedador. Sin embargo, la resistencia a los fagos no resulta tan preocupante, estos son capaces de mutar para contrarrestar la resistencia de las bacterias a las que destruyen. Los fagos pueden ofrecernos diferentes aplicaciones como, por ejemplo, la vacuna fágica para la prevención de una enfermedad o la terapia fágica para el tratamiento de determinadas infecciones. Por otro lado, también puede emplearse esta herramienta para interrumpir la formación de biopelículas bacterianas, por tanto, esta terapia puede combinarse con el uso de antibióticos y así contrarrestar este mecanismo de resistencia (Golkar *et al.*, 2014).

Otra estrategia en estudio es el uso de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, también conocidas como CRISPR-Cas (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Estas regiones están muy extendidas en las arqueas y bacterias, y se encargan de proteger al organismo de los elementos genéticos móviles como fagos, plásmidos y transposones. Algunas investigaciones Getino & de la Cruz, 2017 sugieren que podría servir como herramienta para interrumpir la HGT por su capacidad para atacar de forma específica el material genético foráneo. También puede utilizarse para eliminar los factores de virulencia y los determinantes de resistencia, sensibilizando a las bacterias patógenas a los antibióticos (Aslam *et al.*, 2020; Gholizadeh *et al.*, 2021).

Por otra parte, también se está estudiando el uso de sustancias que funcionan eliminando los plásmidos de las bacterias, impidiendo su replicación y, por tanto, revertiendo las funciones codificadas en él (virulencia, resistencia a antibióticos, etc.). Al eliminar los plásmidos, se eliminan los genes de resistencia codificados por estos, por lo que las bacterias volverán a ser sensibles a los antibióticos (Buckner *et al.*, 2018; Patwardhan *et al.*, 2018).

Finalmente, en vista de la facilidad con la que las bacterias pueden transferirse genes de resistencia a los antibióticos mediante conjugación, una estrategia muy prometedora que se está investigando es intentar lograr la inhibición de dicho proceso de transferencia génica horizontal. El descubrimiento y desarrollo de compuestos inhibidores de la conjugación (COINs, del inglés *Conjugative Inhibitors*), podría contribuir a limitar la problemática de la resistencia a los antibióticos. En la búsqueda de COINs resulta fundamental conocer qué elementos del sistema de conjugación podrían ser buenas dianas moleculares para la inhibición específica del proceso (Cabezón *et al.*, 2017).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una revisión bibliográfica para conocer la situación en la que se encuentran las investigaciones encaminadas a la búsqueda de posibles inhibidores de la conjugación bacteriana, que permitan contribuir a controlar la propagación de los genes de resistencia a los antibióticos.

Para abordar dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos:

### **2.2. Objetivos específicos**

1. Determinar qué elementos implicados en los sistemas de conjugación bacteriana pueden servir como dianas potenciales para el uso de inhibidores específicos.
2. Conocer los principales compuestos naturales o sintéticos que han mostrado actividad inhibitoria de la conjugación *in vitro*, así los métodos empleados para evaluar dicha actividad.
3. Revisar si existen estudios que evalúen la acción de COINs *in vivo* con el objetivo de interrumpir el proceso conjugativo en ambientes naturales.

### **3. Metodología**

#### **3.1. Estrategia de búsqueda y criterios de selección bibliográfica**

Esta revisión bibliográfica se ha realizado tomando como fuente de información diferentes bases de datos de libre acceso tales como Google Scholar, Science Direct y PubMed. En una fase inicial, para adquirir una visión general sobre el tema del trabajo, se consultaron una serie de artículos sobre la problemática global de la resistencia a los antibióticos y el papel de la transferencia génica horizontal en la diseminación de los genes de resistencia. Estos artículos constituyeron la base con la que se redactó la introducción de este trabajo.

Seguidamente se realizaron búsquedas en las bases de datos anteriormente indicadas orientadas a los objetivos del estudio, la inhibición del proceso de conjugación bacteriana. Se tuvieron en cuenta una serie de criterios que incluyeron: estudios publicados en los últimos 15 años, que estuviesen escritos en inglés y se tuvieron en cuenta una serie de combinaciones de términos clave, principalmente: “*antibiotic resistance*”, “*bacterial conjugation*”, “*conjugation inhibitor*”, “*T4SS*”, “*conjugation*”, “*horizontal gene transfer*” y “*conjugative plasmid*”. A partir de estas búsquedas se evaluaron los títulos de los artículos, y cuando fue necesario, los resúmenes, para seleccionar aquellos de libre acceso directamente relacionados con los objetivos del trabajo. Adicionalmente, y con el fin de obtener una visión más completa, se revisó la bibliografía incluida en algunos de ellos para intentar localizar artículos complementarios de interés que no habían sido localizados en las búsquedas iniciales empleando los criterios antes comentados. Excepcionalmente, se incluyeron 4 artículos anteriores a 2007 debido a la relevancia de la información que contenían. Finalmente, el contenido mayoritario del apartado de resultados y discusión se basó en un total de 31 artículos que fueron analizados en mayor detalle: 29 artículos originales y 2 Tesis Doctorales.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Conjugación bacteriana

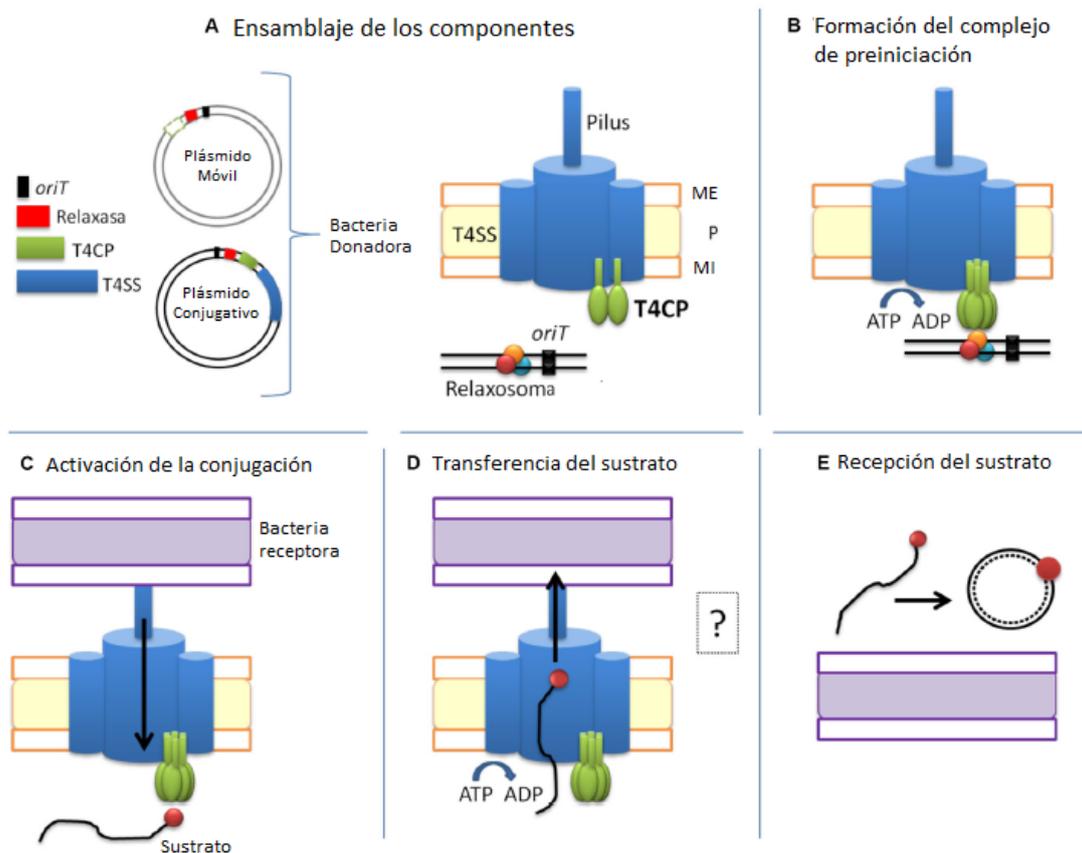
La conjugación bacteriana es el mecanismo principal implicado en la transferencia horizontal de genes. Este proceso está mediado por elementos genéticos móviles (MGEs), entre los que encontramos elementos extracromosómicos (los plásmidos) e intracromosómicos (ICEs, del inglés *Integrative and Conjugative Elements*). Los plásmidos codifican genes relacionados con la detoxificación, virulencia, interacciones ecológicas o resistencia a antibióticos. Confiere a aquellas bacterias que los posean, una ventaja de supervivencia en situaciones selectivas, como puede ser la presencia de antibióticos. Para que ocurra la conjugación es necesario que ambas células estén en contacto físico. Los plásmidos se transfieren desde una bacteria donadora a otra receptora. En las bacterias Gram negativas, que es el grupo que se conoce con mayor detalle, el contacto tiene lugar por medio del pili conjugativo (Fernández López, 2016).

