

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Programa de posgrado en Ciencias de la Vida

**Función de las porinas de *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium en el proceso de desintoxicación con
nanopartículas de plata**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de Maestro en

Ciencias

Presenta:

Mónica Vásquez Peña

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Mónica Vásquez Peña

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector

Dr. Francisco José Ipinza Fernández-Dávila
Codirector

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dr. Víctor Ruiz Cortés



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Mónica Vásquez Peña © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis que presenta **Mónica Vásquez Peña** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en ciencias de la vida con orientación en biotecnología marina.

Función de las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el proceso de desintoxicación con nanopartículas de plata

Resumen aprobado por:

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector

En este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata (AgNPs) en mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) deficientes en porinas clásicas (OmpC, OmpF y OmpD) y porinas de bajo nivel de expresión (OmpS2, OmpS1, OmpW y OmpL). Se comparó la viabilidad bacteriana de las cepas silvestres contra sus respectivas mutantes en donde se encontró que las porinas OmpC y OmpS1 pueden estar participando en la entrada de iones de plata debido a que las mutantes $\Delta ompS1$ y $\Delta ompC$ muestran una tendencia de resistencia hacia las AgNPs, lo contrario para las mutantes $\Delta ompS2$ y $\Delta ompF$, que parecen ser más sensibles en presencia de AgNPs, por lo que se sugiere que están participando en la salida de iones plata. Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de algunas porinas pueden aumentar o disminuir en presencia de AgNPs. Por lo cual se realizó un análisis a nivel genético por medio de RT-qPCR, con el fin de comparar los resultados obtenidos de viabilidad bacteriana y los niveles de expresión de los genes que codifican para las porinas. Los resultados sugieren que la mayoría de las porinas no participan como mecanismo de defensa principal contra la presencia de AgNPs. Sin embargo OmpS2 considerada como una porina de bajo nivel de expresión, aumentó significativamente su expresión de igual manera que la OmpD considerada como la porina más abundante de *S. Typhimurium*. Además, en las pruebas de viabilidad bacteriana se observó que la mutante $\Delta ompS2$ presentó una viabilidad menor en comparación a la cepa silvestre y las otras mutantes deficientes en porinas expuestas a AgNPs.

Palabras clave: AgNPs, efecto antimicrobiano, porinas, *S. Typhimurium*

Abstract of the thesis presented by **Mónica Vásquez Peña** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life science with orientation in marine biotechnology.

Effect of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium porins in the detoxification process with silver nanoparticles

Abstract approved by:

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector

In this work we evaluated the antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) mutants deficient in classical porins (OmpC, OmpF and OmpD) and low expression level porins (OmpS1, OmpS2, OmpW and OmpL). We compared bacterial viability of wild-type strains against their isogenic mutants, where we found that the porins OmpC and OmpS1 may participate in the influx of silver ions because the $\Delta ompS1$ and $\Delta ompC$ mutants showed a tendency of resistance to AgNPs, the contrary for the $\Delta ompS2$ and $\Delta ompF$ that apparently they seem to be more sensitive in the presence of AgNPs, that why we suggest that they may be involved in the efflux of silver ions. These results suggested that the relative expression of some porins exposed to AgNPs may increase or decrease. Therefore, an analysis at a genetic level was performed using RT-qPCR in order to compare the results of bacterial viability and relative gene expression of porins.

Do to this results we concluded that mostly all porins do not participate as main defense mechanism against the presence of AgNPs. However, OmpS2 considered as a low expression porin, it significantly increased its expression just as OmpD, considered the most abundant porin of *S. Typhimurium*. Furthermore, in bacterial viability testing we observed that $\Delta ompS2$ presented a decreased viability compared to the wild-type and other mutants deficient in porins exposed to AgNPs.

Keywords: AgNPs, antimicrobial effect, porins, *S. Typhimurium*

Dedicatoria

A mi familia por apoyarme siempre y brindarme su amor incondicional.

A mis amigos por cuidarme y formar parte de esta gran aventura.

Agradecimientos

A mis codirectores de tesis, Dr. Alejandro Huerta Saquero y Dr. Francisco José Ipinza Fernández-Dávila por brindarme su entera disponibilidad, conocimiento y paciencia.

Al Dr. Víctor Ruiz Cortés por su interés en la metodología y su disposición.

A la Dra. Ernestina Castro Longoria por su apoyo en la parte experimental.

Al Dr. Javier Pérez por el apoyo en el análisis de datos.

A la Dra. Katrin Quester por siempre imponer orden y fomentar la convivencia dentro del laboratorio.

Dra. Maritza García García por su apoyo en el análisis de datos de RT-qPCR.

Dra. Nina Bogdanchikova por proporcionar las nanopartículas de plata (Argovit) utilizadas en este proyecto.

Agradezco a la red Internacional de Bionanotecnología del CONACyT por sugerencias y comentarios a este trabajo.

A CONACYT por la beca otorgada durante la maestría, así como a CICESE y al CNYN-UNAM por haberme aceptado al posgrado y darme la oportunidad de estudiar en sus instalaciones.

Al proyecto PAPIIT RN204815 por su financiamiento otorgado para el proyecto.

A mis padres y hermano, por siempre estar al pendiente de mi bienestar, gracias por su enseñanza y valiosos consejos, los amo.

A mi familia por sus buenos deseos y su apoyo.

A Erick por su gran paciencia, por cuidar de mí, apoyo de todo tipo y sobre todo gracias por esos momentos únicos de felicidad.

A mis amigos, Marco, Moisés, Enrique, Juanpy, Elena, Paulina, Aldo, Alex, Fer, Yuli, Kee y a los de la traila 4!! Gracias por su amistad y hacer de estos años una gran aventura.

Tabla de contenido

| | |
|---|------------|
| Resumen en español | ii |
| Resumen en inglés | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos | v |
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tablas | xi |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Nanomateriales como nuevos agentes antimicrobianos..... | 1 |
| 1.2 Porinas..... | 3 |
| 1.2.1 Estructura de la porina..... | 5 |
| 1.2.2 Resistencia debido a mutaciones en genes que codifican la porina.... | 7 |
| 1.3 Nanopartículas de plata (AgNPs)..... | 9 |
| 1.4 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium..... | 10 |
| 1.5 Antecedentes..... | 12 |
| 1.6 Justificación..... | 14 |
| 1.7 Hipótesis..... | 14 |
| 1.8 Objetivo general..... | 14 |
| 1.9 Objetivos particulares..... | 14 |
| | |
| Capítulo 2. Métodos experimentales | 15 |
| 2.1 Materiales..... | 15 |
| 2.1.1 Cepas parentales ATCC 14028 y 14028s..... | 15 |
| 2.1.2 Mutantes isogénicas de porinas de <i>Salmonella</i> Typhimurium..... | 15 |
| 2.1.3 Conservación de las cepas bacterianas..... | 15 |
| 2.1.4 Medio líquido y sólido Luria-Bertani..... | 16 |

| | | |
|------------------------------------|---|-----------|
| 2.1.5 | Medio mínimo MMN y M9..... | 16 |
| 2.1.6 | Nanopartículas de plata..... | 16 |
| 2.1.7 | Diseño de oligonucleótidos | 17 |
| 2.2 | Experimental..... | 18 |
| 2.2.1 | Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana por medio de distintas técnicas microbiológicas | 18 |
| 2.2.1.1 | Determinación de la concentración mínima inhibitoria a través de macrodiluciones..... | 18 |
| 2.2.1.2 | Determinación de la concentración mínima bactericida a través de macrodiluciones..... | 21 |
| 2.2.1.3 | Diluciones seriadas..... | 21 |
| 2.2.2 | Análisis de la expresión genética de los genes de interés de la cepa <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y 14028s..... | 23 |
| 2.2.2.1 | Purificación de DNA total de bacteria..... | 23 |
| 2.2.2.2 | Purificación de RNA de <i>S. Typhimurium</i> con y sin tratamiento de AgNPs..... | 23 |
| 2.2.2.3 | Reacción en cadena de la polimerasa..... | 25 |
| 2.2.2.4 | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)..... | 26 |
| Capítulo 3. Resultados..... | | 29 |
| 3.1 | Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria..... | 29 |
| 3.1.1 | <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y 14028s y mutantes isogénicas de porinas.. | 29 |
| 3.2 | Determinación de la Concentración Mínima Bactericida..... | 30 |
| 3.2.1 | <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 y 14028s y mutantes isogénicas de porinas.. | 30 |
| 3.3 | Diluciones seriadas..... | 31 |
| 3.4 | Reacción en cadena de la polimerasa..... | 34 |
| 3.5 | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, RT-qPCR..... | 37 |
| Capítulo 4. Discusión..... | | 40 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 5. Conclusiones..... | 44 |
| Capítulo 6. Perspectivas..... | 45 |
| Lista de referencias bibliográficas..... | 46 |

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Posibles mecanismos de acción de AgNPs en microorganismos..... | 2 |
| Figura 2. Estructura de la envoltura de una bacteria Gram negativa..... | 4 |
| Figura 3. Estructura 3D de la porina OmpF de <i>E.coli</i> | 7 |
| Figura 4. Diferentes mecanismos de adquisición de resistencia asociada a mutaciones en las porinas..... | 8 |
| Figura 5. Ruta de infección de la <i>Salmonella</i> | 11 |
| Figura 6. Proteínas de membrana externa de cepas de <i>E. coli</i> susceptibles a Ag y sus mutantes resistentes a Ag..... | 13 |
| Figura 7. Valores de MIC para las cepas mutantes de <i>E. coli</i> K-12 deficientes en porinas relativo a la MIC de la cepa silvestre <i>E. coli</i> MC 4100..... | 13 |
| Figura 8. Método de macrodiluciones para a) ensayo de MIC y b) ensayo de MBC..... | 19 |
| Figura 9. SYBR Green como marcador intercalante..... | 27 |
| Figura 10. MIC de cepas parentales y mutantes utilizando medio LB..... | 30 |
| Figura 11. MIC de cepas parentales utilizando medio MMN | 30 |
| Figura 12. MBC de cepas parentales y mutantes utilizando LB como medio..... | 32 |
| Figura 13. MBC de cepas parentales y mutantes utilizando M9 como medio..... | 32 |
| Figura 14. MBC de cepa parental y sus mutantes isogénicas utilizando MMN como medio..... | 30 |
| Figura 15. Formación de colonias..... | 33 |
| Figura 16. Viabilidad de las cepas parentales y sus mutantes isogénicas en porinas expuestas a 200µg/mL de AgNPs por 30 minutos | 33 |
| Figura 17. Verificación de pureza del RNA de las cepas parentales de <i>S. Typhimurium</i> | 35 |
| Figura 18. Amplificación de genes de interés a partir del DNA de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028..... | 35 |
| Figura 19. Verificación de integridad del RNA de las cepas parentales de <i>S. Typhimurium</i> | 36 |
| Figura 20. Eficiencia de amplificación..... | 37 |
| Figura 21. Expresión relativa de los genes de porinas de <i>S. Typhimurium</i> expuestas a 200µg/mL de AgNPs durante 30 minutos, con respecto a los valores obtenidos del gen calibrador..... | 39 |

Figura 22. Papel de las porinas como medio de entrada y salida de iones de plata.....41

Lista de tablas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1. | Función y generalidades de las porinas de <i>Salmonella</i> | 6 |
| Tabla 2. | Cepas bacterianas parentales y mutantes isogénicas de porinas de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium utilizadas en este proyecto..... | 16 |
| Tabla 3. | Oligonucleótidos para RT-qPCR..... | 17 |
| Tabla 4. | Concentración de AgNPs en medio rico en nutrientes..... | 20 |
| Tabla 5. | Concentración de AgNPs en medio mínimo en nutrientes..... | 20 |
| Tabla 6. | Parámetros de ciclo para RT-qPCR de un solo paso..... | 28 |
| Tabla 7. | MIC en diferentes medios de cultivo en cepas parentales y sus mutantes isogénicas..... | 29 |
| Tabla 8. | MBC en diferentes medios de cultivo para <i>S. Typhimurium</i> | 31 |
| Tabla 9. | Expresión relativa de los genes de interés..... | 38 |

Capítulo 1. Introducción

En este capítulo se hablará acerca de conceptos generales necesarios para comprender el contexto del proyecto, dentro de los cuales se encuentran al microorganismo de estudio *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se explicará su importancia y generalidades de la bacteria Gram negativa. Las nanopartículas de plata también es otro tema importante a discutir ya que se han utilizado como nuevos agentes antimicrobianos. Además tenemos a las porinas que se evaluaron en este proyecto que son las porinas, existe una diversidad de estas proteínas y cada uno cumple con una función distinta como se verá más adelante. Finalmente se argumentara acerca de trabajos previos que trabajaron con las porinas expuestas a diferentes agentes antimicrobianos como metales pesados y antibióticos tradicionales.

1.1 Nanomateriales como nuevos agentes antimicrobianos

Debido a enfermedades causadas por diversas bacterias patógenas existe la necesidad de sintetizar agentes antimicrobianos, como antibióticos tradicionales. Sin embargo, el uso inapropiado de estos antibióticos causa efectos adversos ya que las bacterias generan resistencia (Cirz, *et al.*, 2005). Considerando esta gran desventaja, los avances en la nanociencia y nanotecnología han hecho posible desarrollar nuevas alternativas para controlar la infección microbiana, dentro de los cuales se encuentran a las nanopartículas basadas en metales pesados como Cu, Ti, Mg, Zn, Au, Ag, entre otros (Ahmad, 2005). Los nanomateriales pueden actuar como potenciales agentes antimicrobianos dado que su área superficial es extremadamente grande en relación a su tamaño, esto conlleva a una mayor interacción con el microorganismo, dando oportunidad de ejercer un mejor efecto bactericida.

El efecto de la plata y sus derivados ha sido reconocido desde tiempos antiguos, se han aplicado para tratar quemaduras, infecciones, heridas, purificación del agua, etc. (Avalos *et al.*, 2014; Elliot, 2010; Aditya *et al.*, 2013). No obstante, a escala nanométrica, las propiedades de la plata cambian dramáticamente haciendo su efecto antimicrobiano más eficaz. Por consiguiente, entre todas las nanopartículas metálicas,

las nanopartículas de Plata (AgNPs) son las más utilizadas como agente antimicrobiano en contra de bacterias, virus y hongos (Rai *et al.*, 2009).

Queda claro que se le ha dado un sinfín de usos a las AgNPs por sus propiedades singulares, sin embargo, varios puntos de controversia quedan por resolver, uno de ellos muy importante es el mecanismo de acción de las AgNPs, ¿cuál es la interacción que existe entre este nanomaterial y un microorganismo? Diferentes autores han propuesto diversos mecanismos de acción, los más citados se describen a continuación: **(1)** daño en la membrana celular, lo que provoca cambios estructurales haciendo a la bacteria más permeable (Lazar, 2011, Periasamy, *et al.*, 2012), **(2)** liberación de iones plata, causando daño a las enzimas por la afinidad que tienen hacia grupos funcionales tales como tioles y fosfatos (Choi, *et al.*, 2008), **(3)** generación de especies reactivas de oxígeno “ROS”, formando radicales libres (Wu, *et al.*, 2014) y **(4)** interferencia con la replicación bacteriana por medio de la adherencia a los ácidos nucleicos (Naraginti, *et al.*, 2014) (Figura 1).

