

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



**Maestría en Ciencias
de la Vida con orientación en Microbiología**

**Efecto de nanocompuestos antimicrobianos en la expresión de
genes asociados a la formación de biopelículas y patogénesis
en *Vibrio cholerae***

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

Presenta:

Anaid Meza Villezcas

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Anaid Meza Villezcas

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector de tesis

Dra. Ana Lucía Gallego Hernández
Codirectora de tesis

Miembros del comité

Dra. Sharon Zinah Herzka Llona

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida



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

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Anaid Meza Villezcas © 2017

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

Resumen de la tesis que presenta **Anaid Meza Villezcas** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología

Efecto de nanocompuestos antimicrobianos en la expresión de genes asociados a la formación de biopelículas y patogénesis en *Vibrio cholerae*

Resumen aprobado por:

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Codirector de tesis

Dra. Ana Lucía Gallego Hernández
Codirectora de tesis

Vibrio cholerae es el agente etiológico del cólera. Tiene la capacidad de cambiar entre una forma de vida móvil (planctónica) a sésil (biopelícula). La biopelícula es una forma de crecimiento especializada y altamente adaptada, descrita como la forma de vida que brinda protección contra cambios ambientales y depredación, que incrementa la tolerancia a antibióticos y desinfectantes, y que promueve un incremento en su sobrevivencia y persistencia tanto en ambientes acuáticos como en el hospedero. *V. cholerae* puede ser ingerida por el humano en sus dos formas de vida y colonizar el intestino. En busca de un tratamiento contra infecciones bacterianas, se evaluaron los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en cultivos planctónicos y formación de biopelícula superficial y bentónica de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor variante rugosa. El nanocompuesto ZEO-AgNPs inhibe la formación de la biopelícula superficial (formada en la interface medio de cultivo-aire) a 4 µg/ml, e inhibe la formación de biopelícula bentónica y elimina a las células planctónicas a 8 µg/ml. Por el contrario, los nanocompuestos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs no ejercen un efecto antimicrobiano en ninguna forma de vida de *V. cholerae*. Imágenes de microscopía electrónica de barrido no mostraron daño aparente en las células que conformaban la biopelícula superficial y bentónica causado por los tratamientos con ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs a concentraciones sub-letales. Las células del cultivo planctónico presentaron modificaciones en la arquitectura celular y presencia de vesículas o restos celulares. Por último, la exposición a los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs generó modificaciones en los niveles de expresión relativa de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* relacionados con la formación de la biopelícula superficial y bentónica, así como en la expresión de los genes *ompU* y *ompT*, que codifican para proteínas de membrana externa que juegan un papel importante en la sobrevivencia de *V. cholerae*. Este trabajo ofrece una base para profundizar en el estudio del efecto de los nanomateriales a nivel estructural y genético, y entender los mecanismos de respuesta de *V. cholerae* ante los nanocompuestos. Dicha información permitirá sustentar su posible aplicación como un agente antimicrobiano para inhibir la formación de biopelículas de *V. cholerae*.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, biopelícula, cultivo planctónico, factores de virulencia, reguladores transcripcionales, nanocompuestos, antimicrobianos.

Abstract of the thesis presented by **Anaid Meza Villezcas** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life science with orientation in microbiology.

Effect of antimicrobial nanocomposites in the expression of genes associated with the biofilm formation and pathogenesis in *Vibrio cholerae*

Abstract approved by:

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Thesis Co-director

Dra. Ana Lucía Gallego Hernández
Thesis Co-director

Vibrio cholerae is the etiologic agent of cholera. It has the ability to switch between a mobile (planktonic) and sessile (biofilm) life style. Biofilm is a specialized and highly adapted form of growth, described as a way of life that provides protection against environmental changes and predation, which increases tolerance to antibiotics and disinfectants, promotes an increase in its survival and persistence in both aquatic and host environments. *V. cholerae* can be ingested by the human in its two forms of life and colonize the intestine. Looking for a treatment against bacterial infections, the effect of nanocomposites ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs and ZEO-ZnNPs was evaluated in planktonic cultures and in the superficial and benthic biofilm formation of *V. cholerae* O1 biotype El Tor variant rugose. The ZEO-AgNPs nanocomposite inhibited the formation of the superficial biofilm (formed between the interphase air-liquid) at 4 µg/ml, prevented benthic biofilm formation and eliminated planktonic cells at 8 µg/ml. In contrast, the nanocomposites ZEO-CuNPs and ZEO-ZnNPs did not exert an antimicrobial effect on any life form of *V. cholerae*. Scanning electron microscopy images showed no apparent damage in the cells forming the superficial and benthic biofilm caused by the treatments with ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs and ZEO-ZnNPs at sub-lethal concentrations. Planktonic cells presented modifications in the cellular architecture and vesicles or cellular debris were observed. Finally, exposure to the nanocomposites ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs and ZEO-ZnNPs generated changes in the relative expression levels of the *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* and *bap1*, genes involved in the formation of the superficial and benthic biofilm, as well as in the *ompU* and *ompT* genes, which encode two outer membrane proteins that play an important role in the survival of *V. cholerae*. This work provides the necessary bases to deepen the study of the effect of nanomaterials at structural and genetic level in order to understand the mechanisms of *V. cholerae* response to the nanocomposites. Such information will support the possible application as an antimicrobial agent to inhibit the formation of biofilms of *V. cholerae*.

Keywords: *Vibrio cholerae*, biofilm, planktonic culture, virulence factors, transcriptional regulators, nanocomposites, antimicrobial.

Dedicatoria

A mis Padres, mi novio, amigos y familiares.

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a mi director de tesis Dr. Alejandro Huerta Saquero, por permitirme seguir colaborando con él y darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo de maestría. Tus conocimientos, orientación, persistencia y motivación han sido fundamentales para mi formación. Alejandro, te has ganado mi lealtad y admiración, convirtiéndote no solo en mi director de tesis y tutor, sino también en mi colega y mi amigo.

Agradezco a la Dra. Ana Lucia Gallego Hernández, quien ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico, sin los cuales no podría tener la formación profesional que hoy tengo. Haz sido para mí un excelente ejemplo de perseverancia y entrega, gracias por permitirme aprender de ti.

Agradezco a mi comité de tesis, la Dra. Sharon Herzka y el Dr. Leonardo Lizarraga por su colaboración y aportaciones, por su tiempo y disposición, por su confianza e interés en este proyecto. Muchas gracias.

Gracias CICESE, gracias a la Dra. Rufina Hernández, directora de estudios de posgrado, y a la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez, coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida. Muchas gracias a Servicios Escolares y Biblioteca, en especial a Dolores Sarracino, Norma Fuentes, Citlali Romero, Rebeca Pineda, Ruth Eaton, Álvaro Armenta, Ely Alvares y Adriana Mejía, gracias por su paciencia, apoyo y asesoría.

Gracias al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, a los doctores Rafael Vázquez, Rubén Cadena, Katrin Quester, Itandehui Betanzo y Ana Rodríguez por permitirme desarrollar mi trabajo de tesis y brindar siempre todas las facilidades. Gracias también a todos y cada uno de los integrantes del departamento “Biono” por los buenos momentos y excelentes pláticas, particularmente a mis buenos amigos, Paulina, Roberto, Luis Ángel, Ramiro, Cristina e Iván.

A la Dra. Fitnat Yildiz y a su equipo de trabajo por recibirme en su laboratorio en el departamento de microbiología y toxicología ambiental en la UCSC, sin duda una de las mejores experiencias académicas de mi vida. De manera especial al microscopista Tom Yuzvinsky.

Gracias Dr. Oscar Raymond y Dr. Oscar Jaime por su colaboración y financiamiento por parte del proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IN110315.

Agradezco a toda mi familia, en especial a mi madre Guadalupe Villezcas y a mi padre Juan Manuel Meza, a mi hermana Diana Wido y a mis sobrinos, por su apoyo incondicional y motivación.

Muchas muchas gracias Israel Torres por siempre estar conmigo, en las buenas y en las malas, no hay palabras para explicar lo mucho que te agradezco y te amo ♥.

A mis amigos, quienes a pesar de la distancia siempre me apoyaron, en especial a Felipe, Yasmín y Diana.