Existen diferentes tipos de plásmidos según su capacidad para transferirse: los plásmidos conjugativos, los movilizables y los no movilizables. Los plásmidos movilizables y los conjugativos constituyen los llamados “plásmidos transmisibles” y ambos pueden portar ARGs (Smillie *et al.*, 2010).

Los plásmidos conjugativos codifican todas las proteínas necesarias para su autotransferencia. Presentan dos módulos: los genes MOB y los MPF (del inglés, *Mating Pair Formation*). Los genes MOB incluyen el oriT (origen de transferencia), punto de inicio del procesamiento del ADN; y la secuencia que codifica para la relaxasa, una endonucleasa cuya función principal es cortar el ADN en el oriT, “relajando” el plásmido. Además, la relaxasa se encarga de guiar el ADN hacia el canal de secreción y tiene una función en la terminación del proceso conjugativo en la célula receptora. Ambos componentes, junto con otras proteínas accesorias, forman el relaxosoma. Los genes MOB también codifican la proteína acopladora (T4CP) que conecta el relaxosoma situado en el citosol con el canal de secreción. Conjuntamente se encargan del procesamiento del ADN. Los genes MPF, codifican todas las proteínas del sistema de secreción de tipo 4 (T4SS), (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Smillie *et al.*, 2010).

Los plásmidos movilizables no son auto-transmisibles, carecen de los genes MPF, y no pueden ser transferidos si no poseen en la misma célula un plásmido conjugativo que codifique los componentes necesarios para su movilización (Smillie *et al.*, 2010).

Los plásmidos no movilizables no pueden ser transferidos mediante conjugación, por lo que emplean otras estrategias como transducción o transformación (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Fernández López, 2016; Russi, 2009; Smillie *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Proceso de conjugación. La conjugación comienza con el ensamblaje del canal del T4SS, el pili conjugativo y el relaxosoma (A), para permitir el contacto físico entre las dos células. El siguiente paso (B) es la interacción de dichos elementos originando un complejo de preiniciación. El relaxosoma es reclutado por la T4CP y hexameriza con VirB4 uniéndose al canal de secreción. La unión del ADN y T4CP desencadena la hidrólisis de ATP provocando un cambio de conformación activando del canal de secreción. Tras esto (C), se activa el proceso conjugativo, en Gram negativas, el pili de la célula donadora reconoce a la célula receptora y une ambas. La señal se transduce y finalmente, la relaxasa corta una de las hebras de ADN, uniéndose de forma covalente a un extremo. En este momento tiene lugar la replicación del ADN. Lo siguiente que tiene lugar es la recepción del sustrato en el canal de secreción y la translocación de este desde la célula donadora a la receptora (D). El último paso (E) es la recepción del sustrato en la célula receptora y el fin de la conjugación. Modificada de: Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020.

Durante el proceso conjugativo (Figura 3) se forma el relaxosoma, el cual se une a la proteína acopladora que lo conecta con el T4SS. A continuación, el sustrato es recibido en el canal de secreción y es transferido a la célula receptora, donde se recirculariza y se replica, de manera que la célula receptora adquiere las características

codificadas por el plásmido recibido (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020). La investigación de Carranza *et al.*, 2021, demostró que durante el proceso conjugativo, se puede transmitir más de una copia del plásmido.

#### 4.1.1. Sistema de secreción tipo IV

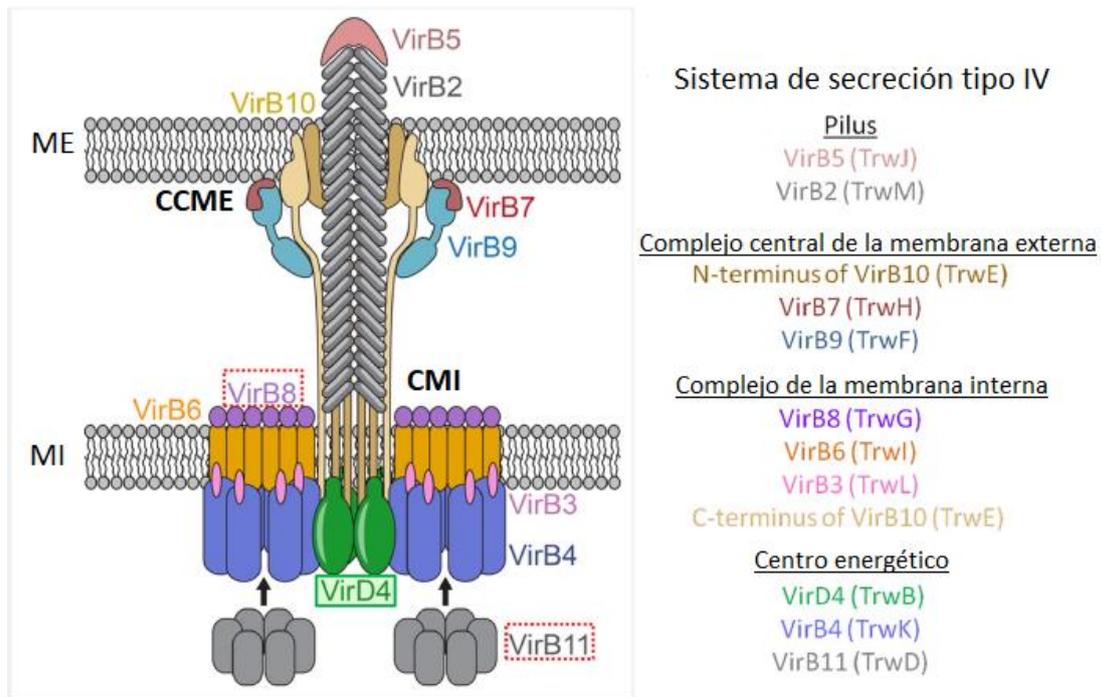
Los T4SS conjugativos son sistemas de secreción encargados del transporte de plásmidos, proteínas y factores de virulencia durante la conjugación. Se encuentran presentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Estos sistemas presentan gran variabilidad y pueden ser clasificados atendiendo a diferentes criterios: la primera clasificación diferencia los que intervienen en la conjugación (cT4SS) de los que intervienen en procesos patogénicos (pT4SS), mientras que la segunda clasificación se basa en los componentes proteicos, y distingue T4ASS de T4BSS. Los sistemas T4ASS están principalmente relacionados con la diseminación de la resistencia a antibióticos y son los más estudiados, siguen el arquetipo VirB/D4 de *Agrobacterium tumefaciens* mientras que los de tipo B están relacionados con el Dot/Icm T4SS de *Legionella pneumophila* (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Christie & Cascales, 2005). En esta revisión nos centraremos en los de tipo A por ser los más estudiados y mejor conocidos.

Los T4ASS están formados por 12 subunidades proteicas codificadas por los genes MPF (VirB1-VirB11). Las proteínas VirB (VirB1-VirB11), junto con VirD4, conforman todo el canal de secreción que se extiende a través de las membranas interna, externa y el periplasma situado entre ambas. Los T4ASS se dividen en 3 módulos principales (**Figura 4**): un centro energético, el complejo de la membrana interna (CMI) y el complejo central de la membrana externa (CCME), además del pili conjugativo (Boudaher & Shaffer, 2019; Christie & Cascales, 2005; Ripoll-Rozada *et al.*, 2013).