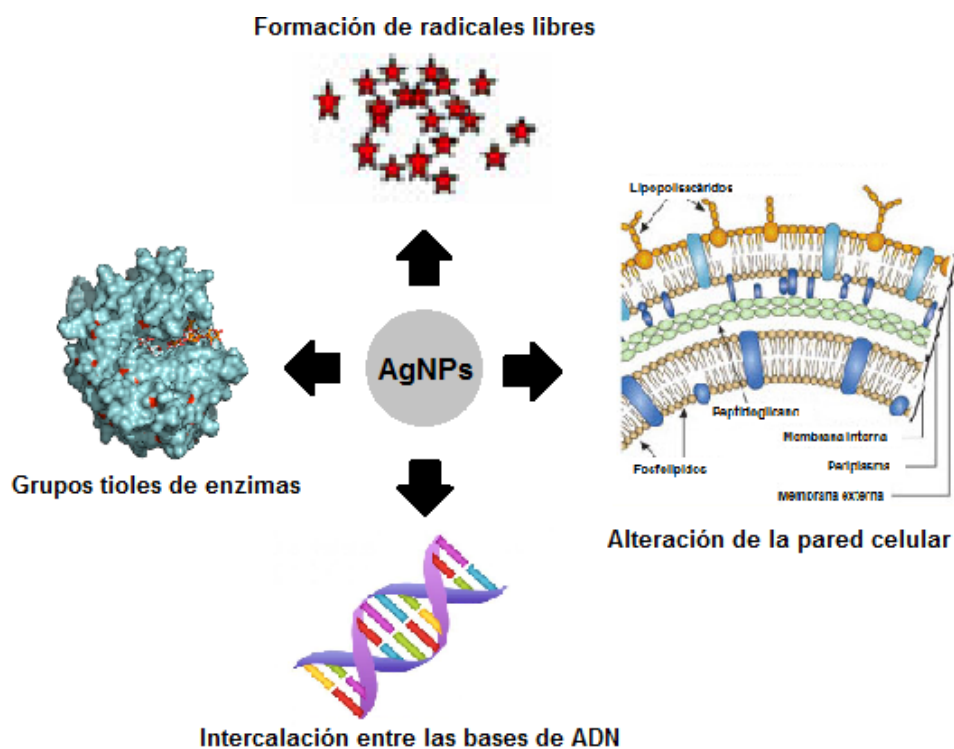


Figura 1. Posibles mecanismos de acción de AgNPs en microorganismos

Radzig, *et al.*, (2013) evaluaron el papel que juegan las porinas en presencia de AgNPs en *E. coli*, demostrando que OmpF y OmpC son factores importantes contra la acción antibacteriana de AgNPs, debido a que parecen estar involucradas en la salida de iones plata. Las porinas pertenecen a un grupo de proteínas ubicadas en la membrana externa “outer membrane protein” (OMP), forman canales que permiten la difusión pasiva de solutos pequeños menores a 600 Da, además presentan preferencia por el tamaño y carga del soluto transportado.

Sin embargo el rol de las porinas bacterianas en relación a su sensibilidad a AgNPs no ha sido caracterizado por completo. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de las AgNPs con mutantes de *S. Typhimurium* deficientes en porinas clásicas (OmpC, OmpF y OmpD) y de bajo nivel de expresión (OmpS1, OmpS2, OmpL y OmpW). Es importante destacar que cada porina tiene diferentes características y se pueden clasificar como clásicas, las cuales se expresan en condiciones estándares y de bajo nivel de expresión, donde se producen en condiciones específicas. A continuación se explicará con más detalle las características de estas proteínas.

1.2 Porinas

Las bacterias Gram negativas como la *S. Typhimurium*, están cubiertas por una membrana externa, membrana interna y una capa de peptidoglicanos (Figura 2). La membrana externa es la primera línea de defensa en contra de compuestos tóxicos, comprende una bicapa lipídica y tienden a excluir compuestos lipofílicos y no mayores a 600 Da (Nikaido, 2003).

En la membrana externa residen proteínas de membrana externa (OMPs), entre ellas se encuentran las porinas. Estas proteínas controlan principalmente la entrada de compuestos y la salida de productos de desecho, forman canales acuosos y permite la entrada pasiva de moléculas hidrofílicas. Diferentes tipos de porinas se han caracterizado y clasificado de acuerdo a su actividad (canales no específicos o canales específicos), su estructura funcional (monomérica o trimérica), su regulación y expresión (Nikaido, 2003; Delcour, 2003; Schulz, 2002; Koebnik, *et al.*, 2000; Guillier, *et al.*, 2006 y Pagès, 2004).

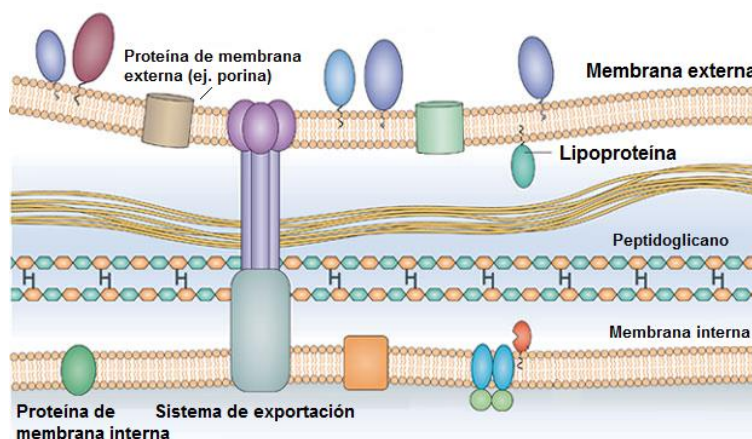


Figura 2. Estructura de la envoltura de una bacteria Gram negativa. Su composición está conformada por una membrana interna, periplasma y una membrana externa. La membrana externa contiene proteínas de membrana externa (OMP), dentro de las cuales se encuentran las porinas que están involucradas en el transporte, entrada o salida de compuestos de diversos tamaños, nutrientes o moléculas tóxicas (Modificado de Radolf *et al.* 2012).

Existen las llamadas porinas clásicas, los miembros de esta familia se pueden clasificar de acuerdo a sus filtros selectivos con respecto a la carga y tamaño de los solutos, las porinas OmpF y OmpC muestran una preferencia hacia los cationes (Nikaido, 2003; Delcour, 2003; Schulz, 2002 y Koebnik, *et al.*, 2000).

Solo en *S. Typhimurium* existe la porina OmpD como la porina más abundante, está presente 10^5 copias/célula bajo condiciones aeróbicas, se ha reportado que en condiciones favorables OmpD representa la mitad de las porinas y junto con OmpF y OmpC se encuentran dentro de 1×10^5 - 2×10^5 porinas/célula. En ausencia de esta porina, *S. Typhimurium* está involucrada en la resistencia de metil viológeno “paraquat” (Santiviago, *et al.*, 2003).

Además de las porinas clásicas existen las porinas de bajo nivel de expresión como las porinas OmpS1, OmpS2, OmpL y OmpW. En ausencia de la porina OmpS1 se ha reportado que causa defectos en la motilidad y formación de biofilms en *S. Typhimurium* (Flores-Valdez, *et al.*, 2003). Sin embargo, en ausencia de OmpS1 y OmpS2 se observa una atenuación de virulencia en ratones Balb/c (De la Cruz, *et al.*, 2010).

Por otro lado no se sabe mucho acerca de la función de la porina OmpL, se han reportado análisis estructurales y se ha propuesto como potencial candidato para una vacuna para las infecciones causadas por *Salmonella* (Yang, *et al.*, 2013).

Finalmente la porina OmpW se ha reportado que tiene como función la entrada de hierro, el cual se conoce que juega un papel central en la interferencia de la infección patógena del huésped, por lo tanto esta porina juega un papel importante en la protección durante la invasión bacteriana del huésped (Wu, *et al.*, 2013).

En la Tabla 1 se resume la función y generalidades de las porinas que se evaluaron en este proyecto.

1.2.1 Estructura de la porinas

Las estructuras cristalinas de las porinas de *Escherichia coli* (*E. coli*) indican que pueden estar formadas por uno (monomérica) o más monómeros, cada subunidad monomérica está compuesta de una cadena polipeptídica la cual atraviesa la membrana 16 veces en forma de hebras β antiparalelas, formando una estructura tipo barril β (Schulz, 2002). OmpF de *E. coli* es la porina más estudiada, funcional y estructuralmente (Cowan, *et al.*, 1992) (Figura 3). Por consiguiente, varias mutantes de OmpF se han construido para examinar el rol de residuos específicos. Dentro de la porina existe un área de constricción (región eyelet), el cual se conoce que dirige la difusión de las moléculas cargadas, ya que esta área está compuesta de residuos que generan un campo electrostático. Estudios electrofisiológicos se han enfocado principalmente en el clúster de residuos cargados positivamente (Lys16, Arg42, Arg82 y Arg132) y negativamente (Asp113, Glu117 y Asp119) (Nikaido, 2003, Delcour, 2003).

Las porinas clásicas OmpC y OmpF de *E. coli*, forman trímeros estables. OmpF (1.2 nm) parece tener un canal ligeramente más grande que el de OmpC (1.1 nm). Por otro lado, *S. Typhimurium* tiene OmpD en adición a OmpC y OmpF como porinas generales (Saier *et al.*, 2006). Además tiene dos porinas secundarias aparentemente inactivas, OmpS1 y OmpS2, que están sujetas a mecanismos de regulación compleja (De la Cruz, *et al.*, 2007).

Tabla 1. Función y generalidades de las porinas de *Salmonella*

| Porina | Función | Generalidades |
|--------------|--|--|
| OmpC | -Atenuación de virulencia en doble mutante de OmpC y OmpF (Chatfield, <i>et al.</i> , 1991). -Es más selectivo a cationes que OmpF (Nikaido, 1992). | -Es una porina altamente conservada en la familia Enterobacteriaceae junto con OmpF (Moya-Torres, <i>et al.</i> , 2014). -Junto con OmpF y OmpD existen 1×10^5 - 2×10^5 porinas/célula (Santiviago, <i>et al.</i> , 2003). |
| OmpF | -Preferencia hacia los cationes (Nikaido, 1992). -Controla el flujo de β -lactámicos y fluoroquinolonas (Masi, <i>et al.</i> , 2013). | -Es un trímero de 35kDa (Nikaido, 1992). |
| OmpS1 | -En su ausencia causa defectos en la motilidad y formación de biofilms (Flores-Valdez, <i>et al.</i> , 2003). -Doble mutante de OmpS1 y OmpS2 atenúa la virulencia en ratones Balb/c. | -Su expresión no es afectada por cambios en la osmolaridad, pH y temperatura como las porinas clásicas (Flores-Valdez, <i>et al.</i> , 2003). |
| OmpS2 | -Tiene una función importante en las primeras etapas de infección (Fernández-Mora, <i>et al.</i> , 2004). | -Muestra secuencias similares con OmpS1 (Moreno-Eutimio, <i>et al.</i> , 2013). |
| OmpD | -Resistencia al metil viológeno. -Media la entrada de H ₂ O ₂ (ROS) y NaOCl, en ausencia de esta porina, es más resistente a estos compuestos. -Blanco de anticuerpos en respuesta a la infección de <i>S. Typhimurium</i> (Aguayo, <i>et al.</i> , 2015). | -Es la porina más abundante en <i>S. Typhimurium</i> , representando la mitad de las porinas. -Su expresión aumenta en anaerobiosis y se reprime en pH ácidos durante la infección (Gil-Cruz, <i>et al.</i> , 2009). -Tiene similitud en su secuencia de aminoácidos con las de OmpC, OmpF y PhoE. |
| OmpW | -Hace a la bacteria más resistente a la fagocitosis durante la invasión bacteriana del huésped (Wu, <i>et al.</i> , 2013). | -Forma un barril β de 8 hebras, siendo que la mayoría de las porinas forman un monómero con 16 hebras. |
| OmpL | -Candidato potencial para utilizarlo como vacuna en contra de las infecciones por <i>Salmonella</i> (Yang, <i>et al.</i> , 2013). | -Es un monómero constituido por 10 hebras. -Es un porina monomérica junto con OmpW a diferencia de las otras porinas que se utilizaron. |

En *S. Typhimurium* se ha reportado que OmpD y OmpW están involucradas en la detoxificación de las células por medio de la salida de compuestos tóxicos tales como el metil viológeno, que causa estrés oxidativo (Gil, *et al.*, 2007; Santiviago, *et al.*, 2002).

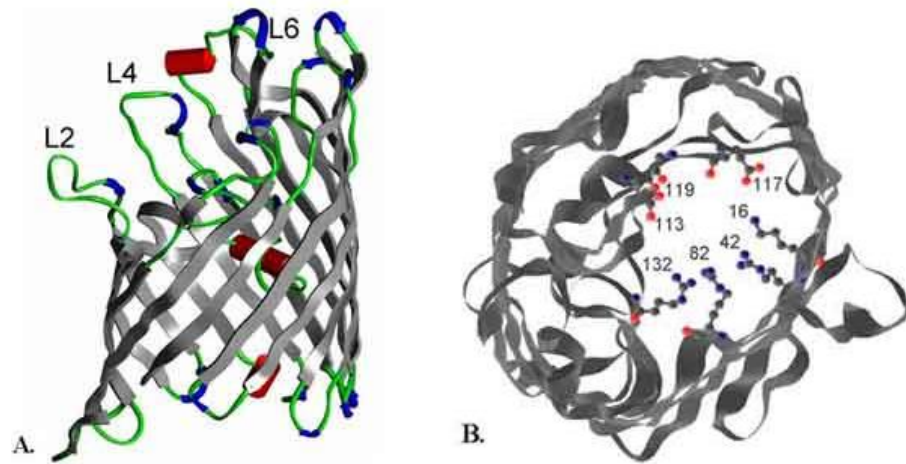


Figura 3. Estructura 3D de la porina OmpF de *E.coli*. A) Vista lateral del monómero; hebras β se muestran en listones grises, las α hélices como cilindros rojos. B) Sección transversal del monómero, visto desde el lado extracelular. Se marcan los residuos Lys16, Arg42, Arg82, Arg132, Asp113, Glu117 y Asp119, se proyectan en el poro a nivel del área de constricción. (Delcour, 2003)

1.2.2 Resistencia debido a mutaciones en genes que codifican a las porinas

Estudios realizados con bacterias y antibióticos, han demostrado que la ruta principal de entrada para antibióticos hidrofílicos es a través de las porinas. Entonces, la cantidad y el tipo de porinas que posee la célula determinará la permeabilidad y, consecuentemente, la susceptibilidad a antibióticos o resistencia del microorganismo (Fernández *et al.*, 2012).

Las mutaciones que afectan la expresión y/o función de las porinas tienen un impacto directo en la susceptibilidad de la bacteria a antimicrobianos. Estas mutaciones pueden tener diferentes efectos, así como pérdida de porinas, una modificación del tamaño o conductancia del canal de la porina, o una baja expresión del nivel de porina (Figura 4).