Finalmente, agradezco a CONACYT por su apoyo con mi beca de posgrado, al programa UC MEXUS – CICESE proyecto No. CN 15-46 por financiar y haber hecho posible mi estancia en la UCSC y al proyecto PAPIIT IN204815 por su financiamiento.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas.....	x
Lista de formulas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 <i>Vibrio cholerae</i>	2
1.1.1 Formación de la biopelícula	5
1.1.2 Polisacáridos de <i>Vibrio</i>	7
1.1.3 Proteínas de matriz	10
1.3 Antecedentes	15
1.3.1 Mecanismos de acción de los nanomateriales	15
1.3.2 Efecto de nanomateriales en <i>Vibrio</i>	19
1.4 Justificación	21
1.5 Hipótesis.....	21
1.6 Objetivos	22
1.6.1 Objetivo general.....	22
1.6.2 Objetivos específicos.....	22
Capítulo 2. Materiales y Métodos	23
2.1. Caracterización de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	23
2.2. Evaluación del efecto antimicrobiano de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	23
2.2.1. Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento	23
2.2.2. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) e inhibitoria (CMI) de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en cultivos planctónicos y en formación de biopelícula en <i>V. cholerae</i>	24
2.3. Análisis ultraestructural del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en <i>V. cholerae</i>	26
2.4. Análisis del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs sobre la expresión de genes <i>vpsL</i> , <i>vpsR</i> , <i>rbmA</i> , <i>bap1</i> , <i>ompU</i> y <i>ompT</i> involucrados en la formación de biopelícula en <i>V. cholerae</i>	27
2.4.1. Extracción, purificación y cuantificación de RNA asociado a la formación de biopelícula de <i>V. cholerae</i> post tratamiento	27

2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real: Síntesis de cDNA y cuantificación por tiempo real RT-qPCR	29
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	31
3.1 Caracterización de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	31
3.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	34
3.3 Análisis ultraestructural del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en <i>V. cholerae</i>	36
3.4 Análisis del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en la expresión de genes involucrados en la formación de biopelícula y en la patogénesis de <i>V. cholerae</i>	41
3.4.1 Expresión de los genes <i>vpsR</i> , <i>vpsL</i> , <i>rbmA</i> y <i>bap1</i> en la biopelícula superficial de <i>V. cholerae</i>	41
3.4.2 Expresión de los genes <i>vpsR</i> , <i>vpsL</i> , <i>rbmA</i> y <i>bap1</i> en la biopelícula bentónica de <i>V. cholerae</i>	42
3.4.3 Expresión de los genes <i>ompU</i> y <i>ompT</i> en la biopelícula superficial y bentónica de <i>V. cholerae</i>	44
Capítulo 4. Conclusiones	47
Capítulo 5. Perspectivas	48
Literatura citada	49
Anexos	53

Lista de figuras

Figura 1. Morfología de colonias de <i>Vibrio cholerae</i> El Tor variante lisa y rugosa	3
Figura 2. Ciclo de vida de <i>V. cholerae</i>	4
Figura 3. Proceso de formación de la biopelícula de <i>V. cholerae</i>	7
Figura 4. Organización genómica y regulación de los genes <i>vps</i> y de producción de proteínas de matriz de <i>V. cholerae</i>	9
Figura 5. Arquitectura tridimensional de la biopelícula de <i>V. cholerae</i>	10
Figura 6. Composición de un cultivo estático de <i>V. cholerae</i> O1 El Tor A1552 variante rugosa tras 48 h de incubación.....	12
Figura 7. Expresión coordinada de CT, TCP, OmpU y OmpT por los reguladores ToxR y CRP	13
Figura 8. Posibles mecanismos de acción de nanomateriales antimicrobianos en bacterias	18
Figura 9. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuesto ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.....	32
Figura 10. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los nanocompuesto ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.....	33
Figura 11. Crecimiento de <i>V. cholerae</i> en presencia de ZEO-AgNPs cultivada a diferentes concentraciones de NPs expresado como el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml)	34
Figura 12. Crecimiento de <i>V. cholerae</i> en presencia de ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs y cultivada a diferentes concentraciones de NPs expresado como el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml).....	36
Figura 13. Estructura de la biopelícula superficial post-tratamiento con zeolitas con y sin nanopartículas.	38
Figura 14. Estructura de las células planctónicas post-tratamiento con zeolitas con y sin nanopartículas	39
Figura 15. Estructura de la biopelícula bentónica post-tratamientos con zeolitas con y sin nanopartículas	40
Figura 16. Niveles de expresión de los genes <i>vpsR</i> , <i>vpsL</i> , <i>rbmA</i> y <i>bap1</i> de la biopelícula superficial post-tratamientos: ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	42
Figura 17. Niveles de expresión de los genes <i>vpsR</i> , <i>vpsL</i> , <i>rbmA</i> y <i>bap1</i> de la biopelícula bentónica post-tratamientos : ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs	43
Figura 18. Niveles de expresión de los genes <i>ompU</i> y <i>ompT</i> de la biopelícula superficial y bentónica post-tratamientos: ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.....	45

Anexo 1. Análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.....	53
Anexo 2. Número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.	56
Anexo 3. Visualización de células de <i>V. cholerae</i> a las 6, 12 y 24 horas en el control sin nanocompuesto y en presencia de la zeolita sin nanopartículas	57

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación de los genes <i>vps</i> y su función.	8
Tabla 2. Ejemplos de materiales nanoestructurados y sus efectos tóxicos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.....	16
Tabla 3. Reportes de la evaluación de nanomateriales en el género <i>Vibrio</i>	20
Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes de interés y su eficiencia de amplificación.....	30
Tabla 5. Análisis químico de CEO-AgNPS, CEO-CuNPs y CEO-ZnNPs por ICP-AES	31

Lista de formulas

Fórmula 1. Estimación del número de unidades formadoras de colonia por mililitro (CFU/ml).	26
Fórmula 2. Estimación de la expresión relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	30

Capítulo 1. Introducción

El patógeno humano *Vibrio cholerae*, agente etiológico del cólera, es constantemente monitoreado debido a su virulencia, persistencia y antecedentes pandémicos (WHO, 2015). Anualmente se reportan 3 a 5 millones de casos de cólera con más de 100,000 defunciones (Faruque *et al.*, 1998; Almagro-Moreno *et al.*, 2015; WHO, 2015; Sarwar *et al.*, 2016). *V. cholerae* se asocia a ecosistemas acuáticos en dos formas de vida fisiológica y fenotípicamente distintas: como células planctónicas con capacidad móvil o como agregados sésiles asociados a superficies llamados biopelículas (Faruque *et al.*, 1998; Fong *et al.*, 2006; Yildiz *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2015). La incidencia de brotes de cólera se vincula principalmente al consumo de agua y alimentos contaminados, consecuencia de un tratamiento y saneamiento inadecuado, en donde, aquellos países en situaciones de emergencia o en vías de desarrollo son más afectados (Almagro-Moreno *et al.*, 2015; OMS, 2015).

La ingesta de *V. cholerae* causa infección intestinal severa (Almagro-Moreno *et al.*, 2015), y es debido a la deshidratación, consecuencia de la diarrea acuosa aguda, y a un tratamiento adecuado que la infección causada por *V. cholerae* puede llevar a la muerte (Giglio *et al.*, 2013). Se ha descrito previamente que si el contagio es causado por la ingesta de biopelículas de *V. cholerae*, el cuadro infeccioso es significativamente más severo que cuando la infección es causada por células planctónicas. En este sentido, se ha reportado que la incidencia del cólera se reduce un 48% cuando partículas mayores a 20 μm son removidas por filtración del agua de consumo, ya que de esta manera se eliminan partículas y organismos contaminados con biopelículas de *V. cholerae* (Giglio *et al.*, 2013).

La rehidratación y agentes antimicrobianos, como los antibióticos, son la única alternativa para el tratamiento del cólera, y aunque el tratamiento en la mayoría de los pacientes es efectivo -si es oportuno-, se sabe que puede no ser efectivo en aquellos casos donde la infección sea avanzada o bien asociada a la ingesta de agregados (Giglio *et al.*, 2013; Kitaoka *et al.*, 2017). Desde otra perspectiva, la utilización excesiva y errónea de antibióticos se ha vinculado a la aparición de cepas multiresistentes, lo que constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial, ya que se ve reducida la eficacia de los tratamientos e incrementa el riesgo de propagación de microorganismos resistentes (Kitaoka *et al.*, 2017).

En busca de un tratamiento alternativo, algunos elementos químicos inorgánicos como metales con propiedades antimicrobianas y sintetizados en escala nanométrica han sido estudiados con gran interés. El área de estudio que busca la aplicación de nanomateriales en sistemas biológicos es la

bionanotecnología, área emergente e interdisciplinaria que estudia la interacción entre la materia a escala nanométrica y los sistemas biológicos. Lograr caracterizar y comprender dichas interacciones permitirá el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías. Se ha reportado que una gran variedad de bacterias es susceptible al efecto de nanopartículas metálicas (Guerra *et al.*, 2013; Salem *et al.*, 2015; Sarwar *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Sin embargo, el manejo y aplicación de nanopartículas tiene como desventaja su inestabilidad, ya que al entrar en contacto con componentes orgánicos, como proteínas, lípidos, suero, fluidos corporales o bien agentes inorgánicos como la luz, cambios de temperatura o pH, provocan que estas pierdan sus propiedades antimicrobianas de interés (Fleischer *et al.*, 2013). En este sentido, la necesidad de conservar las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas metálicas propicia el desarrollo de dispositivos que incrementen su estabilidad. Es por ello que el uso de zeolitas, como soporte de nanopartículas con propiedades antimicrobianas, es una línea de investigación prometedora para el desarrollo de nuevos nanocompuestos antimicrobianos. De acuerdo a sus características, las zeolitas dopadas con nanopartículas metálicas logran incrementar la estabilidad química y térmica de las nanopartículas, presentan gran área superficial y alta capacidad de intercambio iónico, así como una baja o nula toxicidad (Dong *et al.*, 2014; Shameli *et al.*, 2015; Jaime-Acuña *et al.*, 2016).