VirB1 es una transglucosilasa periplasmática que elimina el peptidoglicano e interviene en la biogénesis del pili (Voth *et al.*, 2012).

El centro energético está constituido por 3 ATPasas hexaméricas que proporcionan energía para el transporte del sustrato desde el lado citoplasmático al canal de secreción. Está formado por VirD4 (en el plásmido R388, TrwB), VirB4 (TrwK) y VirB11 (TrwD). VirD4 es una proteína acopladora también conocida como T4CP, cuya función principal es el reconocimiento específico del sustrato. Además, conecta el relaxosoma con el complejo de la membrana interna. VirB4 es una proteína encargada del transporte de moléculas de pilina durante la formación del pili conjugativo. VirB11

es una ATPasa que alterna dos funciones, la biogénesis del pili y el transporte del sustrato. Solamente se han encontrado evidencias de la hidrólisis de ATP por parte de VirB11 (Christie & Cascales, 2005; Ripoll-Rozada *et al.*, 2013).



**Figura 4.** Arquitectura molecular del T4ASS. Se muestra la equivalencia entre los modelos de VirB/VirD4 y R388, estos últimos mostrados entre paréntesis. Modificada de: Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2020.

El complejo de la membrana interna (CMI) está formado por VirB3 (TrwL), VirB6 (TrwI), VirB8 (TrwG) y el dominio C-terminal de VirB10 (TrwE). Al parecer, VirB3 posee una función relacionada con el ensamblaje del pili, aunque aún no está claro. VirB6 y VirB8 son proteínas de membrana que regulan la secreción de moléculas a través de la membrana interna hacia el periplasma. Otra de las funciones que cumple VirB8 es dirigir a las proteínas VirB7, VirB9 y VirB10 al polo de la célula durante el ensamblaje del aparato. VirB10 tiene una función estructural, está presente en ambas membranas y también actúa regulando el canal de secreción, detecta la actividad de VirB11 y VirD4, y actúa en respuesta a este, permitiendo el paso hacia VirB9 (Fronzes *et al.*, 2009; Jakubowski *et al.*, 2009; Mossey *et al.*, 2010; Voth *et al.*, 2012).

Por último, el complejo central de la membrana externa (CCME) se encuentra solo presente en las bacterias Gram negativas. Está formado por VirB7 (TrwH), VirB9 (TrwF) y el dominio N-terminal de VirB10 (TrwE). La función que cumplen sus componentes es la translocación del sustrato a través del periplasma y la membrana externa. VirB7,

además interviene en la formación del pili conjugativo (Fronzes *et al.*, 2009; Jakubowski *et al.*, 2009; Mossey *et al.*, 2010; Voth *et al.*, 2012).

Por tanto, VirB7, Vir8, Vir9 y Vir10 conectan el complejo central con el pili. Además, se ha visto que VirB7, VirB8 y VirB4 estabilizan a VirB3 contribuyendo a la biogénesis del pili. Aunque se desconoce la composición del poro que permite la transferencia a la célula receptora, algunos estudios determinan que podría estar compuesto por VirB7 y VirB9 (Jakubowski *et al.*, 2009).

Por otro lado, en la conjugación de Gram negativas también interviene el pili conjugativo, formado mayoritariamente por VirB2 (TrwM) y, en menor proporción, por VirB5 (TrwJ). La función que cumple es la unión entre la célula receptora y donadora para permitir el intercambio genético (Low *et al.*, 2014).

La conjugación en bacterias Gram positivas difiere ligeramente de las Gram negativas. En Gram positivas no existe la proteína VirB11, no se forma el complejo central de la membrana externa y no participa un pili conjugativo. En lugar del pili intervienen adhesinas para mediar la interacción entre las dos células. A pesar de esto, existen similitudes entre ambos sistemas como, por ejemplo, la presencia de estructuras complejas compuestas funcionalmente por proteínas análogas. Por ejemplo, proteínas similares a T4CP, ATPasas o transglicosilasas similares a VirB1 que eliminan la gruesa capa de peptidoglicano, permitiendo el ensamblaje de la máquina de secreción (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020; Boudaher & Shaffer, 2019; Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014).

#### **4.1.2. Potenciales dianas para la inhibición de la conjugación**

La propagación de los genes de resistencia a antibióticos se hace cada vez más difícil de controlar. Actualmente resulta prioritario el desarrollo de estrategias innovadoras contra la aparición y diseminación de organismos multirresistentes (Larsson & Flach, 2021). Una posible estrategia para controlar la propagación de los genes de resistencia a antibióticos es inhibir la actividad de las proteínas que participan en la conjugación mediante el uso de COINs específicos. Son considerados inhibidores aquellas sustancias que impiden o disminuyen la frecuencia de la conjugación al impedir la correcta función de alguna proteína implicada en el proceso conjugativo. Los compuestos que disminuyen la eficiencia conjugativa, pero también afectan al crecimiento, fisiología bacteriana y/o síntesis de ADN, son denominados inhibidores inespecíficos. Los inhibidores inespecíficos no son considerados buenos candidatos para

inhibir la conjugación puesto que su efecto inhibitorio es difícilmente cuantificable. Algunos ejemplos de inhibidores inespecíficos son: los bisfosfonatos, que actúan como quelantes inespecíficos: la 1,10-fenantrolina, que funciona como agente quelante del zinc, inhibiendo la transferencia del plásmido F, o los nitrofuranos, que actúan alterando el ADN (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). En cambio, los inhibidores específicos impiden el proceso conjugativo sin afectar a la fisiología de la bacteria, ni a su crecimiento, ya que van dirigidos hacia un componente no esencial para la vida de la bacteria (Ripoll-Rozada *et al.*, 2016).

Existen muchos elementos del sistema de secreción que pueden funcionar como dianas terapéuticas y requieren ser estudiadas para poder evaluar su potencial como inhibidores específicos. En general, la búsqueda de inhibidores gira entorno a las proteínas homólogas a VirB8, las cuales tienen un papel importante en la translocación del sustrato a la célula receptora. Algunos estudios sugieren que el correcto funcionamiento de VirB8 depende de su dimerización. Por tanto, el desarrollo de compuestos que impidan dicha reacción, pueden funcionar para la inhibir la conjugación (Casu *et al.*, 2016).

Otra diana muy utilizada como objetivo de fármacos inhibidores de la conjugación son las ATPasas, entre las que se incluyen VirD4, VirB11, VirB4 y VirD2. Cada una de ellas cumple una función esencial en el proceso conjugativo (Carranza *et al.*, 2021). Concretamente, VirB11 (TrwD) se encarga de la biogénesis del pili y del transporte del sustrato y es objetivo de inhibidores como ácidos grasos insaturados y 2- alquinoicos (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Ripoll-Rozada *et al.*, 2016). Por otro lado, la relaxasa (VirD2, en el plásmido R388 TrwC) que está implicada en el inicio de la conjugación en la célula donadora, pero también en la terminación del proceso en la célula receptora, es inhibida por anticuerpos específicos intracelulares que impiden la transferencia de los plásmidos (Cabezón *et al.*, 2017; Garcillán-Barcia *et al.*, 2007; Getino *et al.*, 2015).

Por otra parte, y teniendo en cuenta la necesidad de contacto físico entre las células donadoras y receptoras para poder llevar a cabo la conjugación, la inhibición de la formación del pili conjugativo es una estrategia interesante para luchar contra la dispersión de la resistencia a los antibióticos.

## **4.2. Métodos para monitorizar la conjugación y evaluar posibles inhibidores**

Cuantificar la transmisión de plásmidos, tanto vertical como horizontal, resulta relevante para poder realizar una predicción sobre su posible propagación (Huisman *et al.*, 2022). Para estudiar la conjugación, así como para la búsqueda de compuestos potencialmente inhibidores de este proceso, es necesario disponer de sistemas que permitan evaluar la eficiencia de la conjugación.