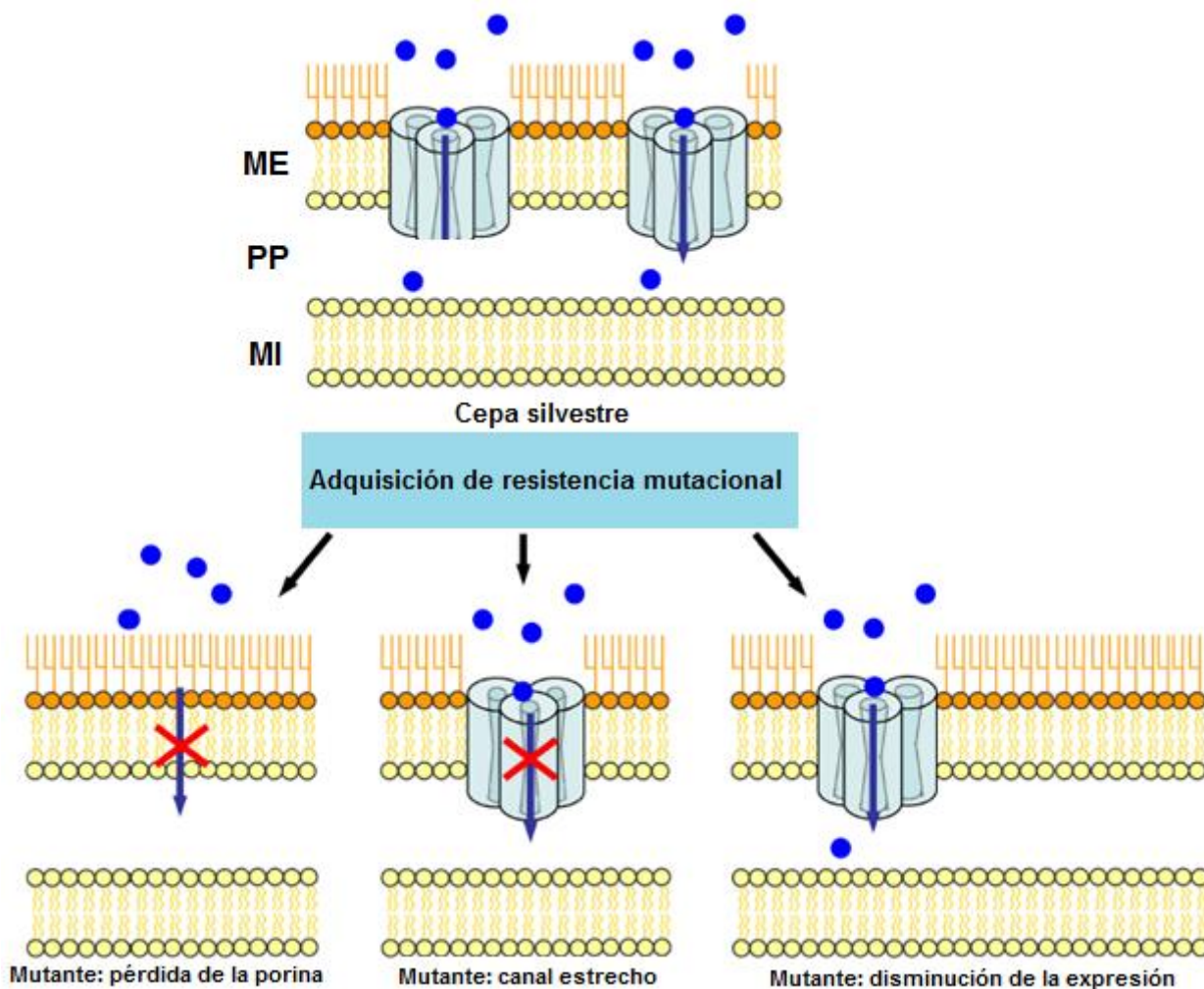


Figura 4. Diferentes mecanismos de adquisición de resistencia asociada a mutaciones en las porinas. Las esferas azules representan los antibióticos, y las cruces rojas indican que los antibióticos no pueden atravesar la membrana externa. Abreviaciones: ME, membrana externa, PP, periplasma y MI, membrana interna. (Modificado de Fernández, *et al.*, 2012)

Aunque no todas las cepas resistentes muestran una aparente reducción en el nivel de expresión de porinas, la resistencia puede deberse a mutaciones que afectan la función de la porina. Por ejemplo, se conoce que ciertas mutaciones en el loop 3 de diferentes porinas tienden a aumentar su resistencia hacia los antibióticos (Koebnik *et al.*, 2000).

Otra mutación incluye aquella que afecta a las proteínas reguladoras que controlan la expresión de genes que codifican porinas. Como el operon *ompB*, que contiene los genes *ompR* y *envZ*, que regulan la expresión de OmpC y OmpF en *E. coli*.

1.3 Nanopartículas de plata (AgNPs)

La nanotecnología se define como la comprensión y el control de la materia en dimensiones de aproximadamente 1-100 nm, donde se ven afectadas las propiedades de los nanomateriales haciéndolos excelentes candidatos para nuevas aplicaciones. Entre estos nanomateriales se encuentran las nanopartículas, éstas se consideran menores a 100 nm en más de una dimensión. Además pueden ser esféricas, tubulares, o de forma irregular y pueden existir en forma de aglomerados (Nowack, *et al.*, 2011).

El uso de nanopartículas basadas en elementos metálicos (especialmente Ag) se han estudiado bastante, incluso se han aplicado AgNPs en diferentes materiales como implantes médicos, textiles, recubrimientos de superficies, comida, entre otras (Samuel *et al.*, 2004; Durán *et al.*, 2007; Dankovich *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2010).

Existen diferentes estados de oxidación en los que se puede encontrar la plata, como iónica (sulfadiazina de plata, nitrato de plata, tiosulfato de plata, zeolita) y metálica (nanopartículas de plata); incluso se puede encontrar en óxidos de plata que toman ventaja de su baja solubilidad en ambientes acuosos para la liberación lenta de iones de plata (Lalueza *et al.*, 2011). Además como elemento natural se ha usado durante la historia por sus diversas propiedades como su maleabilidad, ductilidad, alta conductividad eléctrica y térmica. Fue hasta 1965 en donde se utilizó la plata por su actividad antiséptica para curar heridas (Werner *et al.*, 2009).

Una de las cualidades que hace a la plata tan interesante es su efecto antimicrobiano intrínseco, sin embargo, esta propiedad se puede mejorar manipulando su tamaño a escala nanométrica. Las AgNPs muestran un potencial efecto bactericida en contra de un amplio espectro de bacterias incluyendo cepas resistentes a antibióticos, además son fungicidas incluyendo hongos de los géneros *Asperigillus*, *Candida* y *Saccharomyces* (Percival *et al.*, 2007).

1.4 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

La *Salmonella* es una enterobacteria Gram negativa de la clase Gamma proteobacteria, tiene una forma bacilar, son anaerobios facultativos, tienen motilidad debido a sus flagelos y no son esporuladores (Pui *et al.*, 2011).

Existe dos tipos de especies en *Salmonella*: *bongori* y *enterica* (*S. bongori* y *S. enterica*) que a su vez se dividen en aproximadamente 2500 subespecies (serotipos) denominadas I, II, IIIa, IIIb, IV, V, VI y VII. *S. bongori* contiene la subespecie V mientras que el resto pertenecen a *S. enterica* (Brenner *et al.*, 2000; Ipinza, 2013).

La salmonelosis, causada por la bacteria *Salmonella*, es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes y ampliamente extendidas. Se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas de todo el mundo. Sin olvidar que esta bacteria es resistente, puede sobrevivir varias semanas en un entorno seco, y varios meses en agua.

Si bien todos los serotipos pueden causar la enfermedad en el ser humano, unos pocos son específicos de algunos huéspedes, por ejemplo, *Salmonella Dublin* en vacunos, y *Salmonella Choleraesuis* en porcinos. Cuando esos serotipos particulares provocan la enfermedad en las personas suelen ser invasivos y pueden poner en peligro la vida. Por lo general, esas cepas causan gastroenteritis, que suele ser un trastorno sin complicaciones y no requiere tratamiento, aunque puede ser grave en los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. A ese grupo pertenecen *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, los dos serotipos más importantes de salmonelosis transmitida de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo (OMS, 2015).

La salmonelosis, generalmente se caracteriza por fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea y a veces vómito. Estos síntomas comienzan a manifestarse entre 6 y 72 horas después de la ingesta de *Salmonella*, y la enfermedad dura entre 2 y 7 días. (OMS, 2013).

Análisis de la patogénesis de las infecciones por *Salmonella* reveló la presencia de dos características prominentes de virulencia (Figura 5). Durante la interacción con el huésped, la *Salmonella* infecta células del epitelio intestinal, por lo que son capaces de

invadir células no fagocíticas. La función de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1) se necesita para las etapas iniciales de salmonelosis (entrada de *Salmonella* a las células no fagocíticas). Por otro lado, la función de SPI1 se requiere para el inicio de los síntomas de diarrea durante la infección gastrointestinal localizada. La función de la isla de patogenicidad 2 (SPI2) es requerida para etapas tardías de la infección (propagación sistémica y colonización a otros órganos). El papel de la SPI2 para la supervivencia y replicación en los fagocitos huésped parece ser esencial para esta fase de la patogénesis. (Hansen-Wester *et al*, 2001).

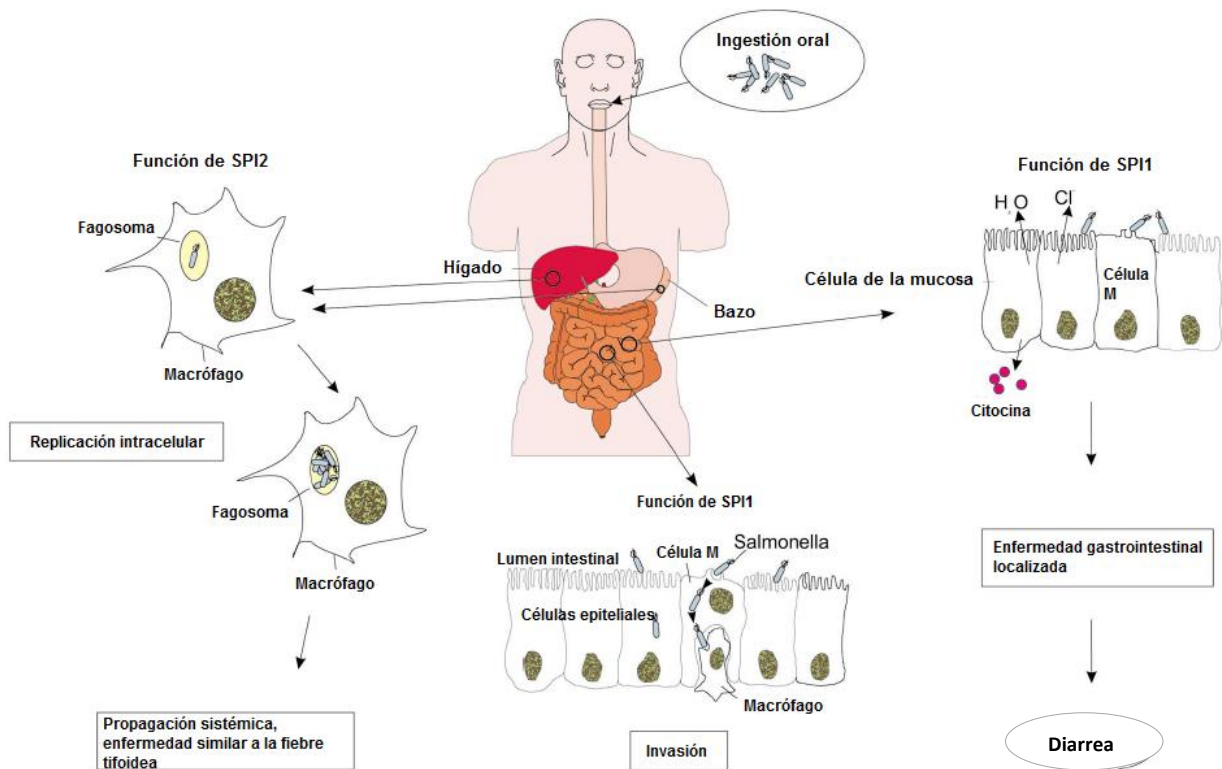


Figura 5. Ruta de infección de la *Salmonella*. La infección inicia cuando la bacteria ingresa por la boca, viaja por el tracto gastrointestinal hasta llegar al epitelio intestinal, enseguida expulsa proteínas efectoras que se inyectan en la célula huésped. (Modificado de Hansen-Wester y Hensel, 2001)

1.5 Antecedentes

Los sistemas de resistencia bacterianas a iones metálicos tóxicos se han estudiado durante varios años. Uno de los mecanismos de resistencia más estudiados son los genes de resistencia a varios iones tóxicos de metales pesados localizados en los plásmidos, entre los iones se incluyen Ag^+ , AsO_2^- , AsO_2^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Sb^{3+} , TeO_3^{2-} y Zn^{2+} (Silver *et al.*, 1996). Un ejemplo es el pMG101 de *Salmonella*, es uno de los plásmidos de resistencia a la Ag, se expresa el gen *sil* en presencia de este metal pesado (Gupta *et al.*, 1999; Silver, 2003). Las bombas de salida (efflux) constituyen otro sistema de resistencia, pueden ser dependientes de ATPasa (Silver, 1996).

Li, *et al.*, (1997) examinaron el rol de las porinas estudiando las mutantes resistentes a plata de *E. coli* deficientes en OmpC o en OmpF. Se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de las mutantes que resultaron ser mayores para nitrato de plata (AgNO_3) y para sulfadiazina de plata (AgSD) comparadas con sus cepas parentales, sensibles a la plata. Se analizaron las proteínas de membrana externa de las mutantes resistentes a Ag por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. Como se muestra en la Figura 6, las 5 mutantes resistentes a Ag son deficientes en OmpF o en ambos OmpF y OmpC.

Lo más reciente en investigación con respecto a la función de las porinas en el proceso de desintoxicación con AgNPs ha sido proporcionado por Radzig, *et al.*, (2013). Se estudiaron las mutaciones en los genes que codifican para las porinas OmpF y OmpC de *E. coli* utilizando AgNPs (Figura 7).

En la Figura 7 se muestran los valores de MICs de las cepas mutantes deficientes de porinas. Las cepas mutantes son más resistentes a las AgNPs que las cepas silvestres. Las cepas mutantes muestran un incremento en la resistencia en presencia de AgNPs hasta 4-8 veces. Esto sugiere que las porinas OmpF y OmpC son factores importantes en los mecanismos de acción antibacteriana de AgNPs en *E. coli*.