El uso de nanocompuestos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, o bien para el control de microorganismos con potencial epidemiológico, representa una alternativa real. Sin embargo, la respuesta de los microorganismos al interactuar con los nanomateriales se desconoce, por lo que es necesario estudiar los mecanismos de respuesta a nanomateriales antes de proponer su uso como dispositivos o tratamientos de enfermedades infecciosas en seres humanos o animales de importancia económica.

1.1 *Vibrio cholerae*

El cólera es causado por la bacteria Gram-negativa *V. cholerae*, especie conformada por más de 100 serogrupos, de los cuales solo los serogrupos O1 y O139 son epidémicos y presentan la toxina CT (Faruque *et al.*, 2008). El serogrupo O1 es subdividido en 2 biotipos, clásico y El Tor, que difieren en la severidad de los síntomas clínicos y en la expresión y regulación de los principales factores de virulencia (Sarwar *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). El biotipo El Tor tiene la capacidad de cambiar entre 2 variantes fenotípicas, llamadas lisa y rugosa (Figura 1). La variante lisa produce menos polisacáridos extracelulares (VPS, *Vibrio polysaccharides*), forma biopelículas frágiles y es fácilmente eliminada con tratamiento de cloro; por su parte la variante rugosa se caracteriza por una sobreproducción de VPS, presenta mayor tolerancia al cloro

y está mejor adaptada al crecimiento y sobrevivencia en los ambientes acuáticos (Yildiz *et al.*, 2001; Sinem. Beyhan *et al.*, 2007).

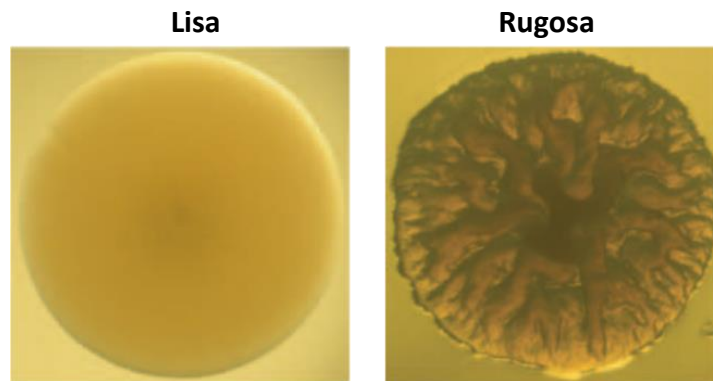


Figura 1. Morfología de colonias de *Vibrio cholerae* El Tor variante lisa y rugosa. Modificado de Beyhan *et al.*, 2007.

Vibrio cholerae tiene la capacidad de colonizar distintos nichos ecológicos, como el intestino humano o ecosistemas acuáticos (Figura 2). En el ambiente acuático, *V. cholerae* se encuentra como células planctónicas altamente activas y formando biopelículas en plancton, sedimentos, u otros sustratos orgánicos o inorgánicos (Figura 2.A) (Teschler *et al.*, 2015). *V. cholerae* puede ser ingerida por el humano en sus dos formas de vida y colonizar el intestino. Durante su permanencia en el intestino del hospedero, dos de los principales factores de virulencia son expresados, (i) la toxina del cólera (TC), que es responsable de la diarrea acuosa aguda característica de esta enfermedad, y (ii) la toxina reguladora del pili (TCP), que media la adherencia y formación de las microcolonias además de ser requerida para la colonización intestinal (Figura 2.B) (Teschler *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). Una vez que *V. cholerae* se ha establecido en el intestino, ya sea como células planctónicas o biopelículas, puede salir a través de las heces y reintegrarse a un medio acuático, continuar con su ciclo de vida e infectar nuevamente a un hospedero (Figura 2.C) (Teschler *et al.*, 2015).

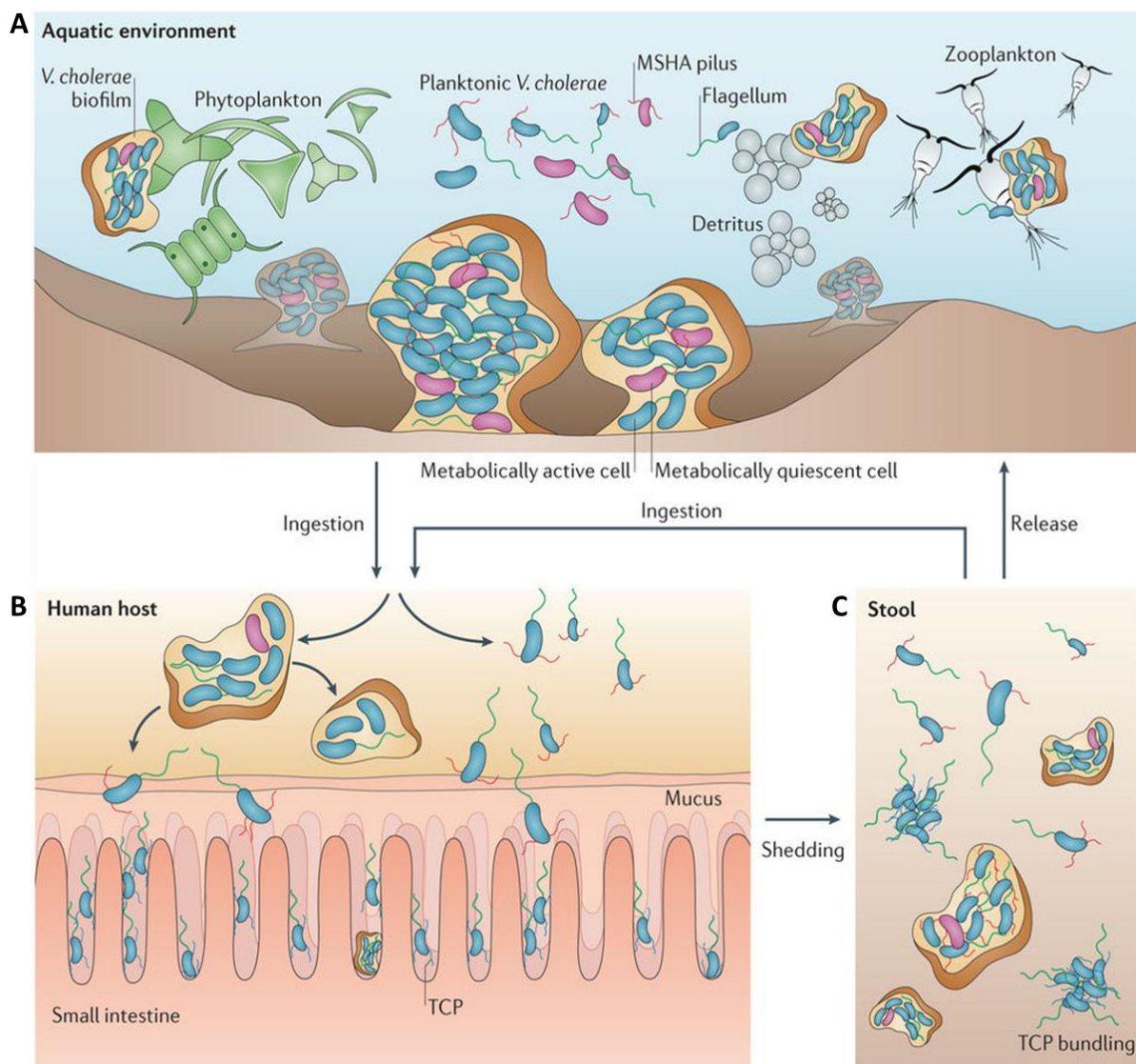


Figura 2. Ciclo de vida de *V. cholerae*. *V. cholerae* se encuentra en su forma de planctónica altamente móvil en el ambiente acuático, así como en formación de biopelículas en zooplancton, fitoplancton y sedimentos entre otras (A). Ambas formas de vida de *V. cholerae* logran colonizar el intestino y producen la enfermedad del cólera (B). Tanto células planctónicas como biopelículas son reincorporadas al ambiente acuático por medio de las heces fecales (C). Tomado de Teschler *et al.*, 2015.