### **4.2.1. Medición de la conjugación plasmídica empleando selección con antibióticos**

En la actualidad, la selección con antibióticos es el método más común que se emplea para determinar y cuantificar la habilidad de un determinado plásmido de conjugarse en condiciones de laboratorio. En estos métodos para cuantificar la conjugación se emplean marcadores genéticos seleccionables, concretamente genes de resistencia a los antibióticos. Se utilizan de 3 genes de resistencia a antibióticos diferentes. La población donante contiene un gen de resistencia plasmídico A y un gen de resistencia cromosómico B, mientras la población receptora codifica un tercer gen cromosómico C. Por lo tanto, la medición de la conjugación mediante este método requiere la determinación del número de células viables en placas que contienen selección con A y C (transconjugantes), en comparación con el número de células que crecen en A (donadoras) o en C (receptoras) solamente. Aunque el protocolo específico depende de la especie bacteriana o del plásmido analizado, siempre es necesario poner en contacto las poblaciones donadora y receptora durante un determinado periodo de tiempo, y seguidamente realizar los recuentos en placas con los medios selectivos adecuados. La eficiencia de conjugación se mide habitualmente como frecuencia de conjugación, es decir, el número de células transconjugantes por donador o receptor, respectivamente. Por lo tanto, es posible comprobar el efecto de un compuesto sobre la eficiencia de conjugación midiendo la frecuencia de conjugación y comparando los resultados (Huisman *et al.*, 2022; Palencia-Gándara *et al.*, 2021).

### **4.2.2. Medición de la conjugación empleando genes reporteros fluorescentes**

Los métodos basados en fluorescencia se han hecho cada vez más populares ya que ofrecen una alternativa más rápida que los laboriosos métodos convencionales, permiten el desarrollo de procedimientos automatizados a gran escala y visualización directa. Algunos de estos métodos se basan en la citometría de flujo, la expresión de fluorescencia para un análisis a gran escala (Sørensen *et al.*, 2005) o visualización directa de la transferencia plasmídica empleando el microscopio (Carranza *et al.*, 2021). Por

ejemplo, en el caso de la producción de fluorescencia, esta se produce específicamente cuando tiene lugar la transferencia del plásmido conjugativo, ya que la fluorescencia está reprimida en la población donadora pero no en las células transconjugantes. Por tanto, la fluorescencia total producida por un cultivo proporciona una medida de la cantidad de transconjugantes presentes en la población. Esto permite el cribado a gran escala de compuestos que puedan afectar a la conjugación (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Getino *et al.*, 2016).

### **4.3. Estudios de inhibición de la conjugación bacteriana *in vitro***

Actualmente, muchas investigaciones se centran en la búsqueda de COINs específicos que no afecten al crecimiento de las bacterias. Según la información recopilada en este trabajo, la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento se han llevado a cabo “*in vitro*”.

#### **4.3.1. Uso de anticuerpos para la inhibición de la conjugación**

Una estrategia interesante para la inhibición de la conjugación se basa en la expresión de anticuerpos Fv monocatenarios específicos (*intrabodies*) dirigidos contra la relaxasa (TrwC). Como se comentó anteriormente, la relaxasa es una proteína que participa en la iniciación (en la célula donadora) y terminación de la conjugación (en la célula receptora). En el estudio de Garcillán-Barcia *et al.*, 2007, se comprobó que la expresión de estos anticuerpos en las células receptoras, protegería a estas de la transferencia del plásmido R388, impidiendo por tanto que finalice el proceso conjugativo. Sin embargo, la aplicabilidad de esta herramienta en el ser humano es algo limitada, ya que se requiere una población receptora modificada genéticamente para la expresión de los *intrabodies* (Cabezón *et al.*, 2017; Getino *et al.*, 2015).

Otra estrategia propuesta por Laverde *et al.*, 2017 consiste en utilizar la proteína TraM (homóloga de VirB8) para desarrollar una vacuna contra las infecciones de enterococos y así prevenir las infecciones causadas por bacterias multirresistentes. Para ello, primero se determinó si los anticuerpos anti-TraM confieren protección contra la infección bacteriana, realizando un ensayo opsonofagocítico. TraM estimula el sistema inmunitario induciendo los anticuerpos encargados de la eliminación de bacterias. Para llevar a cabo la inmunización de ratones se suministraron 4 dosis de 10 µg de proteínas y tras 7 días, los ratones fueron expuestos a cepas de *Staphylococcus aureus*. Para la

población control, los ratones se inmunizaron pasivamente con suero no opsonico contra la proteína TraJ. El resultado fue una reducción de las UFC en el hígado de aquellos ratones que habían sido inmunizados con la vacuna. Este ensayo fue efectivo para *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* y *S. Aureus*.

#### **4.3.2. Inhibidores de la conjugación derivados de plantas**

Durante los últimos años se ha observado que algunos derivados de plantas pueden interactuar con los plásmidos de la célula huésped o inhibiendo el T4SS, impidiendo el proceso conjugativo. Un ejemplo de esto son los derivados de *Mallotus philippensis* (Lam.) Mull. Arg. que poseen propiedades antibacterianas e inhibidoras de la transferencia de plásmidos. Entre estos derivados se han encontrado compuestos como son la rottlerina también conocida como mallotoxina, kamalina o [5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(2,4,6-trihydroxy-3-methyl-5-acetylbenzyl)-8-cinnamoyl-1,2-chromene]; y el compuesto rojo (8-cinnamoyl-5,7-dihydroxy-2,2,6-trimethylchromene). Ambos presentan actividad antitumoral, citotóxica, antiviral, antileucémica, antioxidantes, antiinflamatoria, actividad anticonjugativa y actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como, por ejemplo, *E. faecalis*, cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* (MRSA) o *Bacillus subtilis*. Por el contrario, no se observaron efectos contra Gram negativas. Estos compuestos tuvieron un efecto inhibitor en la transferencia de plásmidos pKM101, TP114, pUB307 y R6K. El hecho de que inhiban la transferencia de plásmidos cuando se aplican concentraciones subinhibitorias que no inhiben el crecimiento bacteriano, indica que afectan al ADN del plásmido y al sistema de replicación de alguna manera que por ahora se desconoce (Oyedemi *et al.*, 2016).

Por otro lado, a partir de un extracto metanoico de las semillas de planta medicinal *Lepidium sativum*, se obtuvo un aceite esencial del que derivaron alcaloides diméricos de imidazol tales como la leptina AK [2-(3-(3-((1H-imidazol-2-yl)methyl)-5-methoxyphenoxy)benzyl)-1H-imidazole], leptina E, leptina B y lepidina E y 2-(3-(2-((1H-imidazol-2-yl)methyl)-6-methoxyphenoxy)benzyl)-1H-imidazol. Se comprobó la capacidad de estos compuestos para inhibir la conjugación de plásmidos utilizando el método de selección con antibióticos. Los resultados del ensayo mostraron que tanto la lepidina E, como el 2-(3-(2-((1H-imidazol-2-yl)methyl)-6-methoxyphenoxy)benzyl)-1H-imidazol disminuyeron la frecuencia de transferencia para los plásmidos IncN pKM101 y IncI<sub>2</sub> TP114. Sin embargo, la Leptina B provocó un aumento de la actividad conjugativa (hasta un 120%). En el caso de la leptina AK la actividad varió. Fue el único compuesto

que mostró una inhibición específica moderada frente al plásmido IncI<sub>2</sub> TP114. También se vio una mejora en la actividad de conjugación del plásmido IncN pKM101 hasta en un 120%. Estos resultados permitieron concluir que gracias a su especificidad podría servir como punto de partida para el desarrollo de otros compuestos que actúen como inhibidores (Kwapong *et al.*, 2018).