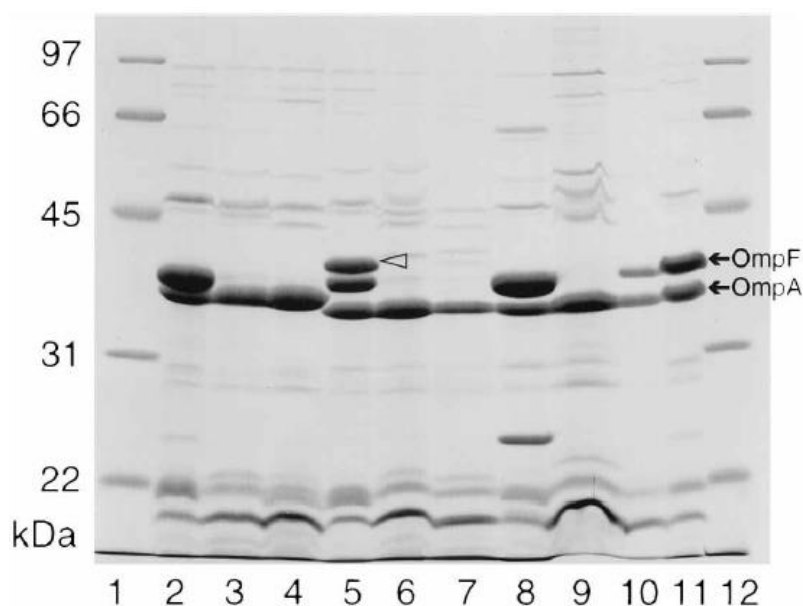


Figura 6. Proteínas de membrana externa de cepas de *E. coli* susceptibles a Ag y sus mutantes resistentes a Ag. Líneas: 2, 496(cepa silvestre); 3, 496AgNO₃R (mutante resistente a AgNO₃); 4, 496AgSDR (mutante resistente a AgSDR); 5, B1 (cepa silvestre); 6, B1AgNO₃R (mutante resistente a AgNO₃); 7, B1AgSDR (mutante resistente a AgSDR); 8, 116 (cepa silvestre); 9, 116AgNO₃R (mutante resistente a AgNO₃); 10, JF701 (control, OmpF+ OmpC-); 11, Agr; 1 y 12 estándares de peso molecular. OmpF, OmpC y OmpA se indican en flechas; OmpF y OmpC migran muy cerca, pero en la cepa B1 (Línea 5) OmpF (marcado en un triángulo) y OmpC (línea debajo) se separan bien (Li *et al.*, 1997).

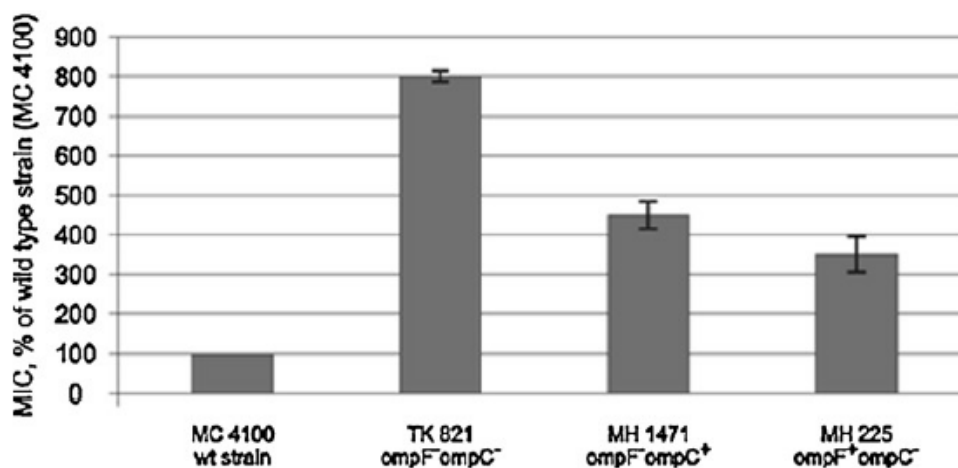


Figura 7. Valores de MIC para las cepas mutantes de *E. coli* K-12 deficientes en porinas relativo al MIC de la cepa silvestre *E. coli* MC 4100. Valores de MIC para AgNPs. Los datos se presentan como % relativo a la cepa silvestre (Radzig *et al.*, 2013).

1.6 Justificación

El uso terapéutico de los nanomateriales, particularmente en el caso de infecciones microbianas representa una alternativa viable al uso de los antibióticos. Sin embargo, es necesario estudiar con mayor profundidad a los mecanismos involucrados en la resistencia a dichos nanomateriales. En este sentido, obtener conocimiento del funcionamiento de las porinas en el proceso de desintoxicación con nanopartículas de plata es de suma importancia ya que explicaría una de las respuestas fisiológicas del microorganismo a los nanomateriales que producen un efecto antibacteriano.

1.7 Hipótesis

Las porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium tienen un papel en el mecanismo de resistencia a las nanopartículas de plata.

1.8 Objetivo general

Evaluar el papel de las porinas OmpF, OmpC, OmpW, OmpD, OmpL, OmpS1, y OmpS2 de la bacteria *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en el mecanismo de desintoxicación con AgNPs.

1.9 Objetivos particulares

- Identificar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de las AgNPs en *Salmonella* Typhimurium.
- Identificar la MIC y MBC de las AgNPs en las diferentes mutantes isogénicas de porinas de *Salmonella* Typhimurium.
- Determinar la viabilidad de las cepas parentales *Salmonella* Typhimurium en presencia de AgNPs.
- Determinar la viabilidad de las cepas mutantes isogénicas de porinas de *Salmonella* Typhimurium en presencia de AgNPs.
- Evaluar la expresión de los genes que codifican para las porinas en las cepas parentales de *Salmonella* Typhimurium por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), en ausencia y presencia de AgNPs.

Capítulo 2. Métodos experimentales

En esta apartado se hablara acerca de las técnicas utilizadas para este proyecto para concluir con los objetivos particulares. Para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *S. Typhimurium* se empleó la técnica de macrodiluciones. Además se evaluó la viabilidad bacteriana a través de diluciones seriadas. Finalmente para definir los niveles de expresión relativa de los genes de interés para este trabajo se aplicó la técnica RT-qPCR.

2.1 Materiales

2.1.1 Cepas parentales ATCC 14028 y 14028s

Las cepas utilizadas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s y ATCC 14028 se obtuvieron de la colección del Dr. Alejandro Huerta Saquero en el Centro de Nanociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, CNYN UNAM. La primera no tiene resistencia a antibióticos, mientras que la segunda tiene resistencia a Estreptomycin (Tabla 2).

2.1.2 Mutantes isogénicas de porinas de *Salmonella Typhimurium*

Las cepas mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028s y ATCC 14028 deficientes en porinas se obtuvieron de la colección del Dr. Edmundo Calva del laboratorio de microbiología molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, IBT UNAM (Tabla 2).

2.1.3 Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se almacenan a bajas temperaturas en un ultracongelador New Brunswick, U570 Premium (- 80 °C) durante largos periodos de tiempo para no alterar sus características y propiedades, utilizando una relación 50/50 glicerol (80%)/cepa bacteriana.

Tabla 2. Cepas bacterianas parentales y mutantes isogénicas de porinas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium utilizadas en este proyecto

| No. de cepa | Serovar | Perfil de resistencia |
|---|-------------|----------------------------|
| 14028s | Typhimurium | Sensible |
| ATCC 14028 | Typhimurium | Estreptomicina |
| 14028s $\Delta ompL::Km$ | Typhimurium | Kanamicina |
| 14028s $\Delta ompW::Km$ | Typhimurium | Kanamicina |
| 14028s $\Delta ompD::Km$ | Typhimurium | Kanamicina |
| ATCC 14028 $\Delta ompC::Km$ | Typhimurium | Kanamicina, Estreptomicina |
| ATCC 14028 $\Delta ompF::Km$ | Typhimurium | Kanamicina, Estreptomicina |
| ATCC 14028 $\Delta ompS1::Km$ | Typhimurium | Kanamicina, Estreptomicina |
| ATCC 14028 $\Delta ompS2::Km$ | Typhimurium | Kanamicina, Estreptomicina |

2.1.4 Medio líquido y sólido Luria-Bertani

El medio Luria-Bertani (LB) es comúnmente utilizado para cultivar miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Con frecuencia se añade antibiótico al medio esterilizado para seleccionar células que contienen elementos genéticos específicos tales como plásmidos, transposones o genes de resistencia.

Para el crecimiento de *S. Typhimurium* se utilizó el medio LB (Sambrook y Russell, 2001, Gerhardt, *et al.* 1994) con un pH de 7.5.

2.1.5 Medio mínimo MMN y M9

Se les considera medios pobres, proporcionan el mínimo de nutrientes que necesita el microorganismo para reproducirse, se prepararon a un pH 7.5.

2.1.6 Nanopartículas de plata

Se evaluó la sensibilidad antimicrobiana utilizando AgNPs (Argovit), las cuales tienen una distribución de tamaño entre 3 y 50 nm, con una media de 35nm. Fueron proporcionadas por la Dra. Nina Bogdanchikova del laboratorio Vector-vita de Novosibirsk Rusia.

2.1.7 Diseño de oligonucleótidos

Para la evaluación de los niveles de expresión de los genes que codifican para las diferentes porinas de *S. typhimurium*, se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia del genoma completo de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, obtenida en la página de la National Center of Biotechnology Information (NCBI). Número de acceso: AE006468.1

Se utilizó el software DNAMAN para el diseño de los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos para RT-qPCR

| Gen blanco | Oligonucleótido Forward | Oligonucleótido Reverse |
|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 16S | 5'CAGCAACGTCTTTTCGGAAG3' | 5'CTTAGGATAGGGCAGAAAGGC3' |
| ompL | 5'GAAAACCGTGAGGCCTATAACCTGG3' | 5'CAAAGTAGGGCAACCAGTGTTCC3' |
| ompW | 5'GCGGCACTGGCGTTAACAACTC3 | 5'CCTTAAAGCTCAGATCGGACAGCCCC3' |
| ompD | 5'CGGCAATAAACTGGATCTGTACGG3' | 5'GAATTTTCAGACCAGCAAACGCCAG3' |
| ompC | 5'CTCCTGGTACCAGCTCTGCT3' | 5'CGCCGTAGTTACGACCATAATCG3' |
| ompF | 5'GCAAATCCTGGCAGCGGTG3' | 5'GAAAGCCAGACGGACCAGATTCCG3' |
| ompS1 | 5'CTGCTTGTCCCGGCGTTATTAG3' | 5'GCCGTAATCGCCGAATTTTCAGAC3' |
| ompS2 | 5'GTATTGGCACTTGTTCATCCCGGC3' | 5'CCGTTATTAGTGCCTTCCTGC3' |

2.2 Experimental

2.2.1 Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana por medio de distintas técnicas microbiológicas

2.2.1.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria a través de macrodiluciones.

Los efectos antimicrobianos de las AgNPs se analizaron tomando en cuenta algunas consideraciones del Comité Nacional para Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS). Para este proyecto se utilizaron las cepas parentales *S. Typhimurium* ATCC 14028 y 14028s y sus respectivas cepas mutantes isogénicas de porina $\Delta ompL::Km$, $\Delta ompLW::Km$, $\Delta ompD::Km$ (14028s); $\Delta ompC::Km$, $\Delta ompF::Km$, $\Delta ompS1::Km$ y $\Delta ompS2::Km$ (ATCC 14028) para este proyecto.

La MIC se define como la concentración más baja de AgNPs que inhibe el crecimiento visible de la bacteria. Las MICs de AgNPs se determinaron por medio de tres réplicas para cada cepa por medio del método macrodiluciones basándose en el protocolo M07-A9 modificado de la NCCLS.

Se evaluaron diferentes intervalos de concentraciones de AgNPs en donde finalmente el intervalo de 0-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio LB y 0-0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio MMN resultó ser el más adecuado para encontrar la MIC de las cepas parentales y mutantes.

Las diluciones de las AgNPs se prepararon en tubos de ensayo de 10mL por el método de macrodiluciones, para el medio LB se tiene el siguiente intervalo de concentraciones: 0, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 8), y para el medio MMN: 0, 0.001, 0.01, 0.1 y 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.1, donde se tiene aproximadamente 10^8 UFC/mL, posteriormente se diluye a 10^4 UFC/mL que será el inóculo inicial. La misma cantidad de bacterias se añadió a todas las diluciones y se incubaron a 37°C toda la noche (ON). Se comparó el crecimiento bacteriano de cada mutante con su respectivo control. Se utilizó como control positivo una suspensión bacteriana en medio LB sin AgNPs y medio LB como control negativo.

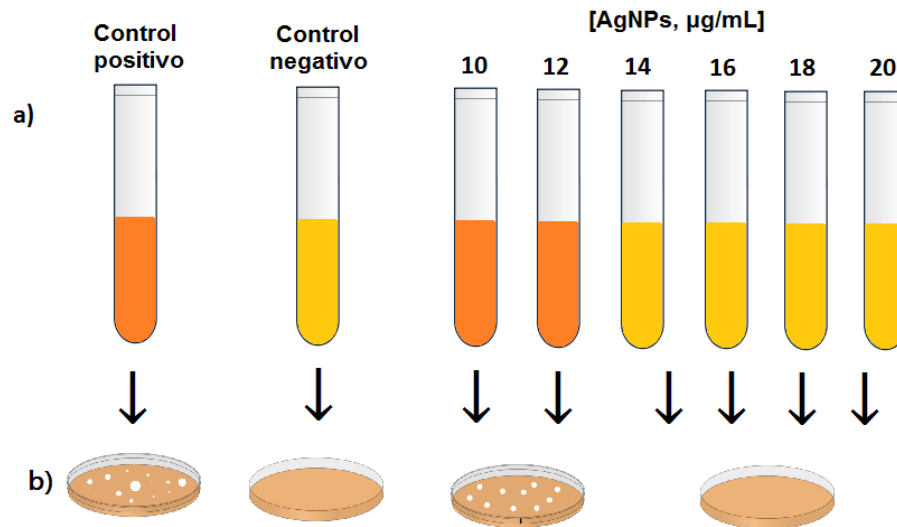


Figura 8. Método de macrodiluciones para a) ensayo de MIC y b) ensayo de MBC

A) Preparación de la solución madre

Las diferentes cepas de *S. Typhimurium* tanto parentales como mutantes isogénicas se cultivaron aeróbicamente a 37°C, con una agitación de 180 rpm, por medio de una incubadora Thermo scientific, MaxO 6000. Se manejaron tubos de 10 mL con 5 mL de medio LB, cerrados con tapones metálicos o de plástico estériles.

Este proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar NuAire Airguard.

B) Preparación del inóculo

Partiendo de la solución madre, el inóculo se debe ajustar de modo que 10^4 UFC/mL a través de un espectrofotómetro de UV visible Thermo Scientific Multiskan GO. Esta suspensión se debe utilizar en un intervalo de máximo 30 minutos.

C) Preparación de stock de AgNPs

La concentración inicial de las AgNPs es de 12,000 µg/mL. Se hace una dilución con medio LB, 1/100 del stock original para trabajar finalmente con una solución de AgNPs de 120 µg/mL. Para el caso de un medio pobre se parte del stock 12,000 µg/mL para obtener tres nuevas soluciones de AgNPs: 1.2, 0.12 y 0.012 µg/mL. El uso de esas

nuevas soluciones no debe estar expuesto a la luz y no se debe reutilizar para otro experimento.

D) Preparación de un intervalo de diluciones del stock de AgNPs

Para llevar a cabo las diluciones se parte de las soluciones preparadas de AgNPs: 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (medio LB) y 1.2, 0.12 y 0.012 (medio MMN o M9), a continuación se describe las cantidades necesarias de los reactivos para obtener la concentración deseada.

Tabla 4. Concentración de AgNPs en medio rico en nutrientes

| Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Medio LB (μL) | Cepa <i>S. Typhimurium</i> (μL) | Stock de AgNPs a 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μL) |
|---|--|--|---|
| 0 | 500 | 500 | 0 |
| 10 | 417 | 500 | 83 |
| 12 | 400 | 500 | 100 |
| 14 | 383 | 500 | 117 |
| 16 | 367 | 500 | 133 |
| 18 | 350 | 500 | 150 |
| 20 | 333 | 500 | 167 |

Tabla 5. Concentración de AgNPs en medio mínimo en nutrientes

| Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Medio MMN o M9 (μL) | Cepa <i>S. Typhimurium</i> (μL) | Stock de AgNPs a 1.2, 0.12 y 0.012 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (μL) |
|---|--|--|---|
| 0 | 500 | 500 | 0 |
| 0.001 | 417 | 500 | 83 |
| 0.01 | 417 | 500 | 83 |
| 0.1 | 417 | 500 | 83 |
| 0.2 | 333 | 500 | 167 |

2.2.1.2 Determinación de la concentración mínima bactericida a través de macrodiluciones

La MBC es la concentración más baja requerida de un antimicrobiano para matar las bacterias. Enseguida de la incubación de las diferentes diluciones (0-20 $\mu\text{g/mL}$ y 0-0.2 $\mu\text{g/mL}$), se inoculan 5 μL de cada dilución en placas con medio LB. Posteriormente se incuban las placas ON (durante toda la noche, 16-20 horas) a 37°C.