Diversos factores físicos, químicos y biológicos pueden llegar a generar estrés en los diferentes ambientes a los que se enfrenta *V. cholerae*. En el tracto gastrointestinal humano, *V. cholerae* está expuesto a pH ácido, ácidos biliares, osmolaridad elevada, limitación de hierro, péptidos antimicrobianos y periodos intermitentes de falta de nutrientes (Figura 2.B). Por otro lado, en los ambientes acuáticos, *V. cholerae* se enfrenta a la limitación de nutrientes, cambios extremos de temperatura, estrés oxidativo y depredación por bacteriófagos y protozoarios (Figura 2.A). Debido a esto, *V. cholerae* ha desarrollado la capacidad de

emplear diversas estrategias de sobrevivencia como: (i) la activación de mecanismos de respuesta a estrés, (ii) expresión de movilidad flagelar y quimiotaxis, (iii) la adherencia o (iv) separación de superficies y (v) el desarrollo de comunidades sésiles multicelulares. Esto se resume en la capacidad de cambiar entre una forma de vida móvil (planctónica) a sésil (biopelícula) en respuesta a cambios en el medio ambiente, estrategia particularmente crítica para la sobrevivencia de *V. cholerae* (Silva y Benítez, 2016). Debido a que la capacidad epidémica de *V. cholerae* se relaciona con su sobrevivencia en ambientes hostiles y ésta a su vez se vincula con la formación de biopelículas, el estudio de esta forma de vida es de particular importancia para el desarrollo de estrategias del control del cólera.

Las biopelículas son formas de crecimiento especializadas y altamente adaptadas (Yildiz *et al.*, 2001). Por definición, una biopelícula es una asociación microbiana sésil caracterizada por la unión a un sustrato por medio de la excreción de una matriz compuesta de sustancias exopoliméricas y proteínas (Slonczewski *et al.*, 2009; Yildiz *et al.*, 2009). Se ha descrito que esta forma de vida brinda protección contra cambios ambientales y depredación, incrementa su tolerancia a antibióticos y desinfectantes teniendo como consecuencia un incremento en la sobrevivencia y persistencia, tanto en ambientes acuáticos como en el hospedero (Yildiz *et al.*, 2008, 2009; Slonczewski *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016). Reportes previos mencionan que la formación de biopelículas juega un papel importante en el proceso de enfermedad y la virulencia durante la infección. Se ha demostrado que los biopelículas de *V. cholerae* muestran una capacidad infecciosa significativamente mayor que las células planctónicas (Giglio *et al.*, 2013; Hollenbeck *et al.*, 2014) y que los perfiles de transcripción global difieren entre las formas de vida (Moorthy *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2016).

1.1.1 Formación de la biopelícula

La formación de la biopelícula es un proceso de múltiples pasos (Figura 3). *V. cholerae* comienza con un movimiento cerca de una superficie escaneando grandes áreas por medio de pili-MSHA (mannose-sensitive haemagglutinin pilus). Interacciones fuertes entre la superficie y el pili promueven que la célula concentre su movimiento en un área menor, permitiendo eventualmente su adherencia a la superficie y promoviendo la formación de una microcolonia. Posterior a la adherencia inicial, los VPS son excretados a la superficie celular (Figura 3.Ba); esta secreción se observa a lo largo de la formación de biopelícula. A continuación, comienza la excreción de las proteínas de matriz. La proteína RbmA (Rugosity and biofilm structure modulator A) se acumula en la superficie de la célula (Figura 3.Bb). Durante la división celular,

las células hijas permanecen unidas a la célula parental conformando el rol de adhesión célula-célula por RbmA. La proteína Bap1 (biofilm matriz protein 1) es excretada entre las dos células unidas y en la superficie cerca de ellas (Figura 3.Bc). Bap1 gradualmente se acumula radialmente cerca de las superficies. Subsecuentemente, RbmC (Rugosity and biofilm structure modulator C) es excretada y se localiza en sitios discretos de la superficie celular (Figura 3.Bd). Conforme al desarrollo de la biopelícula, VPS, RbmC y Bap1 forman una envoltura que permite el crecimiento y división celular (Figura 3.Be). La biopelícula madura es una estructura organizada de agregados celulares, VPS, RbmA, Bap1, RbmC y de otros componentes como vesículas de membrana externa (OMVs), DNA extracelular y proteínas de membrana externa (OMPs-outer membrane proteins) (Figura 3.Bf). El último estadio de desarrollo de la biopelícula consiste en su dispersión, en donde células se separan de la biopelícula y comienzan la búsqueda y colonización de una nueva superficie (Berk *et al.*, 2012; Teschler *et al.*, 2015).

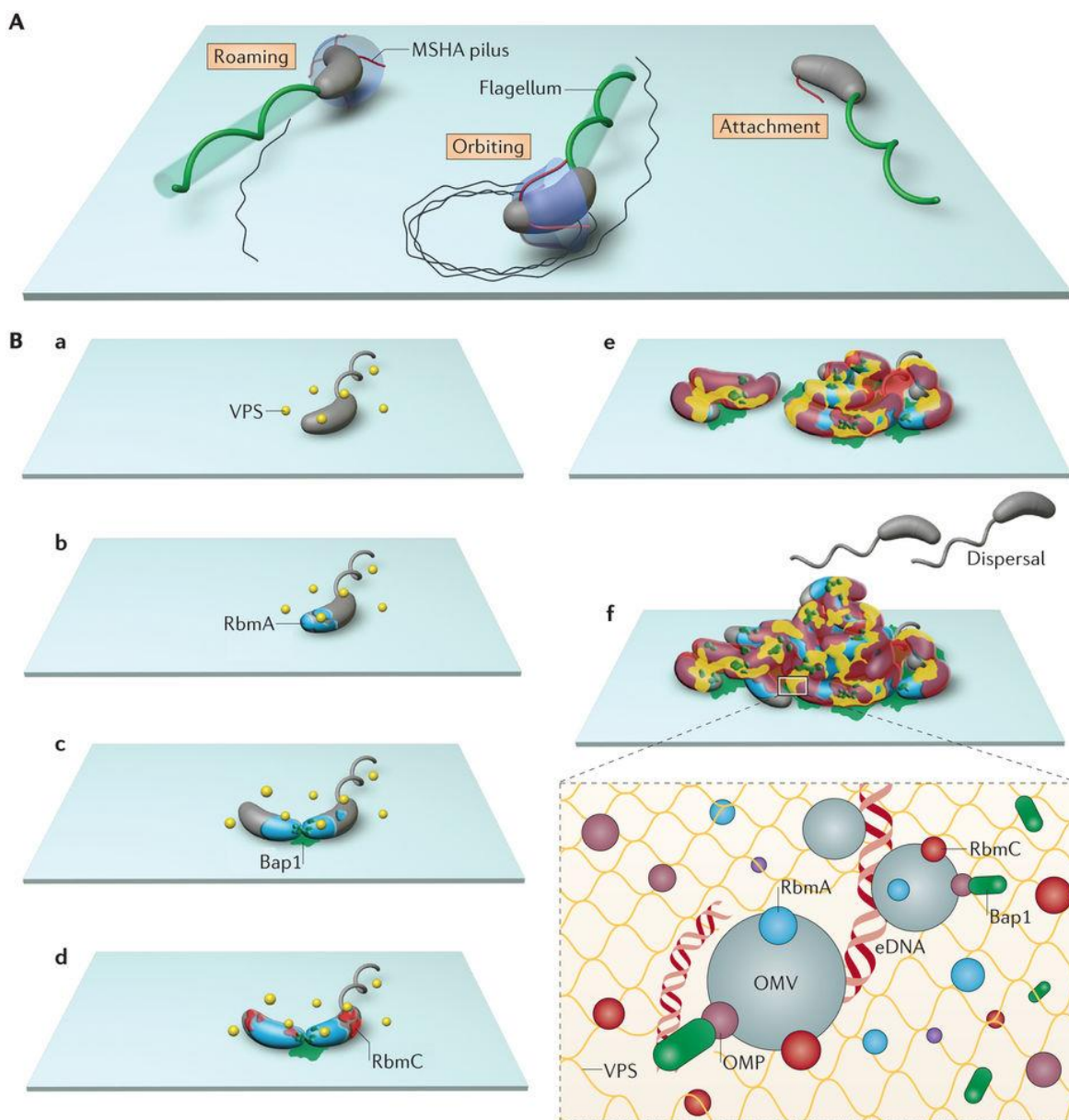


Figura 3. Proceso de formación de la biopelícula de *Vibrio cholerae*. A) Etapa de fijación o anclaje a la superficie. B) Etapa de formación y consolidación de la biopelícula. Tomado de Teschler *et al.*, 2015.