Otro descubrimiento de Kwapong *et al.*, 2019 evidenció que los isotiocinatos, derivados de glucosinolatos procedentes de vegetales del género *Brassica*, como por ejemplo, el isotiocinato de bencilo, o bien sintéticos, como el isotiocianato 4-metoxifenilo, pueden servir como inhibidores de la conjugación. El isotiocinato de bencilo mostró actividad anticonjugativa para los plásmidos pKM101 (IncN), TP114 (IncI<sub>2</sub>) y pUB307 (IncP). Su efecto de amplio espectro demuestra que el mecanismo de acción utiliza como diana la maquinaria necesaria para el proceso conjugativo. El isotiocianato de 4-metoxifenilo, en cambio, presentaba actividad inhibitoria de la conjugación para unos plásmidos, actividad de eliminación de plásmidos para otros y también favoreció la conjugación en otras ocasiones. Estas respuestas diferentes se deben a que lleva a cabo su acción actuando en un lugar específico que no es común a todos los plásmidos. Ambos compuestos podrían utilizarse como inhibidores de la conjugación o bien utilizarse como base para el desarrollo de otros más efectivos.

Por último, a partir del extracto de diclorometano de las partes aéreas de *Plectractus venterei*, se obtuvieron dos acetofenonas que resultaron ser eficaces en la inhibición de la transmisión del plásmido IncW R7K. Estos dos compuestos fueron 2-hidroxi-3,4,5,6-tetrametoxiacetofenona y 2-hidroxi-4,5,6-trimetoxiacetona. Estos redujeron la conjugación específica del plásmido IncW R7K en un 85% y 87%, respectivamente, a una concentración de 100mg/L, no viéndose dicho efecto para otros plásmidos. Se necesitan llevar a cabo estudios adicionales a cerca de su mecanismo de acción y su estructura (Maree *et al.*, 2014).

#### **4.3.3. Inhibición dirigida a la maquinaria de secreción**

Dada la importancia de los sistemas de secreción de tipo IV en el proceso conjugativo, sus componentes pueden ser dianas para el desarrollo de inhibidores de la conjugación.

En el estudio de Paschos *et al.*, 2011, se identificaron mediante cristalografía de rayos X y análisis estructurales, ciertos compuestos que actuaban como inhibidores de la

conjugación en *Brucella abortus*. La diana principal sobre la que actuaban estos compuestos era VirB8, un componente fundamental para el funcionamiento del T4SS, tal como se describió en el apartado 4.1.2. La forma de actuación se basaba en impedir la dimerización de la proteína, causando una inhibición alostérica y reduciendo consecuentemente la transferencia de los plásmidos. Si se inhibe la dimerización también se inhibe, en consecuencia, las interacciones VirB8-VirB8 y VirB8- VirB10, afectando negativamente al ensamblaje del sistema de secreción, desestabilizándolo. Los inhibidores encontrados disminuían los niveles de VirB8, así como de otras proteínas VirB y la transcripción del gen *virB*. Entre otros inhibidores, el más prometedor fue B81-2. B81-2 es una salicilideno acilhidrazida que posee una estructura similar a otros inhibidores del T3SS (inyectisoma) (Boudaher & Shaffer, 2019).

En otro estudio se comprobó la capacidad inhibitoria de la conjugación de 2 compuestos específicos para el plásmido pKM101 (Casu *et al.*, 2017). Estos compuestos se unen a TraE (homólogo de VirB8) impidiendo su dimerización y, por tanto, la transferencia del plásmido pKM101. Entre estos inhibidores encontramos el ácido-2-furoico (1E6) que posee dos sitios de unión a TraE, uno en el surco superficial y, otro que no se conocía hasta ahora, en una región  $\alpha$ -hélice en el lugar de dimerización. El descubrimiento de este segundo lugar de unión puede aportar una visión novedosa para el desarrollo de fármacos para inhibir la conjugación. El segundo inhibidor es el ácido-2-cloroisonicotínico (4H10) que se une también en el surco superficial.

A partir de la fusión de los dos compuestos anteriores, se desarrollaron dos moléculas diferentes denominadas ácido 2- (2-furil)isoníctico y ácido 4-(1H-pirrol-1-il)piridina-2-carboxílico. Ambas poseen mayor especificidad de unión que los compuestos originales. Al primer compuesto lo denominaron “molécula 239852”. Este poseía su lugar de unión el surco superficial, y su efecto inhibitor es similar al de otros inhibidores ya conocidos. Por otro lado, el segundo de ellos se denomina “molécula 105055” y se une a la región  $\alpha$ -hélice de TraE, cerca del sitio de dimerización, infiriendo, por tanto, en este proceso. Es por ello que posee un efecto inhibitor aún más potente. Si ambos compuestos actúan juntos, la inhibición de la conjugación es más efectiva (Casu *et al.*, 2017).

Hasta ahora, la mayor parte de los estudios se han centrado en la inhibición de un componente específico del sistema conjugativo, pero están comenzando a plantearse nuevos enfoques dirigidos a desarmar la maquinaria de secreción (Shaffer *et al.*, 2016).

#### **4.3.3.1. Inhibición de la formación del pili conjugativo**

Teniendo en cuenta la función esencial que cumple el pili conjugativo en las bacterias Gram negativas, uniendo las células donadoras y receptoras, se ha planteado como una buena estrategia inhibir su biogénesis de manera directa. Esta estrategia puede convertirse en una solución frente a la propagación horizontal de resistencias.

Se ha visto que la utilización de fagos filamentosos es capaz de producir una inhibición de la conjugación. La proteína g3p forma parte de la cubierta de los fagos y puede actuar ocluyendo al pili. Si el pili es inhibido, se impide la transmisión de los plásmidos y, por tanto, se impide la transferencia de los ARGs (Lin *et al.*, 2011).

Por otro lado, en la investigación de Shaffer *et al.*, 2016 han descubierto una molécula sintética, KSK85, que impide la biogénesis del pili en *H. pylori*. Esta molécula también resulta efectiva en la inhibición de la transmisión de plásmidos en *A. tumefaciens* y *E. coli*.

#### **4.3.4. Ácidos grasos insaturados como inhibidores de las ATPasas conjugativas**

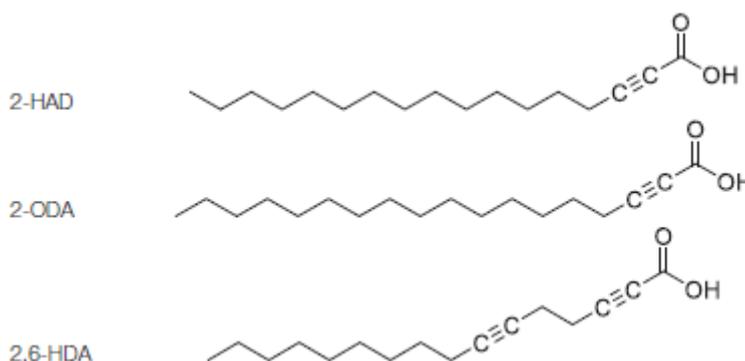
Tal y como se ha mencionado previamente, las ATPasas que forman parte del T4SS son buenas dianas para inhibir el proceso de conjugación. Los ácidos grasos insaturados (uFAS, del inglés *Unsaturated Fatty Acids*) como el ácido linoleico o el oleico, han mostrado ser potentes inhibidores de la conjugación. En cambio, los ácidos grasos saturados no poseen dicho efecto (Getino *et al.*, 2015; Ripoll-Rozada *et al.*, 2016). La importancia de la eficacia de los uFAs reside principalmente en el grupo carboxilo, en la longitud de la cadena y en la posición de las insaturaciones.

Los ácidos grasos naturales son propensos a la autooxidación, por lo que su eficacia se puede ver comprometida. Para evitar esta posible desestabilidad Getino *et al.*, 2015 sintetizaron ácidos grasos con triples enlaces, los ácidos grasos 2-alquinoicos (2-aFAs) que son efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además, no afectan al crecimiento, funcionando por tanto como inhibidores específicos.