A) Preparación de placas con medio LB sólido

- Se añade 15 mL de medio LB sólido con o sin antibiótico según lo necesario, a cada caja Petri.
- Se deja solidificar el agar dentro de una campana de flujo laminar.
- Almacenar las cajas a (4-8°C) hasta utilizarlas en la inoculación.

B) Inoculación

Utilizando una micropipeta se inoculó 5 μL de cada cultivo posterior al tratamiento con AgNPs (0-20 $\mu\text{g/mL}$ y 0-0.2 $\mu\text{g/mL}$) en cajas Petri con medio LB sólido por triplicado técnico.

C) Condiciones de incubación

Esperar a que las placas absorban los inóculos a temperatura ambiente. Se invierten las placas y se incuban a 37°C, ON.

2.2.1.3 Diluciones seriadas

Es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Entonces la colonia es considerada una unidad formadora de colonia (UFC), siendo una medición de células bacterianas viables, es decir, células capaces de dividirse en un medio de cultivo.

Posteriormente a la toma de muestra y como parte del análisis, se hace una dilución primaria (utilizando una placa de 96 pocillos) cuya finalidad es lograr obtener una muestra representativa, esto es, en el aspecto cuantitativo, y así lograr una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra. Se pretende

encontrar el número de microorganismos por unidad de volumen, hasta asegurar que después de la incubación se obtenga un resultado cuantificable, esto se logra después de realizar tantas diluciones decimales seriadas como sea necesario, en el mismo diluyente. Finalmente se cuentan las colonias formadas en las placas.

Para esta técnica los primeros tres pasos son las mismas que para macrodiluciones y zonas de inhibición, que es la preparación de la solución madre, inóculo inicial y el stock de AgNPs.

A) Condiciones de incubación

Posteriormente se hace una mezcla en tubos de ensayo con AgNPs y las cepas de interés ajustadas (10^8 bacterias/mL) para obtener una concentración final de 200 $\mu\text{g/mL}$. Se incuban a 37°C durante 30 minutos con agitación a 180rpm.

B) Placa de 96 pocillos

Se llenan los pocillos necesarios con 90 μL de un buffer de fosfatos estéril, PBS, con el fin de prevenir el crecimiento bacteriano conforme se hacen las diluciones deseadas. Para llevar a cabo las diluciones primero se toma 10 μL de la cepa deseada previamente incubada a una concentración inicial de 200 $\mu\text{g/mL}$ y se mezcla con PBS del primer pocillo, de tal manera que tenemos un volumen final de 100 μL , posteriormente de esa solución se toman 10 μL y se pasan al siguiente pocillo formando una nueva dilución, seguimos de la misma manera hasta llegar en este caso a una dilución de 10^{-7} .

C) Inoculación

Utilizando una micropipeta se inocularon 5 μL de cada dilución formada en la placa de 96 pocillos en cajas Petri con medio LB sólido por triplicado técnico.

D) Recuento de colonias

Se invierten las placas y se incuban a 37°C durante 16-20 horas. Una vez transcurrido el tiempo necesario se cuentan las colonias formadas de las cepas parentales y mutantes. Finalmente se comparan y mediante la estadística, a través del programa Graphad Prism, se determina si los valores tienen una diferencia significativa.

2.2.2 Análisis de la expresión de los genes de interés de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028 y 14028s

2.2.2.1 Purificación de DNA total de las bacterias

Se debe purificar el DNA de las cepas parentales de *S. Typhimurium* para tenerlo de control positivo al momento de correr las muestras de RNA en RT-qPCR y determinar que todo esté funcionando correctamente, además antes de utilizar RT-qPCR es preferible correr un PCR de punto final para verificar que el RNA no este contaminado y de igual manera se utiliza el DNA como control positivo.

Inicialmente se inocula la cepa de interés en 5 mL de medio LB (agregar antibiótico si es que es resistente) y se incuba a las condiciones estándares 37°C toda la noche. Al finalizar el tiempo de incubación se toma 500 µL y se coloca en un tubo eppendorff de 1.5 mL para poder centrifugarlo por un minuto a 12000 rpm. Posteriormente se tira el sobrenadante y se resuspende en 570 µL de buffer SET (50mM Tris-HCl a pH8, 40mM EDTA a pH8, 0.75M sacarosa para un volumen de 50mL). Se agrega 30µL de SDS 20% y se mezcla por medio de un vortex 20 segundos. Luego se incuba a 80°C por 5min y se deja enfriar a temperatura ambiente. A continuación se adiciona 2µL de RNasa (10mg/mL) y se deja incubando a 37°C por 30-45min. Después de reposar a temperatura ambiente se agrega 200µL de NaCl 5M y se mezcla por medio de un vortex 20 segundos, en este paso se formara un precipitado. Se incuba a 5min en hielo y posteriormente se centrifuga 5min a 12000rpm preferente a bajas temperaturas. Se pasa el sobrenadante a un tubo limpio y adicionar 800µL de isopropanol mezclando continuamente por un minuto. Enseguida se centrifuga entre 5-20min a 12000rpm y se tira el sobrenadante lavándolo 3 veces con etanol al 70%. Finalmente se resuspende con 100-300µL de 10mM de Tris-HCl pH 8 (Millar, *et al.*, 1988).

2.2.2.2 Purificación de RNA de *S. Typhimurium* con y sin tratamiento de AgNPs

Para analizar si las porinas juegan un papel importante en el proceso de desintoxicación de la bacteria y si la exposición de la bacteria a AgNPs provoca un cambio de expresión de los genes que codifican para las porinas, es necesario purificar el RNA de las cepas previamente tratadas con AgNPs. Es importante tomar en cuenta que el RNA es fácilmente degradable, es por eso que todo material e incluso el área de

trabajo se debe manejar con esterilidad, mantener el RNA en un ambiente frío (hielo), cambiar de guantes, utilizar DEPC (dietilpirocarbonato) para toda solución que se vaya a necesitar en el protocolo, de preferencia utilizar agua MilliQ o agua inyectable.

La purificación se maneja en dos etapas primero es la lisis de la célula bacteriana y por último se lleva a cabo la purificación (RNAprotect Bacteria Reagent Handbook, 2015).

A) Lisis enzimática y digestión de la bacteria por medio de proteinasa K

Esta etapa involucra la lisis enzimática junto con la digestión por medio de la proteinasa K. Se recomienda este protocolo para las bacterias tipo Gram negativas. A continuación se describe el protocolo:

- Preparar buffer TE (Tris-Cl, EDTA, pH 8) que contiene lisozima.
- Calcular el volumen requerido de *S. Typhimurium* con y sin tratamiento de AgNPs (1 volumen).
- Pipetear dos volúmenes del reactivo RNAprotect dentro de un tubo.
- Añadir 1 volumen de cultivo bacteriano al tubo. Mezclar inmediatamente por vortex 10 segundos.
- Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar por 20 min a 3500 x g.
- Decantar el sobrenadante, obtención del pellet.
- Añadir 10-20µL de proteinasa K y 200µL buffer TE (15mg de lisozima por cada 1mL de buffer TE), al pellet. Resuspenderlo por pipeteo.
- Mezclar por vortex 20 segundos. Incubar a TA por 20min. Durante la incubación, incubar en un shaker.
- Añadir 700µL de buffer RLT y vortexear vigorosamente. Se centrifuga y usar el sobrenadante.
- Añadir 500µL de etanol. Mezclar por pipeteo.

B) Purificación del RNA total del lisado bacteriano usando el RNeasy Mini Kit

A continuación se describen las instrucciones para purificar el RNA por medio del Kit RNeasy Mini (Qiagen):

- Transferir 700µL del lisado, incluyendo cualquier precipitado que se haya formado, a una columna y centrifugar por 5min a 3000-5000 x g. Descartar el desecho líquido de la columna. Se opta por utilizar DNasa debido a que el análisis de RT-qPCR es sensible a una mínima cantidad de DNA.
- Añadir 500µL de buffer RPE (proporcionado por el kit) a la columna. Centrifugar 2min a 3000-5000 x g. Descartar el desecho líquido de la columna.
- Añadir 500µL de buffer RPE a la columna. Centrifugar 5min a 3000-5000 x g. Descartar el desecho líquido de la columna.
- Colocar la columna en un tubo nuevo de colección. Añadir 50µL de agua inyectable. Centrifugar por 5 min a 3000-5000 x g para eluir RNA.

2.2.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Para asegurarnos que el RNA de las cepas bacterianas está puro, se analiza por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) punto final. La idea básica de ésta técnica es amplificar varias veces un fragmento de DNA. Cuando se hace una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA; de manera general se mezclan todos los ingredientes necesarios para llevar a cabo la reacción: DNA del microorganismo que se desea estudiar (donde se encuentra el fragmento que se quiere amplificar), polimerasa termoestable (Taq polimerasa), dos oligonucleótidos “reverse y forward” (primers, iniciadores, cebadores), desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), buffer de reacción, magnesio y agua.

Con el fin de proceder con el PCR se debe de purificar previamente el RNA y DNA, además se requiere: a) diseñar los oligonucleótidos, b) ajustar la reacción, c) seleccionar las condiciones de la reacción y d) electroforesis en gel de agarosa al 2%.

A) Diseño de oligonucleótidos: Se utilizó el software DNAMAN para el diseño de los primers, donde se tomaron algunas consideraciones como la de evitar la complementariedad entre el primer forward y el reverse, evitar la autocomplementariedad; el porcentaje de guanina y citosina debe ser entre 50-55%, la temperatura de fusión (Tm) no debe ser mayor a 70°C y las bases no deben de exceder de 25.

B) Ajuste de la reacción: Una vez seleccionado el DNA/RNA como molde y los oligonucleótidos, los componentes de la reacción para un volumen de 50 μ L son los siguientes:

- Agua, 38 μ L
- Buffer de reacción 10X, 5 μ L
- 50mM MgCl₂, 1.5 μ L
- dNTPs, 1 μ L
- Primer forward, 1 μ L, 5 μ M
- Primer reverse, 1 μ L, 5 μ M
- DNA/RNA, 2 μ L, 100ng/ μ L
- Taq polimerasa, 1 μ L

C) Selección de las condiciones de reacción: En general, el estándar en una reacción de PCR es de 25-35 ciclos, para este experimento se utilizaron 35 ciclos en termociclador (My Cycler, Biorad). La primera etapa del ciclo es la desnaturalización del DNA, esto se logra a 94°C por 30 segundos. La segunda etapa es la alineación a 54°C por 30 segundos. Por último se tiene la etapa de la extensión, la temperatura adecuada es de 72°C por 1 minuto. Además de estas condiciones por cada ciclo, con frecuencia es deseable llevar a cabo una sola etapa de desnaturalización inicial, en esta ocasión de 3.30 minutos a 94°C al inicio de la reacción y una etapa de extensión final de 10 minutos a 72°C. En resumen se tiene las condiciones de toda la reacción:

3.30min a 94°C, 1 ciclo; 35 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 54°C, 1 minuto a 72°C), 10 minutos a 72°C, 1 ciclo.

D) Validación de la reacción: Una vez que la reacción de PCR ha terminado, existe una manera de determinar el éxito o fracaso de la misma. Se toma 10 μ L de la muestra y se mezcla con 4 μ L con un marcador (blue/orange dye), posteriormente se corre en un gel de agarosa al 2% con un marcador de peso molecular 100bp y se espera no observar un amplificado de las muestras de RNA purificado (esto es, demostrar que se encuentra libre de DNA), ni del coctel sin templado como control negativo.

2.2.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Una vez purificado el RNA el siguiente paso es evaluar los niveles de expresión relativa de los genes de interés por medio de RT-qPCR. Este método permite cuantificar el producto del PCR (amplicón) mientras que esté en curso la amplificación. En este trabajo se utilizó SYBR Green como marcador intercalante para cuantificar el amplicón,

estos marcadores no son específicos y exhiben un incremento en la emisión de fluorescencia cuando se intercalan con DNA de doble cadena (Figura 9).

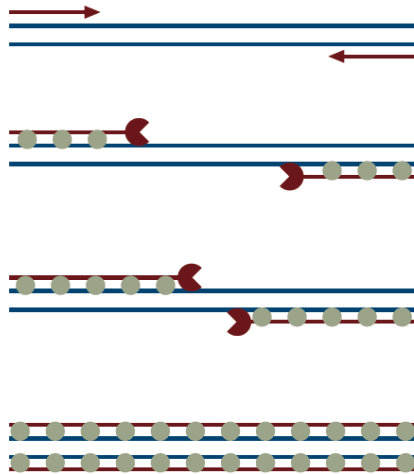


Figura 9. SYBR Green como marcador intercalante. Durante la etapa de alineamiento, los primers hibridan una secuencia específica de la hebra del DNA. En la etapa de la extensión, la polimerasa inicia la síntesis de DNA, desde la terminal 3' de los primers. Conforme se va llevando la amplificación, el marcador se intercala al nuevo DNA de doble cadena. Cuando la síntesis del DNA termina, se determina la cantidad de fluorescencia que está en función de la longitud y número de copias del amplicón. Finalmente, durante la desnaturalización el marcador se disocia del amplicón (IDT qPCR Application Guide, 2012).

La transcripción reversa es el proceso de convertir RNA a cDNA utilizando una enzima llamada transcriptasa reversa. En este estudio se obtuvo cDNA mediante una aproximación específica genética, de tal manera que solo el RNA de interés se convierte en cDNA, a este protocolo se le denomina de un solo paso “one-step”.

El volumen final que se tomó en cuenta para cada reacción fue de 10 μ L, a continuación se describen los componentes de la reacción:

- 5 μ L de SYBR Green Taq ReadyMix (Sigma Aldrich)
- 1 μ L de Primer Reverse (5 μ M)
- 1 μ L de Primer Forward (5 μ M)
- Template (100ng)
- 0.25 μ L de M-MLV RT
- 2 μ L de agua libre de RNasa

Los parámetros del ciclo que se tomaron en consideración para RT-qPCR en un termociclador (PikoReal, Thermo Scientific) se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de ciclo para RT-qPCR de un solo paso

| Componente | Temperatura (°C) | Tiempo |
|---|--|--|
| Transcripción reversa | 43 | 30 min |
| Desnaturalización inicial/Inactivación del RT | 94 | 30 segundos |
| 40 ciclos | | |
| Desnaturalización | 94 | 5 segundos |
| Alineamiento | 60° o 5 grados debajo del T _m más bajo de los primers | 15 segundos |
| Extensión | 72 | 1 segundo por 25 pb del producto amplificado |

Se realizaron triplicados técnicos y biológicos de cada gen de interés en una caja de 96 pocillos, además se tomó como control negativo toda la mezcla de componentes (master mix) excepto el “template” para asegurar que la muestra esté libre de contaminación (DNA o hibridación de primers). Como control positivo se eligió el template DNA. Asimismo se seleccionó al gen *16S* como gen de referencia. Para comprobar la especificidad de cada primer, se confirmó la temperatura de fusión de amplificación predicho. La expresión relativa de los genes de interés se calculó mediante el método de cuantificación $\Delta\Delta C_T$ y los valores son promedios de seis experimentos independientes.