1.1.2 Polisacáridos de *Vibrio*

Los VPS conforman el 50% de la matriz de la biopelícula y son esenciales para el desarrollo de la biopelícula madura (Teschler *et al.*, 2015). Los genes involucrados en la producción de VPS están organizados en dos grupos, *vps-I* y *vps-II* conformado por 12 y 6 genes, respectivamente. Estos genes se subdividen en seis clases en cuanto a su función. La clase I son proteínas necesarias para producción de nucleótidos

precursores de azúcares. La clase II codifica para glicosiltransferasas que catalizan la transferencia de residuos de azúcar a moléculas aceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos; se prevé que estos genes están involucrados en la iniciación y/o elongación de subunidades de VPS. La clase III codifica para proteínas involucradas en la polimerización y exportación de los VPS. La clase IV codifican para acetiltransferasas involucradas en la adición de grupos acetilo a los polisacáridos. La clase V codifica para una proteína, la fosfotirosina fosfatasa, involucrada en la regulación de la producción de exopolisacáridos. Por último, en la clase VI se agrupan proteínas hipotéticas; el rol de estas proteínas se asocia a la formación de la biopelícula en la producción de VPS (Tabla 1) (Fong *et al.*, 2010; Teschler *et al.*, 2015).

Tabla 1. Clasificación de los genes *vps* y su función.

Grupo	Clase	Gen	Función
<i>vps-1</i>	V	VpsU	Proteína fosfotirosina fosfatasa
	I	VpsA	UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina-2-epimerasa
	I	VpsB	UDP- <i>N</i> -acetilglucosamina-2-epimerasa
	IV	VpsC	Acetiltransferasa
	II	VpsD	Glicosiltransferasa
	III	VpsE	Exportador de polisacáridos
	VI	VpsF	Proteína hipotética
	IV	VpsG	Acetiltransferasa
	III	VpsH	Exportador de polisacáridos
	II	VpsI	Glicosiltransferasa
	VI	VpsJ	Proteína hipotética
	II	VpsK	Glicosiltransferasa
	<i>vps-2</i>	II	VpsL
VI		VpsM	Proteína hipotética
III		VpsN	Exportador de polisacáridos
III		VpsO	Exportador de polisacáridos
VI		VpsP	Proteína hipotética
VI	VpsQ	Proteína hipotética	

La expresión de los genes *vps* es regulada positivamente por VpsR y VpsT (Figura 4). VpsR es el regulador principal de la formación de biopelícula en *V. cholerae*. VpsR se une directamente a la región promotora *vps* controlando la expresión de los genes *vps*, *eps* (extracellular protein secretion), proteínas de matriz,

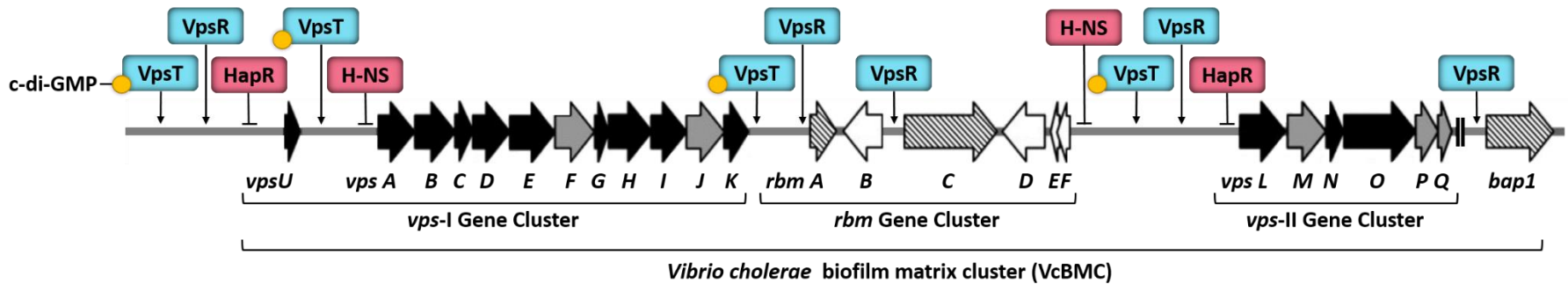


Figura 4. Organización genómica y regulación de los genes *vps* y de producción de proteínas de matriz de *V. cholerae*. Simbología: En azul, reguladores positivos; en rosa, reguladores negativos; flechas negras, genes involucrados en la biosíntesis de VPS; flechas grises, proteínas hipotéticas; flechas rayadas, proteínas de matriz; flechas blancas, genes encontrados en regiones intergénicas de *vps*. Modificado de Fong *et al.*, 2010; Teschler *et al.*, 2015).

así como *aphA* (principal regulador de virulencia), lo que indica que VpsR tiene un rol principal en la patogénesis de *V. cholerae*. El segundo mensajero c-di-GMP (Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate) se puede unir a VpsR sin alterar el sitio de unión de la proteína y el sensor histidina cinasa juegan el rol como activadores de VpsR y así regula positivamente la expresión de los genes *vps*. La expresión de VpsR es también regulada positivamente por VpsT, el segundo regulador positivo de la formación de la biopelícula. Para llevar a cabo la transcripción de los genes *vps*, VpsT necesita unirse a c-di-GMP para poder reconocer la región promotora, lograr su asociación al DNA y regular su transcripción (Yildiz, Dolganov and Schoolnik, 2001; Beyhan *et al.*, 2007; Fong *et al.*, 2010; Teschler, Zamorano-Sánchez, *et al.*, 2015).

1.1.3 Proteínas de matriz

La formación de la biopelícula y su integridad estructural es dependiente de la producción de los componentes de la matriz. Como se muestra en la Figura 4, entre los grupos *vps-I* y *vps-II* se encuentra un grupo compuesto de 6 genes llamado *rbm* (Rugosity and biofilm structure modulator) que codifican para las proteínas de la matriz. El conjunto de los grupos *vps-I*, *vps-II* y *rbm* conforman un módulo genético funcional llamado *V. cholerae* biofilm matrix cluster (VcBMC). En este módulo se codifican varias proteínas involucradas en la producción de VPS, así como las principales proteínas de la biopelícula, incluyendo RbmA, RbmC y Bap1 (Figura 5) (Fong *et al.*, 2010; Yildiz *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016).

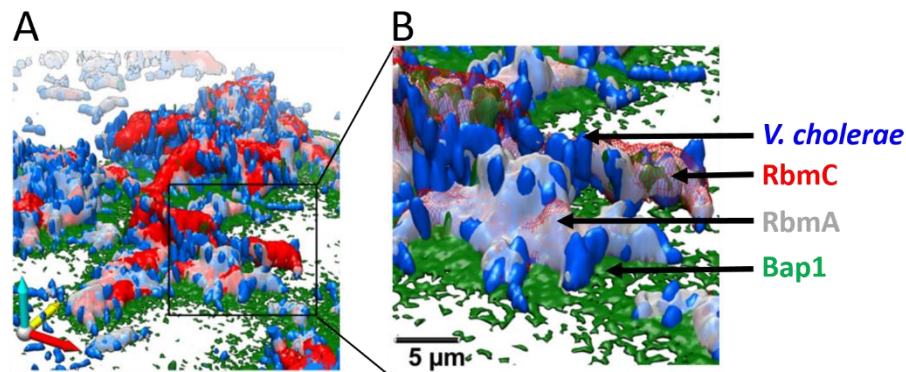


Figura 5. Arquitectura tridimensional de la biopelícula de *V. cholerae*. Modificado de Berk *et al.*, 2012.

RbmA es una proteína de matriz regulada por VpsT y VpsR (Figura 4) e involucrada en la adhesión intercelular durante la formación y desarrollo de la biopelícula madura. RbmA se distribuye en toda la biopelícula específicamente alrededor de las células bacterianas (Figura 4). RbmA es una proteína de matriz regulada por VpsT y VpsR (Figura 4) involucrada en la adhesión intercelular durante la formación y desarrollo de la biopelícula madura. RbmA se distribuye en toda la biopelícula y específicamente alrededor en las células bacterianas (Figura 4) (Berk *et al.*, 2012; Giglio *et al.*, 2013; Yildiz *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016). La retención de RbmA en la superficie celular es dependiente de la presencia de VPS. RbmA se une a la galactosa, un componente de los VPS, y la aparición de RbmA en la formación de la biopelícula es subsecuente a la excreción de VPS (Figura 3.B-a,b). Esto indica que la interacción entre VPS y RbmA es esencial para la distribución espacial de RbmA en la matriz de la biopelícula, lo que confirma que el principal rol de RbmA es mediar la unión entre células y a la superficie, sirviendo como andamio (Silva *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha reportado que la proteólisis del péptido C-terminal de RbmA no causa la disolución de la biopelícula ni la pérdida de su integridad; por el contrario, su proteólisis promueve la acumulación de la biopelícula y el reforzamiento de la matriz. Contrario a la proteína RbmA completa, la cual solo se asocia a las células que están produciendo VPS, la proteína procesada RbmA* se une a células que no se encuentran produciendo VPS, lo que resulta en un incremento de células recubiertas por RbmA* en la superficie de la biopelícula; esto promueve la formación de una nueva capa de células a partir de células planctónicas, las cuales, por medio de señalización iniciarán la formación de la matriz y continuarán con el ciclo de *V. cholerae* (Smith *et al.*, 2015). Por último, un estudio sobre la formación de biopelículas entre la fase aire-liquido (Figura 6) de un cultivo estático de *V. cholerae* (biopelícula superficial) mostró que RbmA es importante en los primeros estadios de formación de la biopelícula superficial, y que es responsable de su forma arrugada característica. Esta forma que presenta la biopelícula superficial es de importancia debido a que consolida una red de canales que incrementa el transporte de nutrientes, desechos y moléculas de señalización (Hollenbeck *et al.*, 2014).