Para llevar a cabo la cuantificación del efecto inhibitorio de los uFAs, Cabezón *et al.*, 2017 utilizaron el método de cuantificación de la fluorescencia (HTC). Esto permitió determinar que uno de los ácidos grasos insaturados más efectivos es el dehidrocrepenínico (DHCA). Este ácido se caracteriza por poseer 18 carbonos, 2 dobles enlaces (el primero en el C9 y el siguiente en el C14), y un triple enlace en el C12 (Cabezón *et al.*, 2017; Fernandez-Lopez *et al.*, 2005). El conocimiento de su estructura

permitió el desarrollo de los 2-aFAs donde destacan el ácido 2-hexadecinoico sintético (2-HDA), el ácido 2-octadecinoico (2-ODA) y el ácido 2,6-hexadecinoico (2,6-HDA) (**Figura 5**) que funcionan como inhibidores específicos de una amplia gama de plásmidos conjugativos (IncF, IncW, IncH, IncI, IncL/M, IncX) en diferentes bacterias: *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter spp.* Este efecto inhibitorio de amplio espectro implica que la diana a la que van dirigidos es un componente de la maquinaria de secreción (Getino *et al.*, 2015; Ripoll-Rozada *et al.*, 2016).

El mecanismo de inhibición de los ácidos grasos insaturados se basa en la unión no competitiva a TrwD (homólogo de VirB11 en el plásmido R388). Se inhibe su actividad sin modificar la afinidad por el sustrato (ATP) o el producto (ADP). Cuando la conjugación no está inhibida, la TrwD está unida a palmítico de manera no covalente. Durante la inhibición, los uFAs, y los 2-AFA ocupan el lugar de unión del palmítico, impidiendo que este pueda unirse a la TrwD (inhibición competitiva) reprimiendo su función (Cabezón *et al.*, 2017; García-Cazorla *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Estructura del 2-HDA, 2-ODA y 2,6-HDA. Tomada de (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2020).

El 2-HDA y el 2-ODA fueron los inhibidores de la conjugación más efectivos y además son fácilmente sintetizables, aunque presentan ciertos problemas de toxicidad. El 2-HDA es tóxico para hongos, protozoos, Gram positivas, algunas Gram negativas y células eucariotas. El 2-ODA es tóxico frente a *Mycobacterium smegmatis*. Consecuentemente, estos COINs no pueden utilizarse en ambientes naturales, con el fin de preservar la biodiversidad del medio (Getino *et al.*, 2016).

Otra de las moléculas que se encuentra actualmente en estudio es el ácido 2-bromopalmítico, el cual puede incorporarse a la membrana impidiendo la unión de TrwD con el palmítico. Esta inhibición se debe a la conformación espacial que adquieren los ácidos grasos al unirse a TrwD y la presencia del grupo halógeno. El ácido 2-

bromopalmítico es un análogo del palmitato que actúa como inhibidor reversible de numerosas enzimas de membrana (Cabezón *et al.*, 2017; García-Cazorla *et al.*, 2018).

También funcionan como COINs los ácidos tanzawaicos A (TZA) y B (TZB). Estos compuestos son ácidos carboxílicos que contienen dos anillos aromáticos al final de una cadena alifática insaturada. Son COINs naturales, producidos por las especies de *Penicillium citrinum*. Los ácidos tanzawaicos fueron efectivos por inhibir la transferencia de los plásmidos conjugativos de *Escherichia coli* IncW, IncF<sub>1</sub>, IncF<sub>2</sub>, IncI, IncL/M, IncX, IncH, aunque no fueron efectivos para otros plásmidos como IncN e IncP. Esto parece indicar que las dianas que utilizan para ejercer su efecto forman parte de los sistemas MPF de los plásmidos que se han visto afectados. Presentan toxicidad reducida, lo que los convierte en alternativas más seguras aplicables a entornos naturales o como tratamientos combinados con antibióticos para prolongar su vida útil o, incluso, como inhibidores de la virulencia bacterias patógenas que posean estos sistemas de secreción sobre los que actúan como inhibidores (Getino *et al.*, 2016).

Usando las estructuras de estos compuestos como andamio, pueden desarrollarse nuevos COIN sintéticos y específicos (Getino *et al.*, 2015).

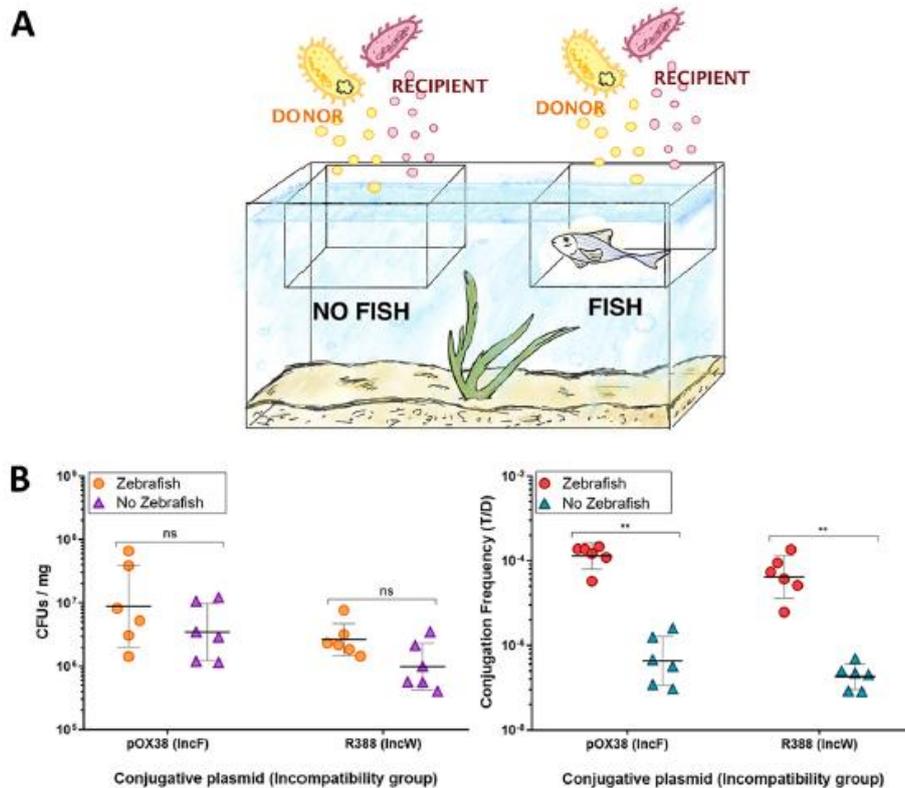
#### **4.4. Estudios de inhibición de la conjugación bacteriana *in vivo***

Los ensayos *in vitro* constituyen una primera aproximación necesaria en la investigación de los compuestos candidatos con posible actividad inhibitoria de la conjugación. Sin embargo, para determinar la utilidad real de estos compuestos, es necesario realizar ensayos *in vivo*. Dichos ensayos, aparte de permitir comprobar la capacidad inhibitoria de la conjugación, permiten evaluar la seguridad de estas sustancias en los seres humanos además del impacto ambiental que causan.

En base a los criterios de búsqueda utilizados en este trabajo, únicamente se localizó un estudio reciente Palencia-Gándara *et al.*, 2021 en el que se evaluó la actividad inhibitoria de la conjugación *in vivo*. En dicha investigación se realizaron dos ensayos utilizando el 2-HDA, cuya actividad había sido previamente evaluada *in vitro*, como inhibidor de la transferencia de plásmidos (Palencia-Gándara *et al.*, 2021). En el primero de los ensayos se cuantificó la tasa de conjugación con y sin 2-HDA en un hábitat dulceacuícola. Para ello se utilizaron cepas de *E. coli* resistentes al ácido nalidíxico (Nx) y a la rifampicina (Rif), y se calcularon las frecuencias de conjugación mediante siembra

en medios con selección antibiótica. Una vez establecidas las condiciones de volumen, temperatura y especies que habitaban en el acuario, lo que se hizo fue hacer un estudio meta taxonómico empleando el ARN 16S de las especies bacterianas que vivían en el acuario para seleccionar las cepas receptoras de nuestros plásmidos. Se seleccionaron dos de ellas y se comprobó que 2-HDA no inhibía ni retrasaba el crecimiento bacteriano.