Capítulo 3. Resultados

En esta sección se analizará los resultados que se obtuvieron al aplicar las técnicas mencionadas en el capítulo anterior. Primero se argumentará acerca de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) las cuales se pueden determinar a través de la turbidez de los cultivos. Por otro lado se determinó la viabilidad bacteriana por medio de diluciones seriadas (análisis cuantitativo). Finalmente se realizó un análisis a nivel genético para corroborar los resultados obtenidos con diluciones seriadas.

3.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

3.1.1 *S. Typhimurium* ATCC 14028 y 14028s y mutantes isogénicas de porinas

Para determinar la concentración más baja que inhibe el crecimiento visible de la bacteria se utilizó la MIC utilizando dos tipos de medio, un medio rico (Luria Bertani) y medio mínimo (MMN y M9). La MIC de AgNPs para las cepas parentales ATCC 14028 y 14028s se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. MIC en diferentes medios de cultivo en cepas parentales y sus mutantes isogénicas

| Cepa | LB ($\mu\text{g/mL}$) | M9($\mu\text{g/mL}$) | MMN($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| ATCC 14028 | 10-12 | <0.1 | 0.01-0.1 |
| 14028s | 10-12 | <0.1 | 0.01-0.1 |
| Mutantes | 10-12 | <0.1 | 0.01-0.1 |

Las MICs se observan por medio de la turbidez que se genera después de exponer a las bacterias con las AgNPs como se muestran en las Figura 10 y 11. No se presentó una diferencia significativa entre las MICs de las cepas parentales y mutantes. Recordando que la MIC es la mínima concentración para inhibir el crecimiento visible bacteriano.

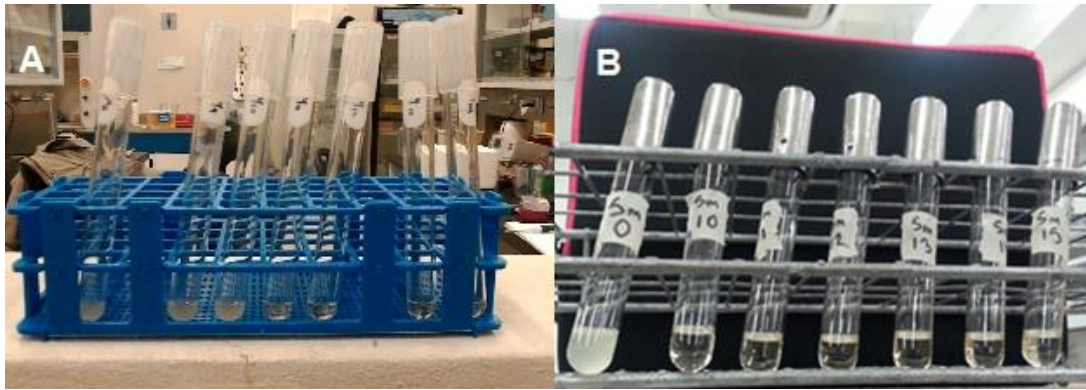


Figura 10. MIC de cepas parentales y mutantes utilizando medio LB. A) Cepa mutante $\Delta ompF$: Km, 12 μ g/mL sería la MIC donde no se observa turbidez. B) Cepa ATCC 14028, 10 μ g/mL como la MIC 0-15 μ g/mL.

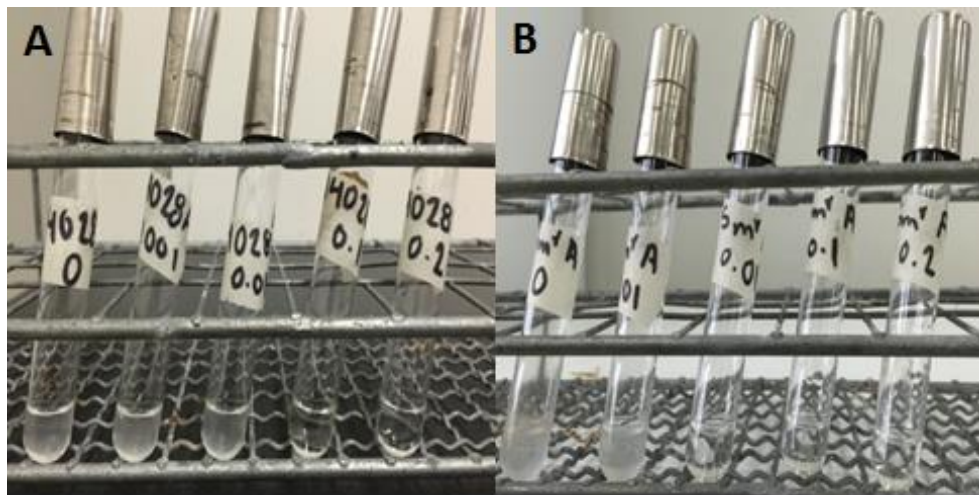


Figura 11. MIC de cepas parentales utilizando medio MMN. A) Cepa parental 14028s, 0.1 μ g/mL como la MIC. B) Cepa ATCC 14028, 0.01 μ g/mL como la MIC. 0-0.2 μ g/mL.

3.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida

3.2.1 *S. Typhimurium* ATCC 14028 y 14028s y mutantes isogénicas de porinas

Para determinar la concentración más baja requerida de un antimicrobiano para eliminar un cultivo bacteriano en particular se utilizó la MBC. La MBC de AgNPs para las cepas parentales de *Salmonella* y sus mutantes deficientes en porinas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. MBC en diferentes medios de cultivo para *Salmonella Typhimurium*

| Cepas | LB($\mu\text{g/mL}$) | M9($\mu\text{g/mL}$) | MMN($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--|--|---|
| Parentales | 14-20 | <0.1 | 0.01-0.1 |
| Mutantes en porinas | 14-20 | <0.1 | 0.01-0.1 |

De acuerdo a los datos descritos en la Tabla 8, se puede apreciar mejor las MBC de algunas cepas parentales con sus respectivas mutantes isogénicas de porinas en las Figuras 12, 13 y 14. En donde recordando que la MBC es la concentración más baja requerida de un antimicrobiano para matar las bacterias.

Al no observar una diferencia significativa entre la cepa parental y sus mutantes correspondientes se eligieron otros métodos más sensibles para trabajar.

3.3 Diluciones seriadas

Con este método se obtienen colonias formadas por cada dilución existente como se observa en la Figura 15.

Dentro del procedimiento experimental se debe considerar que por cada dilución que se obtiene, la concentración de AgNPs y la cantidad de bacterias va a disminuir proporcionalmente al factor de dilución. Mediante esta técnica de diluciones seriadas, se diseñó el experimento para exponer a 10^8 células/mL con una concentración $200\mu\text{g/mL}$ de AgNPs, para 10^7 células/mL se tiene $20\mu\text{g/mL}$ de AgNPs, para 10^6 células/mL se tiene $2\mu\text{g/mL}$ y así sucesivamente dependiendo de la resistencia de las bacterias a la exposición. Al incubar las inoculaciones de cada dilución de la muestra de interés, se hace un conteo en placa para calcular finalmente las unidades formadoras de colonias (UFC) que es simplemente el producto de las colonias por su factor de dilución entre el volumen final inoculado ($5\mu\text{L}$):

$$UFC = \frac{(\text{colonias})(\text{factor de dilución})}{\text{volumen inoculado}} \quad (1)$$

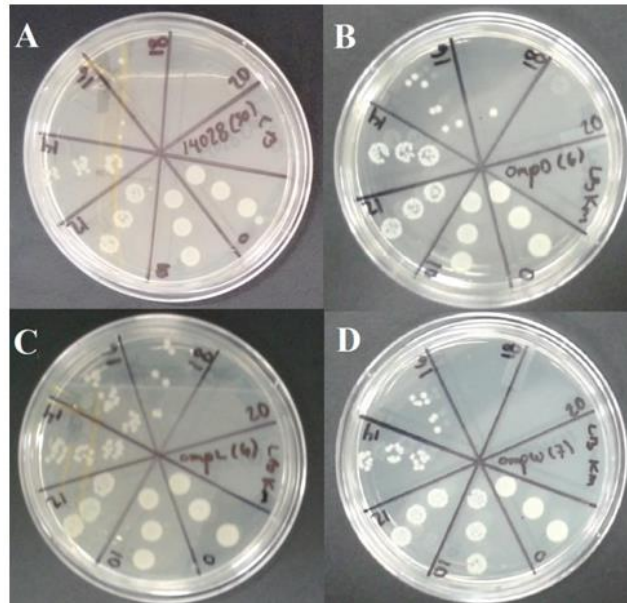


Figura 12. MBC de cepas parentales y mutantes utilizando LB como medio. A) Cepa parental 14028s, B) Mutante $\Delta ompD::Km$, C) Mutante $\Delta ompL::Km$ y D) Mutante $\Delta ompW::Km$. 0-20 μ g/mL.

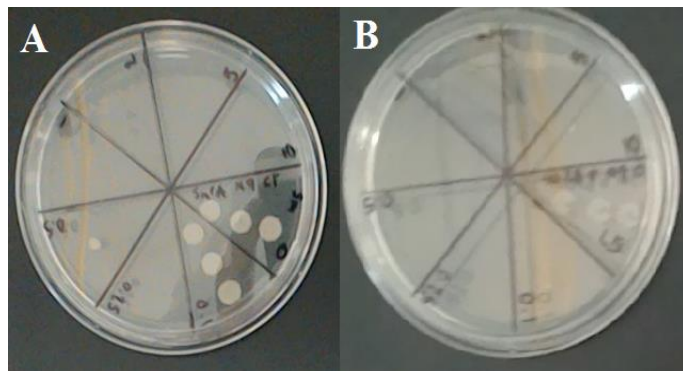


Figura 13. MBC de cepas parentales y mutantes utilizando M9 como medio. A) Cepa parental ATCC 14028, B) Cepa parental 14028s. 0-20 μ g/mL.

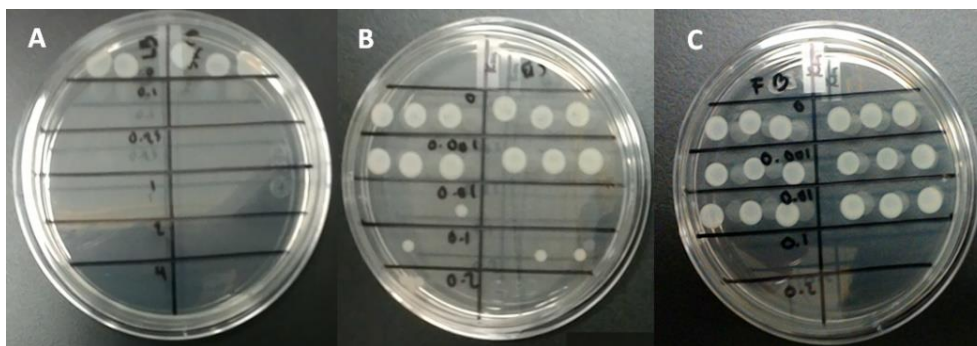


Figura 14. MBC de cepa parental y sus mutantes isogénicas utilizando MMN como medio. A) Cepa ATCC 14028, B) ATCC 14028 $\Delta ompC::Km$, C) ATCC 14028 $\Delta ompF::Km$; 0-4 μ g/mL y 0-0.2 μ g/mL.

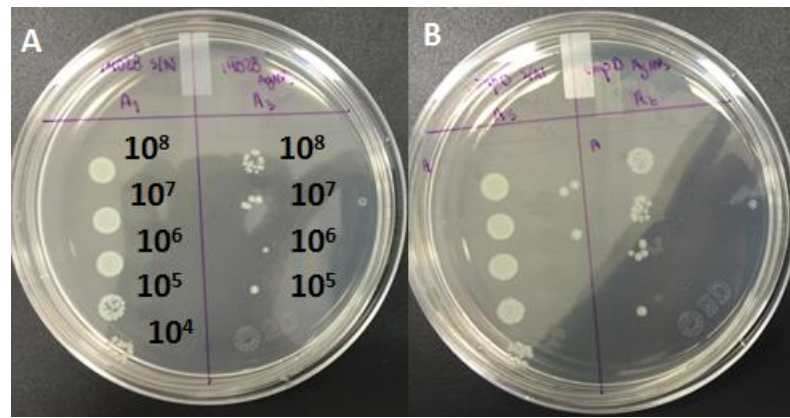


Figura 15. Formación de colonias. A) Ceba 14028s sin y con AgNPs, B) Ceba 14028s $\Delta ompD::Km$ sin y con AgNPs

Para determinar si existen diferencias entre las diferentes cepas en estudio se tabulan los datos y se procede a graficar por medio del programa Graphad Prism (Figura 16). Se realiza un análisis de varianza por grupo “one-way ANOVA” para determinar si las medias de los grupos son diferentes, en donde obtenemos un valor P de 0.1539 ($P > 0.05$). Por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula y se establece que no existe diferencia entre los grupos estadísticamente significativa.

Al analizar más de dos grupos con one-way ANOVA, se eligió Bonferroni como post-test para comparar todos los pares de media de los grupos, en el cual el valor de P para cada par de medias de los grupos es $P > 0.05$ y nuevamente no se rechaza la hipótesis nula.

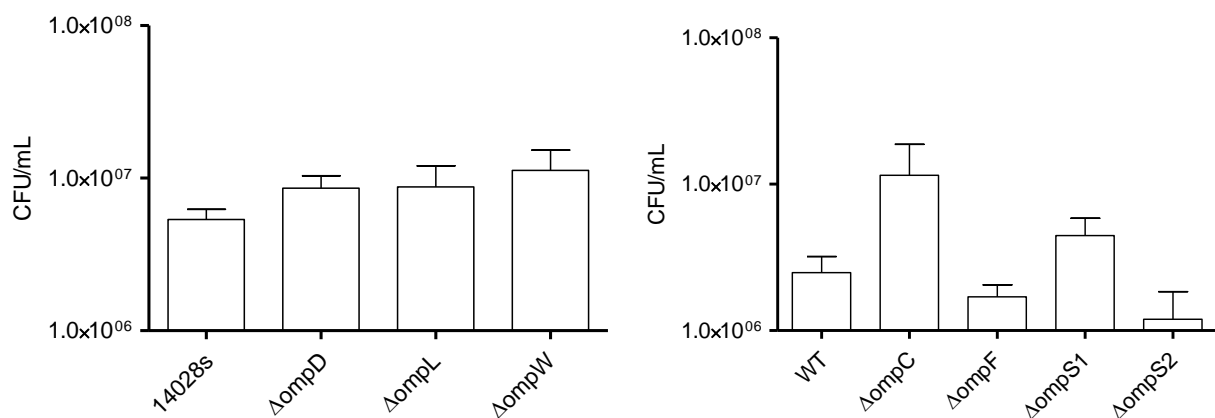


Figura 16. Viabilidad de las cepas parentales y sus mutantes isogénicas en porinas expuestas a 200 µg/mL de AgNPs por 30 minutos.