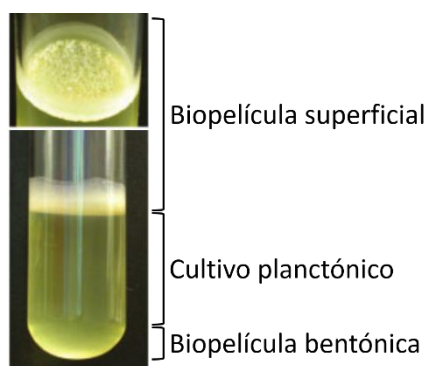


Figura 6. Composición de un cultivo estático de *Vibrio cholerae* O1 El Tor A1552 variante rugosa tras 48 h de incubación. Modificado de Fong *et al.*, 2010.

Bap1 y RbmC son proteínas de matriz con una homología en la secuencia peptídica del 47%. Sin embargo, como se muestra en la Figura 5, la distribución espacial de estas dos proteínas es notablemente diferente: Bap1 se encuentra concentrada en la interfase biopelícula-superficie mientras que RbmC se encuentra aleatoriamente a las células y en la biopelícula (Figura 3.B-c,d) (Berk *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2016). Bap1 y RbmC presentan uno y dos dominios lectina en forma de prisma β , respectivamente. Estos dominios se unen específicamente a galactosa, manosa, y/o glucosa y sus derivados, las cuales son moléculas que conforman a los VPS. La presencia de dominios de lectina en Bap1 y RbmC interviene en la formación de la biopelícula facilitando la adhesión y su unión a carbohidratos. Como se ha descrito previamente, Bap1 y RbmC se encuentran asociadas a las células y su retención a la superficie celular es mediada por la presencia de VPS; de manera específica para Bap1 se ha descrito que es independiente de la presencia de VPS cuando se encuentra de manera específica entre la superficie y la biopelícula (Silva *et al.*, 2016). Por lo tanto, Bap1 ayuda a la funcionalización y adhesión de la biopelícula a la superficie, mientras que en conjunto Bap1/RbmC recubren agregados de células y permiten el desarrollo y expansión de la biopelícula en todas las direcciones (Berk *et al.*, 2012). Por último, un estudio demostró la importancia de Bap1 en la formación de biopelícula superficial en *V. cholerae*. Debido a que el principal papel de Bap1 es la adhesión de las células a una superficie, se realizó el estudio de esta proteína en la biopelícula superficial (*i.e.*, cuando la biopelícula se encuentra suspendida en un medio líquido) (Hollenbeck *et al.*, 2014). Se demostró que Bap1 juega un papel importante en el mantenimiento de la resistencia mecánica de la biopelícula superficial, especialmente en estadios tardíos de ésta. Se demostró que la producción de Bap1 le confiere a la biopelícula elasticidad e hidrofobicidad, además de ser requerida para poder establecer la forma arrugada característica de esta biopelícula y con esto poder mantener la estabilidad e integridad de esta biopelícula de interfase aire-líquido (Hollenbeck *et al.*, 2014)

1.2 El papel de las proteínas de membrana externa en la patogénesis de *V.cholerae*

Cerca de 60 genes asociados a factores de virulencia son regulados por ToxR en *V. cholerae*. Este regulón se subclasifica en dos ramas. En una de las ramas, ToxR y el segundo activador, TcpP, son requeridos para la transcripción del gen *toxT* (Provenzano *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). El gen *toxT* regula la expresión de dos de los principales factores de virulencia expresados por *V. cholerae*, (i) la toxina del cólera (CT) responsable de la diarrea acuosa aguda característica del cólera, y (ii) la toxina correguladora del pili (TCP) la cual media la adherencia y la formación de microcolonias requerida para la colonización intestinal (Silva *et al.*, 2016). En la otra rama, independiente del segundo activador TcpP y ToxT, ToxR regula diferencialmente la transcripción de dos genes que codifican para las principales porinas de membrana externa (OMP) en *Vibrio cholerae*, OmpU (outer membrane protein U) y OmpT (outer membrane protein T) (Provenzano *et al.*, 2001). ToxR regula directa y positivamente la expresión de *ompU* y reprime la expresión de *ompT* (Figura 7). Por otro lado, la expresión de OmpT es controlada por la proteína receptora de AMP cíclico (CRP). CRP es un regulador global que activa la expresión de *ompT* en condiciones limitadas de carbono y fuentes de energía. Se ha reportado también que CRP reprime indirectamente la expresión de CT y TCP (Li *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004).

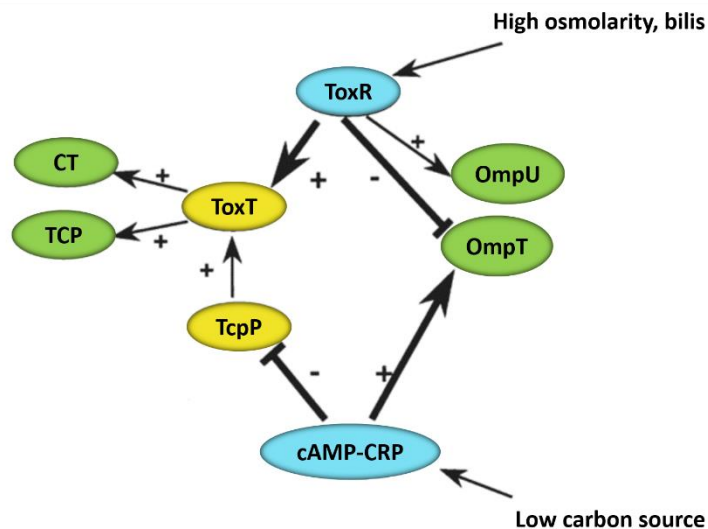


Figura 7. Expresión coordinada de CT, TCP, OmpU y OmpT (verde) por los reguladores ToxR y CRP (azul). Se muestran los reguladores intermedios ToxT y TcpP (amarillo). Simbología: +, activación de la transcripción; -, represión de la transcripción. Modificado de Li *et al.*, 2002.

Se ha descrito que el papel de las porinas de membrana externa en el género *Vibrio* es principalmente el transporte de hierro, fosfatos, azúcares, moléculas hidrofílicas y de bajo peso molecular, así como promover la adherencia de las células a superficies (Provenzano *et al.*, 2001; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). Se ha demostrado que OmpU y OmpT no son esenciales para la expresión de factores de virulencia en *V. cholerae* (Wibbenmeyer *et al.*, 2002). Sin embargo y de manera particular, se ha reportado que OmpU juega un papel en la virulencia de *V. cholerae* al excluir selectivamente los aniones tóxicos de la bilis. Por lo tanto, se concluye que el rol de OmpU es proteger a las células e incrementar su sobrevivencia en el intestino al incrementar la resistencia a la bilis y a detergentes aniónicos (Provenzano *et al.*, 2001; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). Contrario a OmpU, el incremento en la expresión de OmpT en *V. cholerae* reduce la expresión de CT y TCP, las células pierden la capacidad de colonizar el intestino, e se incrementa su susceptibilidad a detergentes aniónicos (Provenzano *et al.*, 2001; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). Sin embargo, *ompT* es regulado por la osmolaridad en el medio que se encuentre, y el incremento en su expresión es directamente proporcional al incremento en la concentración de sales en el medio. Por esta razón, se evaluaron los niveles de expresión de *ompU* y *ompT* en un medio rico (caldo de lisogenia) y en un medio mínimo (M9). En el medio rico *ompU* se expresa como se ha descrito anteriormente por ToxR, y este a su vez reprime la expresión de *ompT*. Por el contrario, en un medio mínimo la expresión de *ompT* se incrementa aún en presencia del represor ToxR (Provenzano *et al.*, 2001). Por lo tanto, el rol más importante de ToxR en la regulación de la expresión de las OMPs durante la colonización es la represión de *ompT* y por ende su efecto sobre la activación de la expresión de *ompU*.

La formación de biopelícula en *V. cholerae* es un proceso altamente controlado a nivel transcripcional. La estrecha relación entre la formación de biopelícula y la patogénesis y virulencia de *V. cholerae* ha sido ampliamente estudiada. Con particular interés, tratar de elucidar las posibles respuestas de *V. cholerae* ante los diferentes mecanismos de acción de los nanomateriales nos ayudaran a proponer mejores alternativas para su tratamiento y control.