Durante el experimento se administraron a los peces, como alimento, pellets con bacterias donadoras y receptoras en el interior de una caja de cría, dentro del acuario. Tras 24 horas se recogieron las muestras fecales, se hicieron recuentos de las colonias encontradas en las heces y se calcularon las frecuencias de conjugación. También se hizo el experimento sin peces como control. Se calcularon las frecuencias de conjugación utilizando dos plásmidos, el pOX38 del grupo PT-FE y el R388 del grupo PTU-W. Según los resultados, en ausencia de peces, la frecuencia de conjugación fue menor en comparación con la tasa conjugativa en presencia de estos. Por tanto, se confirma que el paso por el tracto gastro intestinal favorece la conjugación (**Figura 6**).



**Figura 6.** (A) Representación esquemática de la administración de microorganismos en el agua. (B) Gráfico de la supervivencia de *E.coli* (izquierda). Gráfico de la tasa de conjugación (derecha). En el eje de X se indican los plásmidos transmitidos por las bacterias donadoras y se comparan la presencia y la ausencia de peces. Tomada de: Palencia-Gándara *et al.*, 2021.

Para evaluar el efecto del 2-HDA sobre la frecuencia de conjugación (FC), se añadió éste como suplemento alimenticio a una concentración de 1,6 µg/mg. El efecto del compuesto fue la reducción de hasta 10 veces la frecuencia de conjugación, lo que demostraba la eficacia del compuesto 2-HDA para disminuir la transmisión de plásmidos.

En el segundo ensayo, se utilizaron ratones para comprobar la eficacia del inhibidor. Se inocularon cepas de ratón donadoras y receptoras, y se evaluó la presencia de bacterias transconjugantes en materias fecales tras 24h. Se administraron 100 µg de 2-HDA a uno de los grupos, y se observó una disminución de 10 veces la frecuencia de conjugación en comparación con el control al que no se le había suministrado 2-HDA.

Por tanto, el ensayo in vivo demostró que el 2-HDA tenía una eficacia de casi 90% en la inhibición de la transmisión de plásmidos en ambos experimentos. Además, dicho compuesto no afectó a la tasa de crecimiento bacteriano y, por tanto, mostró eficacia como inhibidor específico de la conjugación. De cualquier manera, es necesario realizar más experimentos para evaluar los posibles efectos secundarios, además de evaluar el efecto del compuesto en la microbiota propia del organismo (*Palencia-Gándara et al., 2021*).

#### **4.5. Perspectivas futuras**

Un conocimiento más completo y detallado de la estructura de los diferentes sistemas de secreción permitiría aumentar el rango de búsqueda de posibles COINs específicos. El descubrimiento de nuevas dianas moleculares permitirá el desarrollo de nuevos compuestos potentes, efectivos, específicos y capaces reducir la frecuencia de transferencia de plásmidos y obstaculizar la diseminación de ARGs.

Evaluar el efecto de compuestos naturales y/o sintéticos sobre diferentes plásmidos puede servir como estrategia para determinar qué elemento del sistema de secreción actúa como diana. Si al analizar el comportamiento de las sustancias inhibitoras parecen tener un efecto anticonjugativo en muchos plásmidos con sistemas de secreción diferentes, podríamos asegurar que la diana sobre la que actúa el inhibidor es común a todos los sistemas de secreción analizados. Si el efecto del compuesto difiere entre plásmidos, sabremos que el componente sobre el que actúa no es común a todos los plásmidos, lo que explica las posibles respuestas. Es por ello que se necesita un mayor conocimiento de la estructura de los diferentes sistemas de secreción, así como una mayor investigación relacionada con la búsqueda de posibles COINs específicos.

## 5. Conclusiones

1. Diversos estudios han identificado compuestos inhibidores de la conjugación, pero no se ha definido cuál es la diana molecular sobre la que actúan los mismos.
2. El conocimiento detallado de varios de los elementos implicados en la maquinaria de transferencia conjugativa, ha permitido identificar la diana molecular de algunos COINs específicos candidatos.
3. Los compuestos inhibidores estudiados han utilizado como dianas principales las proteínas VirB8, la ATPasa VirB11 y el pili conjugativo para la inhibición de la conjugación.
4. Los compuestos que han demostrado mayor eficacia para la inhibición de VirB8 fueron B8I-2 y las moléculas 239852 y 105055. Por otro lado, VirB11 es diana de ácidos grasos insaturados, 2-aFAs y los ácidos tanzawaicos.
5. Un estudio más completo de la estructura de los diferentes sistemas de conjugación permitiría identificar nuevas dianas para una inhibición de amplio espectro.
6. Muchos compuestos han mostrado actividad inhibitoria de la conjugación *in vitro*, pero no han sido evaluados *in vivo*. El conocimiento de la actividad inhibitoria de la conjugación de los COINs *in vivo* es fundamental para valorar su utilidad para atacar el problema de la resistencia a los antibióticos.
7. Únicamente se ha conseguido localizar un artículo en el que se evalúa la actividad inhibitoria de la conjugación *in vivo*. Probablemente, la escasez de estudios *in vivo* se debe a la dificultad que supone llevar a cabo un diseño experimental que permita la cuantificación fiable de la eficiencia de la conjugación en ambientes naturales.

## 6. Conclusions

1. Several studies have identified conjugation inhibitory compounds but the molecular target on which they act has not been defined
2. Detailed knowledge of several of the elements involved in the conjugative transfer machinery has made it possible to identify the molecular target of some specific candidate COINs.
3. The inhibitory compounds studied have used VirB8 proteins, VirB11 ATPase and the conjugative pili as main targets for the inhibition of conjugation.
4. The compounds that have been shown the highest efficacy in inhibiting VirB8 were B8I-2 and the molecules 239852 and 105055. On the other hand, VirB11 targets unsaturated fatty acids, 2-aFAs and tanzawaic acids.
5. A more complete study of the structure of the different conjugation systems could serve to allow new targets for broad-spectrum inhibition.
6. Many compounds have shown conjugation inhibitory activity *in vitro* but have not been evaluated *in vivo*. Knowledge of the conjugation inhibitory activity of COINs *in vivo* is essential to assess their usefulness in tackling the problem of antibiotic resistance.
7. Only one article evaluating the inhibitory activity of conjugation *in vivo* has been located. The scarcity of *in vivo* studies is probably due to the difficulty of carrying out an experimental design that allows reliable quantification of conjugation efficiency in natural environments.

## 7. Bibliografía

- Álvarez-Rodríguez, I., Arana, L., Ugarte-Urbe, B., Gómez-Rubio, E., Martín-Santamaría, S., Garbisu, C., & Alkorta, I. (2020). Type IV Coupling Proteins as Potential Targets to Control the Dissemination of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 201. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00201>
- Aslam, B., Rasool, M., Idris, A., Muzammil, S., Alvi, R. F., Khurshid, M., Rasool, M. H., Zhang, D., Ma, Z., & Baloch, Z. (2020). CRISPR-Cas system: A potential alternative tool to cope antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9, 131. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00795-6>
- Boudaher, E., & Shaffer, C. L. (2019). Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance. *MedChemComm*, 10, 682–692. <https://doi.org/10.1039/c9md00076c>
- Buckner, M. M. C., Ciusa, M. L., & Piddock, L. J. V. (2018). Strategies to combat antimicrobial resistance: Anti-plasmid and plasmid curing. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(6), 781–804. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy031>
- Cabezón, E., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2017). Conjugation Inhibitors and Their Potential Use to Prevent Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02329>
- Carranza, G., Menguiano, T., Valenzuela-Gómez, F., García-Cazorla, Y., Cabezón, E., & Arechaga, I. (2021). Monitoring Bacterial Conjugation by Optical Microscopy. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750200>
- Casu, B., Arya, T., Bessette, B., & Baron, C. (2017). Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101. *Scientific Reports*, 7(1), 14907. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14953-1>
- Casu, B., Smart, J., Hancock, M. A., Smith, M., Sygusch, J., & Baron, C. (2016). Structural Analysis and Inhibition of TraE from the pKM101 Type IV Secretion System. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23817–23829. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.753327>
- Christie, P. J., & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Molecular Membrane Biology*, 22(1–2), 51–61. <https://doi.org/10.1080/09687860500063316>
- Cooper, M. A., & Shlaes, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472(7341), 32. <https://doi.org/10.1038/472032a>
- Fernandez-Lopez, R., Machón, C., Longshaw, C. M., Martin, S., Molin, S., Zechner, E. L., Espinosa, M., Lanka, E., & de la Cruz, F. (2005). Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation. *Microbiology*, 151, 3517–3526. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28216-0>
- Fernández López, C. (2016). *Relaxasas conjugativas de la familia MOBv* [Universidad Complutense de Madrid]. <http://digital.csic.es/handle/10261/128976>
- Fronzes, R., Schäfer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V., & Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, 323(1), 266–268. <https://doi.org/10.1126/science.1166101>
- García-Cazorla, Y., Getino, M., Sanabria-Ríos, D. J., Carballeira, N. M., De La Cruz, F., Arechaga, I., & Cabezón, E. (2018). Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16923–16930. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004716>
- Garcillán-Barcia, M. P., Jurado, P., González-Pérez, B., Moncalián, G., Fernández, L. A., & De La Cruz, F. (2007). Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. *Molecular Microbiology*, 63(2), 404–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05523.x>
- Getino, M., & de la Cruz, F. (2018). Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 6(1).