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Antes de estimar los niveles de expresión de los genes, se comprobó la pureza del RNA de las cepas parentales obtenido de *S. Typhimurium* ATCC 14028 y 14028s con y sin exposición a AgNPs por medio de PCR punto final (Figura 17). En el carril 2 se encuentra el master mix, es decir todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una amplificación menos el template, del carril 4-7 se encuentran todas las muestras de RNA puras mezcladas con el master mix y se observa que no hay amplificación, dando a entender que están puras y se verificó al compararlo con el amplificado del carril 3 que contiene DNA como template mezclado con el master mix, donde claramente se observa la formación de una banda (control positivo).

Se puede observar la pureza de los RNA para ambas cepas parentales con y sin AgNPs, esto indica que podemos iniciar la estimación de los niveles de expresión genética por medio de RT-qPCR.

Además de verificar la pureza del RNA, es de suma importancia comprobar el amplificado de los genes de interés: *ompD*, *ompL*, *ompW*, *ompC*, *ompF*, *ompS1*, *ompS2* y *16S* con los oligonucleótidos diseñados (Figura 18), donde efectivamente se observó que si concuerdan los pares de bases de los oligonucleótidos diseñados con los amplificados en el gel de agarosa.

También se confirmó la integridad del RNA a través de un gel de agarosa al 2%, se añade una alícuota de la muestra de RNA y posteriormente se tiñe con bromuro de etidio. Se puede observar en la Figura 19 algunas bandas de RNA ribosomal intactos 23S y 16S. Los niveles de expresión de genes ribosomales son altos debido a que son críticos para la síntesis de proteínas.

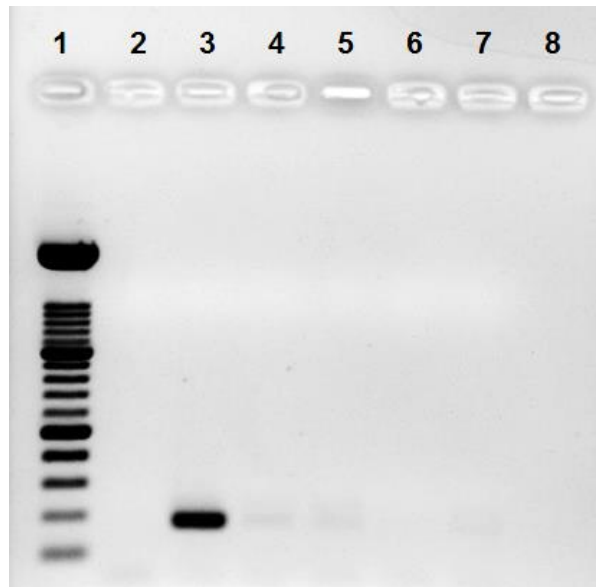


Figura 17. Verificación de pureza del RNA de las cepas parentales de *S. Typhimurium*. 1) Escalera 100bp, 2) Coctel sin DNA/RNA, 3) DNA de ATCC 14028, como control positivo, 4) RNA de 14028s, 5) RNA de ATCC 14028, 6) RNA de 14028s con AgNPs y 7) RNA de ATCC 14028 con AgNPs. El tratamiento con AgNPs se expuso a un tiempo de 30 minutos.

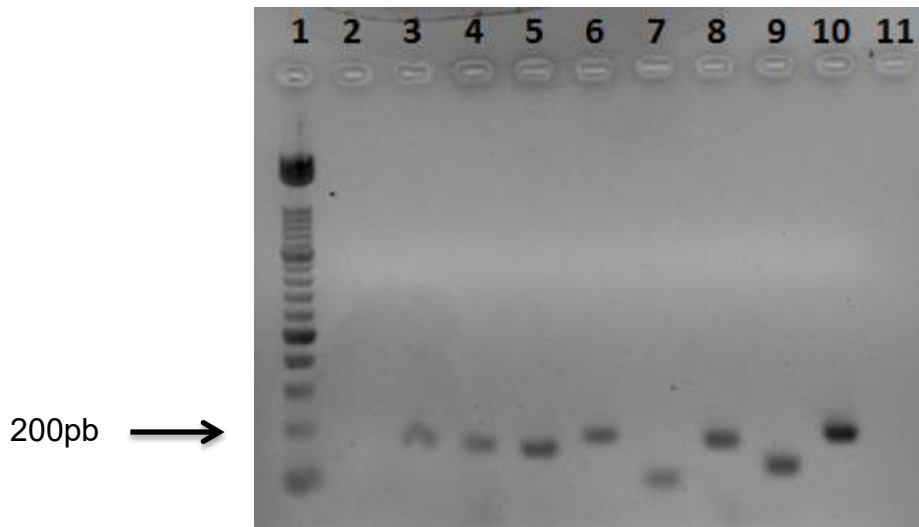


Figura 18. Amplificación de genes de interés a partir del DNA de *S. Typhimurium* ATCC 14028. 1) Escalera 100pb, 2) Coctel sin DNA, 3) DNA+16S (178pb), 4) DNA+*ompD* (175pb), 5) DNA+*ompL* (168pb), 6) DNA+*ompW* (197pb), 7) DNA+*ompC* (107pb), 8) DNA+*ompF* (179pb), 9) DNA+*ompS1* (132pb) y 10) DNA+*ompS2* (196pb).

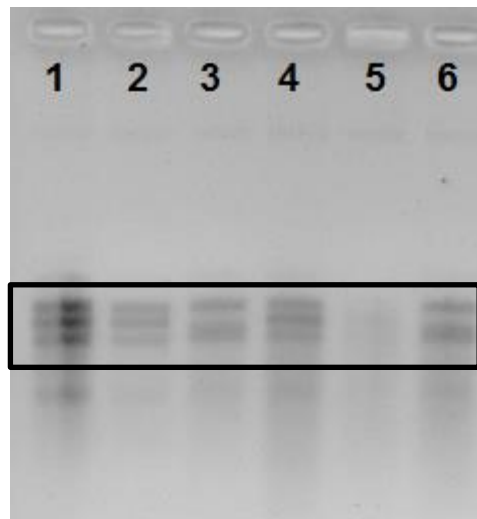


Figura 19. Verificación de integridad del RNA de las cepas parentales de *S. Typhimurium*. 1), 2) y 3) RNA de ATCC 14028, 4), 5) y 6) RNA de las mismas cepas, obtenido de cultivos expuestos a 200µg/mL de AgNPs durante 30 min.

Por otro lado se debe realizar un ensayo de eficiencia de amplificación (Livak *et al.*, 2001) para asegurar que el gen blanco y el de referencia tengan una eficiencia similar. Se le llama eficiencia de amplificación a la velocidad con la que un amplicón de PCR se genera, y comúnmente se expresa como un valor porcentual. Si un amplicón se duplica en cantidad en la fase geométrica se dice entonces que el ensayo de PCR tiene una eficiencia del 100%. Este ensayo consiste en realizar una serie de diluciones de la muestra y determinar los valores de C_T por cada dilución para obtener una graficar C_T vs log DNA. Finalmente se toma el valor de la pendiente y se sustituye en la ecuación 4 para obtener la eficiencia de amplificación por cada gen de interés como se muestra en la Figura 20. Se acepta una eficiencia de PCR siempre y cuando se encuentre en un intervalo de confianza de 90-110% (Taylor *et al.*, 2010).

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} \quad (2)$$

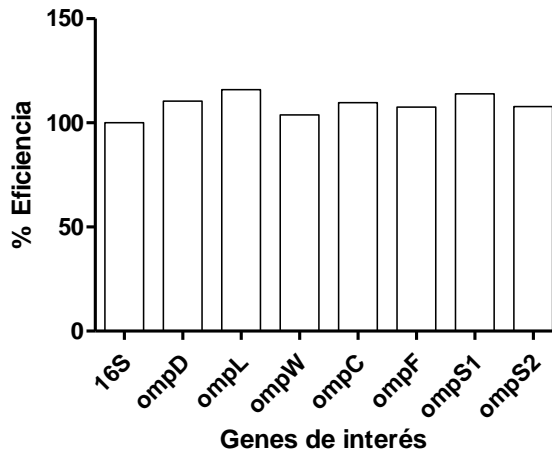


Figura 20. Eficiencia de amplificación. La mayoría de los genes están dentro del intervalo de confianza que es 90-110%

3.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, RT-qPCR

Como análisis genético se utilizó RT-qPCR, una técnica que permite determinar la expresión relativa de los genes de interés, usando como gen de referencia el gen ribosomal 16S (*RNAr*). Una vez que el RNA está puro e íntegro se puede utilizar como molde en los experimentos.

El valor que proporciona esta técnica para comparar los niveles de expresión relativa de diversos genes sin tratamiento y con AgNPs es el llamado *cycle threshold* (C_T), el cual indica el número de ciclos que se requiere para que la señal de fluorescencia sobrepase el umbral y la muestra detectada pueda ser cuantificada.

Se utilizó el método $\Delta\Delta C_T$, haciendo uso de las C_T que arroja PikoReal, para comparar resultados relativos entre tratamientos de la siguiente manera:

Primero se normaliza el gen blanco con el gen de referencia, con y sin tratamiento con AgNPs

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen blanco} - C_T \text{ gen de referencia} \quad (3)$$

Enseguida se comparan las ΔC_T con tratamiento y sin tratamiento de los diversos genes blanco

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ con tratamiento} - \Delta C_T \text{ sin tratamiento (calibrador)} \quad (4)$$

Finalmente, se pueden obtener los niveles de expresión relativos al calibrador y normalizados con un gen de referencia

$$2^{-\Delta\Delta CT} \quad (5)$$

Los niveles de expresión relativa obtenidos para cada gen que codifica para las porinas de interés se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 21.

Asimismo se tabularon los datos obtenidos por RT-qPCR y se grafican a través del programa Graphad Prism. Se realizó un análisis de varianza por grupo “one-way ANOVA” para determinar si las medias de los grupos son diferentes, en donde obtenemos un valor de $P < 0.0001$. Por lo tanto establecemos que la hipótesis nula se rechaza y si existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 9. Expresión relativa de los genes de interés

| $2^{-\Delta\Delta CT}$ | | | | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>ompD</i> | <i>ompL</i> | <i>ompW</i> | <i>ompC</i> | <i>ompF</i> | <i>ompS1</i> | <i>ompS2</i> |
| 3.784230587 | 1.37554182 | 1.70526978 | 2.04202425 | 0.48632747 | 0.81790206 | 1.64718203 |
| 4.563054863 | 1.54756499 | 2.32946717 | 2.09943337 | 0.42337266 | 0.85856544 | 2.5668518 |
| 6.36429187 | 1.057018041 | 2.69446715 | 3.07375036 | 0.453759578 | 0.823591017 | 2.80888975 |

En la comparación de los niveles de expresión relativa de los genes de interés expuestas a AgNPs contra el gen calibrador, se utilizó la prueba de Bonferroni como post-test para comparar todos los pares de media de los grupos, donde solo *ompD* mostró diferencia significativa ($P < 0.001$) con respecto al gen calibrador.

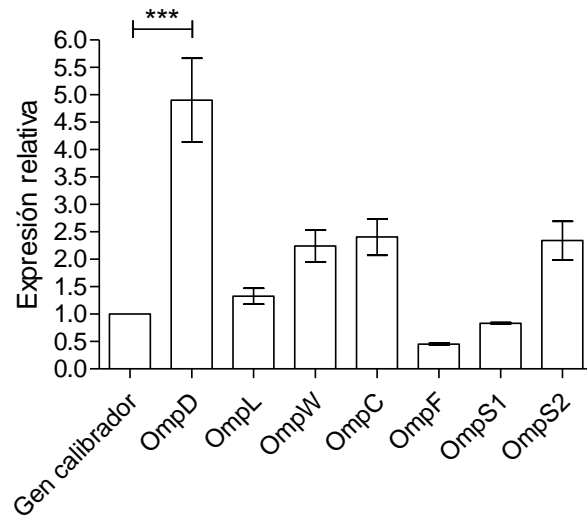


Figura 21. Expresión relativa de los genes de porinas de *S. Typhimurium* expuestas a 200µg/mL de AgNPs durante 30 minutos, con respecto a los valores obtenidos del gen calibrador (sin tratamiento).

Capítulo 4. Discusión

A) Evaluación de la inhibición de crecimiento bacteriano a través de la MIC

En este estudio se evaluó el efecto antimicrobiano de las AgNPs con las cepas parentales de *S. Typhimurium* y sus mutantes isogénicas en porinas. Este agente antimicrobiano inhibió efectivamente el crecimiento de las bacterias (Figuras 12-14) pero no se observó una diferencia de MICs entre las cepas parentales contra sus respectivas mutantes. Mientras que Radzig si observó una diferencia de MICs siendo que las mutantes en genes de porinas *E. coli* MC 4100 $\Delta ompF$, $\Delta ompC$ y $\Delta ompC\Delta ompF$ son de 4-8 veces más resistentes a AgNPs. Por otro lado Zarei, *et al.*, (2014) obtuvieron una MIC de AgNPs de 3.12 μ g/mL en contra de la cepa *S. Typhimurium* ATCC 35987. Con respecto a las AgNPs evaluadas en este proyecto, se sabe que sus dimensiones son de 35nm de diámetro promedio funcionalizadas con polivinilpirrolidona (PVP), las AgNPs de Radzig son de 8.3nm y finalmente 10nm las AgNPs de Zarei.

Con esto se puede inferir que las MICs son distintas al utilizar diferentes AgNPs (tamaño, funcionalización, forma, etc.); para evaluar el efecto antimicrobiano y además la participación de diferentes patógenos también puede variar el valor de las MICs. Queda claro que aunque *E. coli* y *S. Typhimurium* son bacterias Gram negativas y comparten ciertas características a tal grado de ser comparables, también se distinguen por tener diferentes proteínas de membrana externa, como la OmpD que es la porina más abundante en *S. Typhimurium* (10^5 porinas/célula) mientras que *E. coli* carece de esta proteína, por lo tanto la composición estructural es muy diferente. También es importante considerar que al silenciar un gen que expresa para una porina implica la expresión de otras porinas como expresó De la Cruz, *et al.* (2010), donde silencio el gen *ompC* en *E. coli* y se sobre-expresó la porina OmpA.

Además ya se ha reportado que el tamaño de las AgNPs si puede influir en su actividad antimicrobiana, mientras sea más pequeña la nanopartícula esta tendrá un mayor efecto.

B) Determinación de viabilidad bacteriana por medio de diluciones seriadas

Se asume que las porinas OmpC y OmpS1 pueden estar participando en la entrada de iones plata debido a que las mutantes isogénicas de porinas $\Delta ompC$ y $\Delta ompS1$ de la cepa parental ATCC 14028 muestran una tendencia de resistencia hacia las AgNPs, lo contrario para sus mutantes $\Delta ompF$ y $\Delta ompS2$, que parecen ser más sensibles en presencia de AgNPs por lo que se piensa que están participando en la salida de iones plata (Figura 22). Sin embargo, para la cepa parental 14028s y sus mutantes $\Delta ompD$, $\Delta ompL$ y $\Delta ompW$ isogénicas en porinas no mostraron una tendencia clara o rol en el intercambio de tóxicos. Se pretende aclarar la cuestión del papel de las porinas utilizando métodos moleculares a nivel genético, como se explicará en los siguientes apartados.