1.3 Antecedentes

1.3.1 Mecanismos de acción de los nanomateriales

Poco se ha descrito sobre los mecanismos de acción de los nanomateriales antimicrobianos. Sin embargo, se han propuesto posibles mecanismos de acción antimicrobiana, los cuales se basan fundamentalmente en causar cambios morfológicos y estructurales, así como en resultar en alteraciones en el metabolismo o bien interacciones adversas con moléculas clave en el funcionamiento celular. Elucidar los mecanismos de acción de los nanomateriales antimicrobianos es complicado debido a que depende de diversos factores que van desde las características de los nanomateriales, como su composición, concentración, modificaciones superficiales, propiedades intrínsecas, y tamaño, hasta el sistema biológico en el que se evalúa, como las especies bacterianas, medios de cultivo, condiciones de crecimiento, abundancia, y tiempo de cultivo (Hajipour *et al.*, 2012; Lemire *et al.*, 2013). Por ejemplo, se ha descrito que la toxicidad de nanopartículas (NPs) de CuO depende de diversos factores abióticos como la temperatura, la aeración y el pH. Se evaluó el efecto de CuO-NPs en la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* y Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, la bacteria Gram negativa mostro se ser más susceptible que las Gram positivas. Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de las Ag-NPs es mayor que el de las Cu-NPs en *E. coli* y *S. aureus*, y las Cu-NPs presentan mayor toxicidad que las Zn-NPs en *E. coli*, *B. subtilis* y *S. Aureus* (Hajipour *et al.*, 2012). La toxicidad de algunos nanomateriales es dependiente de la concentración, como las ZEO-AgNPs y las ZnO-NPs, que son medianamente toxicas a bajas concentraciones (Hajipour *et al.*, 2012; Jaime-Acuña *et al.*, 2016). La Tabla 2 muestra diferencias en los efectos de diferentes nanomateriales sobre varios microorganismos.

Tabla 2. Ejemplos de materiales nanoestructurados y sus efectos tóxicos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Bacteria	Propiedad bacteriana	Composición de NPs	Dosis	Mecanismo de acción
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	Formación de biopelícula, flora normal de la piel, producción de matriz.	Ag cubierta de SPIONs	80 µg/ml	Toxicidad bacteriana por la penetración en la biopelícula e incremento de la toxicidad bacteriana en presencia de campos magnéticos externos, generación de ROS, interacciones electrostáticas y daño morfológico en la bacteria.
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G+)	Formación de biopelícula, flora normal de la piel, producción de matriz, resistente a gentamicina.	NO-releasing MAP3(N-methyl amino propyltrimethoxysilane) Si NPs	8 mg/ml	Inhibición total de la biopelícula por las propiedades electrostáticas de las NO-releasing NPs e incremento de la liberación de NO a las bacterias formadoras de la biopelícula.
Bacteria halofílica sp. EMB4 (G+)	No patogénica	ZnO	2 a 5 mM	Interacción electrostática, cambios morfológicos en presencia de ZnO-NPs, incremento en la permeabilidad y acumulación de ZnO en el citoplasma.
		Ag	2 a 5 mM	No afecta el crecimiento ni la pared celular.
		ZnO	10 mM	Reducción mínima en la tasa de crecimiento y número de células viables.
<i>Bacillus subtilis</i> (G+)	No patogénica, formadora de esporas	Ag	ND	La liberación de Ag ¹⁺ y Cu ²⁺ , interacciones electrostáticas, daño en pared celular, ruptura de la membrana plasmática y la modificación de procesos bioquímicos.
		CuO	ND	
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (G+)	No patogénica	Cu-doped TiO2	20 mg/l	Liberación de Cu ²⁺ , decremento de la actividad enzimática, producción de NADPH, no daño celular, no hay internalización de NPs.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (G-)	Patógeno de importancia clínica, fijador de nitrógeno, resistencia a betalactámicos, productor de capsula.	Ag	30 mg/l	Interacciones electrostáticas, adsorción, penetración de las NPs y toxicidad

<i>Pseudomona aeruginosa</i> (G-)	Patógeno oportunista, flora normal de la piel y el intestino, formador de biopelícula.	Ag	25-100 mg/l	Alteración en la permeabilidad, respiración y división celular; interacción con la membrana celular y con compuestos que contengan sulfuro fosforo.
		ZnO	1-425 mM	Unión a las bacterias por interacciones electrostáticas, generación de ROS, alteración de la membrana y permeabilidad.
		Biogenic Ag	30 µg/ml	Penetración de las NPs, inhibe el desplegamiento del DNA.
<i>Escherichia coli</i>		ZnO	20 mg/l	
		Zero valent CuNPs		Liberación de iones de Cu y generación de radicales hidroxilo en citoplasma.
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium (G-)		Ag	25-100 mg/l	Alteración de la permeabilidad, respiración y división celular; interacción con la membrana celular, con compuestos que contengan sulfuro fosforo.
		ZnO	8 y 80 ng/ml	Internalización de ZnO, generación de ROS, no presenta toxicidad significativa. Mutaciones de desplazamiento de marco de lectura en presencia de la activación metabólica del sistema S9.
Bacteria formadora de biopelícula en aguas residuales (G-)	Formadora de biopelícula	Ag	1-200 mg/l	Alta tolerancia a las NPs debido a la presencia de exopolisacáridos.
<i>Pseudomona putida</i> (G-)	No patógena, resistente en presencia de diversas formas de metales pesados	Ag	1 mg/l	
		CuO	10 mg/l	Daño en membrana celular y efecto bactericida
		ZnO	10 mg/l	Efecto bacteriostático.

Abreviaciones: G+, Gram-positiva; G-, Gram-negativa; NPs, nanopartículas; SPIONs, superparamagnetic iron oxide NPs.

Se ha descrito que la nanotoxicidad está generalmente asociada a la inducción de estrés oxidativo por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos de los nanomateriales que han presentado este mecanismo son las ZnO-NPs, Ag-NPs, CuNPs, NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs), entre otras. Se reporta que la producción de ROS interfiere con la formación de biopelícula de *E. coli* y *S. aureus*. Por otra parte, se sabe que las NPs son capaces de unirse por interacciones electrostáticas a la membrana bacteriana, causando alteraciones y daños en la integridad de la membrana, así como incrementando su permeabilidad. El estado de oxidación cero y la iónica de algunos metales producen radicales hidroxilo que causan daño en proteínas esenciales y el DNA. De manera particular se ha descrito que las ZnO-NPs causan daño en la maquinaria de síntesis de proteínas, que las NO-NPs causan la modificación de proteínas esenciales en bacterias y que los iones de Ag se unen al sulfuro, oxígeno y nitrógeno de moléculas biológicas esenciales e inhiben el crecimiento bacteriano (Figura 8) (Lemire *et al.*, 2013; Jamil *et al.*, 2017).

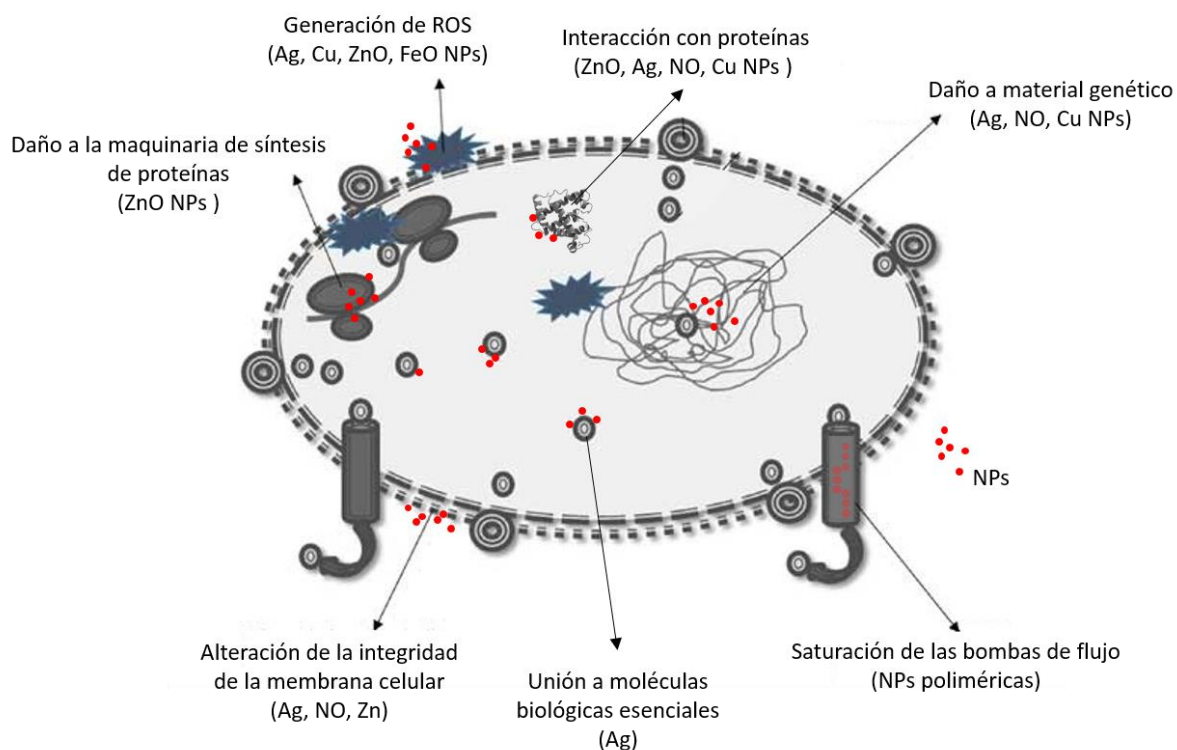


Figura 8. Posibles mecanismos de acción de nanomateriales antimicrobianos en bacterias. Modificado de Bushra Jamil *et al.*, 2017.