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0015-2016>

- Getino, M., Fernández-López, R., Palencia-Gándara, C., Campos-Gómez, J., Sánchez-López, J. M., Martínez, M., Fernández, A., & De La Cruz, F. (2016). Tanzawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors. *PLoS ONE*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148098>
- Getino, M., Sanabria-Ríos, D. J., Fernández-López, R., Campos-Gómez, J., Sánchez-López, J. M., Fernández, A., Carballeira, N. M., & De La Cruz, F. (2015). Synthetic fatty acids prevent plasmid-mediated horizontal gene transfer. *MBio*, *6*(5), e01032–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01032-15>
- Gholizadeh, P., Aghazadeh, M., Ghotaslou, R., Rezaee, M. A., Pirezadeh, T., Cui, L., Watanabe, S., Feizi, H., Kadkhoda, H., & Kafil, H. S. (2021). Role of CRISPR-Cas system on antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *20*, 49. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00455-6>
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2014). Conjugation in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology Spectrum*, *2*(4), PLAS-0004-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0004-2013>
- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Huisman, J. S., Benz, F., Duxbury, S. J. N., de Visser, J. A. G. M., Hall, A. R., Fischer, E. A. J., & Bonhoeffer, S. (2022). Estimating plasmid conjugation rates: A new computational tool and a critical comparison of methods. *Plasmid*, *121*, 102627. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2022.102627>
- Jakubowski, S. J., Kerr, J. E., Garza, I., Krishnamoorthy, V., Bayliss, R., Waksman, G., & Christie, P. J. (2009). Agrobacterium VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Molecular Microbiology*, *71*(3), 779–794. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06565.x>
- Kwapong, A. A., Stapleton, P., & Gibbons, S. (2018). A new dimeric imidazole alkaloid plasmid conjugation inhibitor from *Lepidium sativum*. *Tetrahedron Letters*, *59*, 1952–1954. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.04.028>
- Kwapong, A. A., Stapleton, P., & Gibbons, S. (2019). Inhibiting plasmid mobility: The effect of isothiocyanates on bacterial conjugation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *53*, 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.01.011>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, *20*, 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Laverde, D., Probst, I., Romero-Saavedra, F., Kropec, A., Wobser, D., Keller, W., Grohmann, E., & Huebner, J. (2017). Targeting Type IV Secretion System Proteins to Combat Multidrug-Resistant Gram-positive Pathogens. *Journal of Infectious Diseases*, *215*, 1836–1845. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix227>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, *65*, 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Lin, A., Jimenez, J., Derr, J., Vera, P., Manapat, M. L., Esvelt, K. M., Villanueva, L., Liu, D. R., & Chen, I. A. (2011). Inhibition of Bacterial Conjugation by Phage M13 and Its Protein g3p: Quantitative Analysis and Model. *PLoS ONE*, *6*(5), e19991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019991>
- Low, H. H., Gubellini, F., Rivera-Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., Lu, F., Redzej Fronzes, R., Fronzes, R., Orlova, E. V., & Waksman, G. (2014). *Structure of a Type IV Secretion system* (Vol. 508, pp. 550–567). Macmillian Publishers Limited. <https://doi.org/10.1038/nature13081>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., & Stahl, D. A. (2015). Genética de bacteria y archaea. In M. Martín-Romo (Ed.), *Brock. Biología de los microorganismos* (14th ed.). Pearson.

- Maree, J. E., Khondkar, P., Kwapong, A. A., Oyedemi, B. M., Aljarba, T. M., Stapleton, P., Viljoen, A. M., & Gibbons, S. (2014). Bioactive acetophenones from *Plectranthus venteri*. *Phytochemistry Letters*, *10*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.10.021>
- Mossey, P., Hudacek, A., & Das, A. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *American Society for Microbiology*, *192*(11), 2830–2838. <https://doi.org/10.1128/JB.01331-09>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Oyedemi, B. O. M., Shinde, V., Shinde, K., Kakalou, D., Stapleton, P. D., & Gibbons, S. (2016). Novel R-plasmid conjugal transfer inhibitory and antibacterial activities of phenolic compounds from *Mallotus philippensis* (Lam.) Mull. Arg. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *5*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.01.011>
- Palencia-Gándara, C., Getino, M., Moyano, G., Redondo, S., Fernández-López, R., González-Zorn, B., & de la Cruz, F. (2021). Conjugation inhibitors effectively prevent plasmid transmission in natural environments. *MBio*, *12*(4), e0127721. <https://doi.org/10.1128/mBio.01277-21>
- Paschos, A., den Hartigh, A., Smith, M. A., Atluri, V. L., Sivanesan, D., Tsohis, R. M., & Baron, C. (2011). An in vivo high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation. *Infection and Immunity*, *79*(3), 1033–1043. <https://doi.org/10.1128/IAI.00993-10>
- Patwardhan, R. B., Dhakephalkar, P. K., Chopade, B. A., Dhavale, D. D., & Bhone, R. R. (2018). Purification and characterization of an active principle, lawsone, responsible for the plasmid curing activity of *Plumbago zeylanica* root extracts. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2618. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02618>
- Ripoll-Rozada, J., García-Cazorla, Y., Getino, M., Machón, C., Sanabria-Ríos, D., de la Cruz, F., Cabezón, E., & Arechaga, I. (2016). Type IV traffic ATPase TrwD as molecular target to inhibit bacterial conjugation. *Molecular Microbiology*, *100*(5), 912–921. <https://doi.org/10.1111/mmi.13359>
- Ripoll-Rozada, J., Zunzunegui, S., de la Cruz, F., Arechaga, I., & Cabezón, E. (2013). Functional Interactions of VirB11 Traffic ATPases with VirB4 and VirD4 Molecular Motors in Type IV Secretion Systems. *Journal of Bacteriology*, *195*(18), 4195–4201. <https://doi.org/10.1128/JB.00437-13>
- Russi, S. (2009). Estudios estructurales de relaxasas involucradas en el proceso de conjugación bacteriana [Universitat Autònoma de Barcelona]. In *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/3835>
- Shaffer, C. L., Good, J. A. D., Kumar, S., Krishnan, K. S., Gaddy, J. A., Loh, J. T., Chappell, J., Almqvist, F., Cover, T. L., Hadjifrangiskou, M., Shaffer, C. C. L., Jad, G., & Norris, E. J. S. (2016). Peptidomimetic Small Molecules Disrupt Type IV Secretion System Activity in Diverse Bacterial Pathogens. *American Society for Microbiology*, *7*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00221-16>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studing plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature*, *3*, 700–710.
- Voth, D. E., Broederdorf, L. J., & Graham, J. G. (2012). Bacterial Type IV Secretion Systems: Versatile Virulence Machines. *Future Microbiology*, *7*(2), 241–257. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.150>
- Walsh, T. R. (2018). A one-health approach to antimicrobial resistance. *Nature Microbiology*, *3*, 854–855. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0208-5>
- Wang, C.-H., Hsieh, Y.-H., Powers, Z. M., & Kao, C.-Y. (2020). Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 1061.