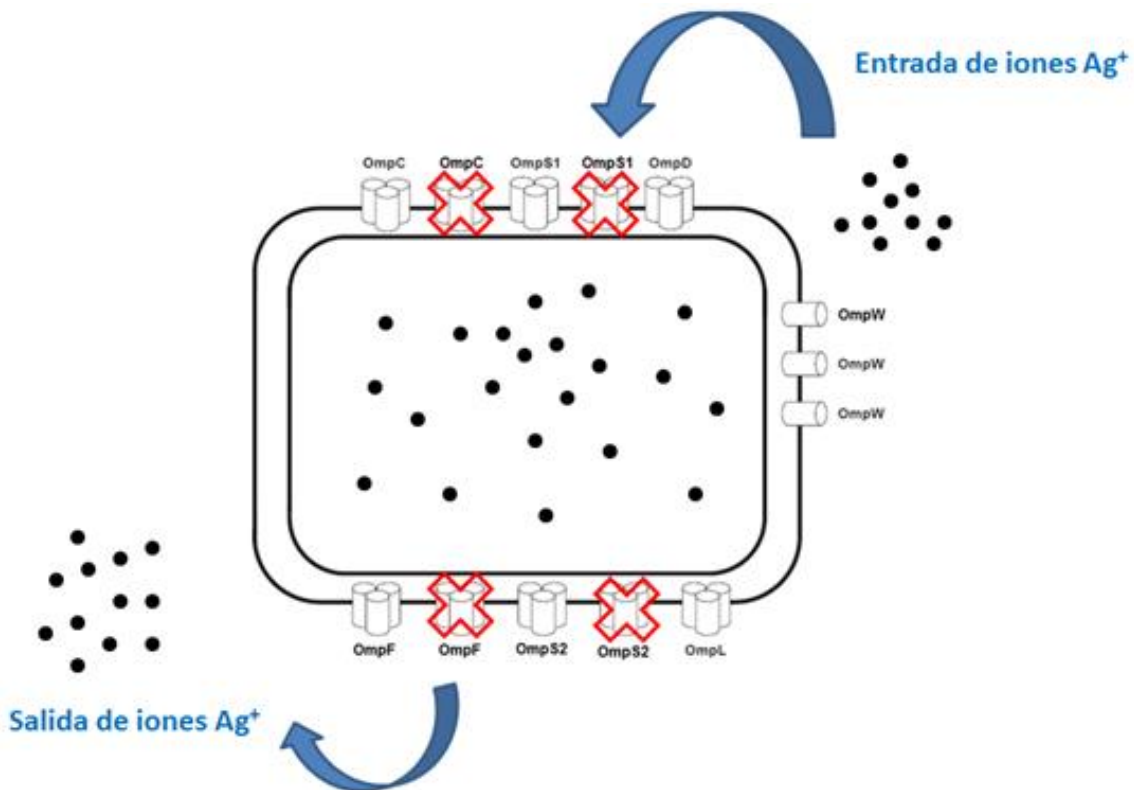


Figura 22. Papel de las porinas como medio de entrada y salida de iones de plata. (Modificado de De la Cruz y Calva, 2010)

Hasta el momento se han presentado resultados que se fundamentan en técnicas microbiológicas esperando observar una diferencia entre las cepas silvestres y sus respectivas mutantes isogénicas tratadas con AgNPs. Cada una de las técnicas ofrece información útil acerca del comportamiento de las bacterias en el ingreso o expulsión en el fenómeno de detoxificación, por un lado la técnica de macrodiluciones permite evaluar la inhibición bacteriana a través de la concentración mínima bactericida partiendo de una sola concentración de bacterias tratadas con diferentes concentraciones de AgNPs.

Con la técnica de diluciones seriadas se logró identificar una tendencia entre las cepas silvestres y sus mutantes, este método a diferencia de los anteriores analiza el comportamiento de diferentes concentraciones de bacterias a diferentes concentraciones de AgNPs simultáneamente, mientras que en las otras técnicas solo se varió las concentraciones de AgNPs pero no de bacterias (1×10^4), esta puede ser una de las razones por la cual no se logró obtener una diferencia entre cepas silvestres y mutantes. Además que diluciones seriadas proporciona un análisis cuantitativo mientras que las otras técnicas no, haciendo esta técnica más sensible.

C) Niveles de expresión relativa mediante RT-qPCR

De acuerdo a los resultados obtenidos por diluciones seriadas, se esperaba ver un incremento o disminución en los niveles de expresión genética de ciertas porinas con base en la viabilidad bacteriana observada de las mutantes isogénicas tratadas con AgNPs. Retomando la viabilidad de las mutantes $\Delta ompD$, $\Delta ompL$ y $\Delta ompW$ se observó que no hubo un efecto pronunciado al ser expuestas con las AgNPs, por lo tanto se esperaba que estas mutantes no presentaran una sobre-expresión o bajo nivel de expresión relativo significativo en comparación a su cepa parental. Esta idea concuerda con los observados en la porina OmpL, mientras que OmpD se sobre-expresó 4.9 veces más en presencia de AgNPs. Aunque no presentó ningún cambio en la viabilidad, no es de sorprenderse que haya presentado tal efecto en la expresión relativa debido a que OmpD es la porina más abundante en *S. Typhimurium*.

Por otro lado, la mutante $\Delta ompS1$ presentó resistencia al ser expuesta a AgNPs, contrario a $\Delta ompS2$ que mostró sensibilidad. Los resultados de la expresión relativa de ambas concuerdan con lo observado en los ensayos de viabilidad bacteriana, ya que

OmpS2 aumentó su expresión 2.3 veces más, lo contrario de OmpS1 que disminuyó su expresión 0.83 veces. Entonces podemos suponer que las porinas OmpD, OmpL, OmpW, OmpC y OmpS2 tienen como función auxiliar en la expulsión de iones Ag, mientras que OmpS1 y OmpF pueden participar en la entrada de iones Ag. Es evidente que OmpD y OmpS2 presentan una sobre-expresión más visible, de tal manera que estas porinas son las que podrían contribuir más en la salida de iones Ag.

Las aparentes inconsistencias encontradas entre los resultados de viabilidad y la expresión relativa de los genes que codifican para las diferentes porinas, se pueden racionalizar tomando en cuenta los siguientes aspectos:

1) La evaluación de los niveles relativos de mRNA mediante la técnica de RT-qPCR permiten cuantificar de manera muy eficiente los niveles transcripcionales de expresión. Sin embargo, es importante considerar que posteriormente se lleva a cabo la traducción (síntesis proteica), durante la cual, se puede manifestar otro mecanismo de control de la expresión genética.

2) Los ensayos de viabilidad se realizaron contrastando la sensibilidad de la cepa silvestre de *Salmonella* contra las mutantes isogénicas alteradas en las diferentes porinas. Se ha documentado que la presencia de mutaciones puede modificar la expresión de genes que codifican productos relacionados a la función perdida por la mutación en cuestión, esto es, un mecanismo compensatorio de la ausencia de una proteína de interés que ha dejado de expresarse. En este sentido, la ausencia de alguna porina, puede provocar que otra (u otras) porinas aumente o disminuya su expresión.

De tal manera que no podemos comparar directamente el resultado obtenido por los ensayos de viabilidad con los que obtuvimos de la cuantificación de la expresión relativa, pues esta segunda determinación se realizó necesariamente con la cepa silvestre y no con las mutantes.

A pesar de lo anterior, y tomando en cuenta los resultados de manera global, podemos afirmar que las porinas de *Salmonella* Typhimurium presentan actividad relacionada al proceso de desintoxicación provocado por AgNPs, aunque su función puede ser sólo una de varios mecanismos involucrados en dicho proceso.

Capítulo 5. Conclusiones

- Con el método de diluciones seriadas se observó una tendencia de resistencia entre las cepas mutantes, $\Delta ompC$ y $\Delta ompS1$, con sus respectivas cepas parentales. Mientras que $\Delta ompF$ y $\Delta ompS2$ presentaron una tendencia de sensibilidad al ser expuestas con AgNPs, apoyando nuestra hipótesis de que las porinas tienen un papel importante en la salida/entrada de iones de Ag^+ .
- La expresión relativa de los genes de interés permitió observar una diferencia muy pronunciada en las porinas siendo OmpD la porina más abundante y que aumentó su expresión de manera significativa; mientras que OmpS2 que es una porina de bajo nivel de expresión, aumentó también con base al gen calibrador. Por lo tanto, es posible que ambas porinas participen en la salida de iones Ag^+ .
- No existe diferencia entre las MICs y MBCs de las cepas parentales con sus respectivas mutantes, utilizando la técnica de macrodiluciones.

Capítulo 6. Perspectivas

- Complementar a las mutantes con plásmidos que contengan los genes específicos para corroborar los estudios de viabilidad bacteriana y de expresión relativa.
- Sobre-expresar las porinas que tuvieron mayor diferencia, a fin de contrastar con ensayos de viabilidad y expresión relativa.
- Llevar a cabo un análisis ultraestructural de las mutantes expuestas a AgNPs.
- Cuantificar la expresión relativa de las porinas mediante geles de poliacrilamida.

Lista de referencias bibliográficas

- Aditya, N. P., Vathsala, P. G., Vieira, V., Murthy, R. S. R., and Souto, E. B. (2013). Advances in nanomedicines for malaria treatment. *Advances in colloid and interface science*, 201, 1-17.
- Ahmad, Z., Pandey, R., Sharma, S., and Khuller, G. K. (2006). Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Indian journal of chest diseases and allied sciences*, 48(3), 171.
- An, J., Zhang, M., Wang, S., and Tang, J. (2008). Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1100-1107.
- Avalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., and Morales, P. (2014). Interactions of manufactured silver nanoparticles of different sizes with normal human dermal fibroblasts. *International wound journal*.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., and Swaminathan, B. (2000). Salmonella nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2465-2467.
- Choi, O., and Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental science and technology*, 42(12), 4583-4588.
- Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., de Crécy-Lagard, V., Craig, W. A., and Romesberg, F. E. (2005). Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS biology*, 3(6), 1024.
- Cowan, S. W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., ... and Rosenbusch, J. P. (1992). Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature*, 358(6389), 727-733.
- Dankovich, T. A., and Gray, D. G. (2011). Bactericidal paper impregnated with silver nanoparticles for point-of-use water treatment. *Environmental science and technology*, 45(5), 1992-1998.
- De la Cruz, M. A., and Calva, E. (2010). The complexities of porin genetic regulation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 18(1), 24-36.
- Delcour, A. H. (2003). Solute uptake through general porins. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 8, d1055-71.
- Durán, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I., Alves, O. L., and Esposito, E. (2007). Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*, 3(2), 203-208.

- Elliott, C. (2010). The effects of silver dressings on chronic and burns wound healing. *British Journal of Nursing*, 19(5), S32-S36.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., and Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
- Fernández, A., Picouet, P., and Lloret, E. (2010). Cellulose-silver nanoparticle hybrid materials to control spoilage-related microflora in absorbent pads located in trays of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1), 222-228.
- Fernández, L., and Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 661-681.
- Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J., and Calva, E. (1995). Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene*, 158(1), 67-72.
- Furno, F., Morley, K. S., Wong, B., Sharp, B. L., Arnold, P. L., Howdle, S. M., ... and Reid, H. J. (2004). Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(6), 1019-1024.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology* (Vol. 1325). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Gil, F., Ipinza, F., Fuentes, J., Fumeron, R., Villarreal, J. M., Aspée, A., ... and Saavedra, C. (2007). The *ompW* (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Research in microbiology*, 158(6), 529-536.
- Green, M. R., and Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*(Vol. 1). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gu, H., Ho, P. L., Tong, E., Wang, L., and Xu, B. (2003). Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano letters*, 3(9), 1261-1263.
- Guillier, M., Gottesman, S., and Storz, G. (2006). Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes and Development*, 20(17), 2338-2348.
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F., and Silver, S. (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature medicine*, 5(2), 183-188.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J. F., Louvet, R., ... and Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain

- reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant biotechnology journal*, 6(6), 609-618.
- Hansen-Wester, I., and Hensel, M. (2001). Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes and Infection*, 3(7), 549-559.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., and Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4), 279-284.
- Hwang, E. T., Lee, J. H., Chae, Y. J., Kim, Y. S., Kim, B. C., Sang, B. I., and Gu, M. B. (2008). Analysis of the Toxic Mode of Action of Silver Nanoparticles Using Stress-Specific Bioluminescent Bacteria. *Small*, 4(6), 746-750.
- Hwang, S., and Jeong, S. (2011). Electrospun nano composites of poly (vinyl pyrrolidone)/nano-silver for antibacterial materials. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 11(1), 610-613.
- Ipinza Fernández-Dávila, F. J. (2013). *Participación de las porinas OmpD, OmpW y mpL en la virulencia de Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Andrés Bello.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... and Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A., and Bryers, J. D. (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of biomedical materials research*, 53(6), 621-631.
- Knetsch, M. L., and Koole, L. H. (2011). New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. *Polymers*, 3(1), 340-366.
- Koebnik, R., Locher, K. P., and Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology*, 37(2), 239-253.
- Laluzza, P., Monzón, M., Arruebo, M., and Santamaría, J. (2011). Bactericidal effects of different silver-containing materials. *Materials Research Bulletin*, 46(11), 2070-2076.
- Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms—how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. *Anaerobe*, 17(6), 280-285.
- Li, X. Z., Nikaido, H., and Williams, K. E. (1997). Silver-resistant mutants of Escherichia coli display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *Journal of bacteriology*, 179(19), 6127-6132.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.

- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., and Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Naraginti, S., and Sivakumar, A. (2014). Eco-friendly synthesis of silver and gold nanoparticles with enhanced bactericidal activity and study of silver catalyzed reduction of 4-nitrophenol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 128, 357-362.
- Nikaido, H. (1992). Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular microbiology*, 6(4), 435-442.
- Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 3905-3908.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.
- Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews*, 49(1), 1.
- Nowack, B., Krug, H. F., and Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental science and technology*, 45(4), 1177-1183.
- OMS (2013, Agosto). *Salmonella (no tifoidea)*. Recuperado el 22 de Noviembre del 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- Pages, J. M. (2004). Role of bacterial porins in antibiotic susceptibility of Gram-negative bacteria. *Bacterial and Eukaryotic Porins*, 41-59.
- Pang, T., Bhutta, Z. A., Finlay, B. B., and Altwegg, M. (1995). Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends in microbiology*, 3(7), 253-254.
- Percival, S. L., Bowler, P. G., and Dolman, J. (2007). Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. *International wound journal*, 4(2), 186-191.
- Periasamy, S., Joo, H. S., Duong, A. C., Bach, T. H. L., Tan, V. Y., Chatterjee, S. S., ... and Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1281-1286.
- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., and Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 300-306.
- Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.

- Saier, M. H., Tran, C. V., and Barabote, R. D. (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic acids research*, 34(suppl 1), D181-D186.
- Santiviago, C. A., Toro, C. S., Hidalgo, A. A., Youderian, P., and Mora, G. C. (2003). Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium major porin, OmpD. *Journal of bacteriology*, 185(19), 5901-5905.
- Schulz, G. E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1565(2), 308-317.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 341-353.
- Silver, S., and Ji, G. (1994). Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 3), 107.
- Silver, S., and Phung, L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 753-789.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., and Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., and Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 521-524.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034.
- Wijnhoven, S. W., Peijnenburg, W. J., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H., ... and Geertsma, R. E. (2009). Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2), 109-138.
- Wu, D., Fan, W., Kishen, A., Gutmann, J. L., and Fan, B. (2014). Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics*, 40(2), 285-290.
- Yamanaka, M., Hara, K., and Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7589-7593.
- Zarei, M., Jamnejad, A., and Khajehali, E. (2014). Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1).