1.3.2 Efecto de nanomateriales en *Vibrio*

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, la evaluación de nanomateriales con potencial de capacidad antimicrobiana ha sido bien documentada para el género *Vibrio* (Tabla 3). *V. cholerae*, y otras especies del género como *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fischeri*, *V. harveyi* y *V. alginolyticus* han mostrado ser susceptibles al efecto de diversos nanomateriales, como las nanopartículas de plata, óxido de cobre, óxido de zinc, boro, dióxido de titanio y nanocompuestos de zeolitas dopadas de iones-plata (Heinlaan *et al.*, 2008; Mortimer *et al.*, 2008; Strigul *et al.*, 2009; Vaseeharan *et al.*, 2010; Krishnaraj *et al.*, 2010; Krishnani *et al.*, 2012; Rossetto *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2015; Shameli *et al.*, 2015; Davoodbasha *et al.*, 2016; Gahlawat *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2016).

Tabla 3. Reportes de la evaluación de nanomateriales en el género *Vibrio*.

Espece	Nanomaterial	F-V	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC	Ref.
<i>V. cholerae</i>	ZnO-NPs	P-B	SP(*)	ND	(Salem <i>et al.</i> , 2015)
	ZnO -NPs	P-B	SP(*)	ND	(Sarwar <i>et al.</i> , 2016)
	Ag-NPs	P-B	SP(*)	ND	(Salem <i>et al.</i> , 2015)
	Ag-NPs	P-B	SP(*)	ND	(Sarwar <i>et al.</i> , 2016)
	GAL-Ag-NPs	P	SP(*)	SP(*)	(Gahlawat <i>et al.</i> , 2016)
	AgNPs	P	10	ND	(Krishnaraj <i>et al.</i> , 2010)
<i>V. parahaemolyticus</i>	silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	P	50	ND	(Krishnani <i>et al.</i> , 2012)
	AgNPs en una Matriz biopolimérica de quitosano	P	9	ND	(Davoodbasha, Kim, Lee, & Kim, 2016)
	Silver/poly nanocomposito (Ag/PLA-NC)	P	32	ND	(Shameli <i>et al.</i> , 2010)
	Silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	P	50	ND	(Krishnani <i>et al.</i> , 2012)
<i>V. harveyi</i>	AgNPs	P	5	20	(Baskaralingam Vaseeharan, Ramasamy, & Chen, 2010)
	silver ion-exchanged zeolite (ZEO- Ag ⁺)	P	40	ND	(Krishnani <i>et al.</i> , 2012)
<i>V. alginolyticus</i>	AgNPs	P	ND	20	(Baskaralingam, Sargunar, Lin, & Chen, 2012)
<i>V. vulnificus</i>	AgNPs en una Matrix biopolimerica de quitosano	P	< 9	ND	(Davoodbasha <i>et al.</i> , 2016)
<i>V. fischeri</i>	CuO-NPs	P	2000	ND	(Rossetto, Melegari, Ouriques, & Matias, 2014)
	Dendrímeros de CuO en polietilenimina y poliamidoamina	B	100	ND	(Mortimer, Kasemets, Heinlaan, Kurvet, & Kahru, 2008)
	CuO-NPs	B	200	ND	(Heinlaan, Ivask, Blinova, Dubourguier, & Kahru, 2008)
	Dendrímeros de ZnO en polietilenimina y poliamidoamina	B	4	ND	(Mortimer <i>et al.</i> , 2008)
	ZnO-NPs	B	100	ND	(Heinlaan <i>et al.</i> , 2008)
	TiO ₂ -NPs	B	NP	ND	(Heinlaan <i>et al.</i> , 2008)
	TiO ₂ -NPs	B	NP	ND	(Strigul <i>et al.</i> , 2009)
B-NPs	B	1200	ND	(Strigul <i>et al.</i> , 2009)	
Al- NPs	B	NP	ND	(Strigul <i>et al.</i> , 2009)	

Abreviaciones: F-V, forma de vida; P, células planctónicas; B, biopelícula; MIC, concentración mínima inhibitoria; MBC, concentración mínima bactericida; NPs, nanopartículas; SP, si presenta actividad antimicrobiana; (*), determinado en NP/ml; ND, no determinado; NP, no presenta actividad antimicrobiana.

Se ha reportado que nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NPs) y nanopartículas de plata (Ag-NPs) presentan efecto antibacteriano en *V. cholerae*; dicho efecto es dependiente de la forma de vida (planctónica o biopelícula), del biotipo y la concentración del nanocompuesto (Salem *et al.*, 2015; Gahlawat *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2016). Las ZnO-NPs presentan un efecto antibacteriano superior que el mostrado para Ag-NPs en cultivos planctónicos. Sin embargo, las Ag-NPs inhiben la formación de las biopelículas bentónicas y ZnO-NPs incrementa la abundancia relativa de la biopelícula. El efecto de ZnO-NPs es dependiente del biotipo, y se ha reportado que el biotipo El Tor es más susceptible que el biotipo clásico en ambas formas de vida (Salem *et al.*, 2015; Sarwar *et al.*, 2016). También se ha reportado que las ZnO-NPs y Ag-NPs alteran la forma y tamaño de las células, y que las ZnO-NPs provocan un incremento en la fluidez de la membrana celular, un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno y que causan daño en el DNA (Gahlawat *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2016).

1.4 Justificación

La formación de biopelícula por *Vibrio cholerae* incrementa su capacidad de colonizar el intestino humano, su sobrevivencia en ecosistemas acuáticos y su resistencia a tratamientos antimicrobianos convencionales. Es de nuestro interés evaluar el efecto de los nanomateriales antimicrobianos en la expresión de genes relacionados con la formación de biopelículas y factores de virulencia en *V. cholerae*. Dicho conocimiento permitirá avanzar hacia la propuesta de utilizar nanomateriales antimicrobianos como una alternativa para evitar la formación de la biopelícula y reducir su patogenicidad.

1.5 Hipótesis

Las nanopartículas de plata, cobre y zinc embebidas en zeolitas ejercerán un efecto antibacteriano, modificarán la morfología celular y la expresión de genes asociados a la formación de biopelícula y factores de virulencia en *Vibrio cholerae*.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas de plata, cobre y zinc embebidas en zeolitas sobre la sobrevivencia y expresión de factores de virulencia asociados a la formación de biopelícula en *Vibrio cholerae* O1 El Tor variante rugosa en función de su concentración.

1.6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los nanocompuestos zeolita/nanopartículas metálicas ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis químico por medio de espectroscopía de plasma ICP-OES para confirmar la presencia de nanopartículas metálicas embebidas en los cristales de zeolitas y su concentración.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) e inhibitoria (CMI) de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en cultivos planctónicos, en la formación de biopelícula superficial y bentónica en *V. cholerae* O1 El Tor variante rugosa.
- Realizar el análisis ultraestructural por microscopía electrónica de barrido (SEM) de *V. cholerae* O1 El Tor variante rugosa en cultivos planctónicos, biopelículas superficial y bentónica tratados con concentraciones inhibitorias subletales de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.
- Cuantificar los niveles de expresión de los genes *vpsL*, *vpsR*, *rbmA*, *bap1*, *ompU* y *ompT* de *V. cholerae* O1 El Tor variante rugosa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Real-Time RT-qPCR) tras su tratamiento con concentraciones inhibitorias subletales de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Caracterización de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs

Los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs se sintetizaron a partir de la metodología descrita en la patente MX/a/2012/0113218 y se caracterizaron de acuerdo a Jaime-Acuña O.E. y colaboradores (2016). Brevemente, 110 ml de una mezcla de soluciones acuosas 0.1 M de silicato de sodio y sulfato de aluminio (con $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ radio molar de 15) se agita por 30 min, posteriormente se agregan 30 ml de una solución 0.1 M de nitrato de plata (AgNO_3) para ZEO-AgNPs, nitrato de Cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) para ZEO-CuNPs y nitrato de Zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) para ZEO-ZnNPs. La solución final es tratada en autoclave a 155°C por 48 h. Finalmente la mezcla se lava con $\text{H}_2\text{O.d.d.}$, se filtra y seca a 60°C .

Los nanocompuestos obtenidos se analizaron física y químicamente. La composición química y morfológica fue estudiada por medio de microscopía electrónica de barrido SEM (microscopio JEOL JSM-5300 con detector para análisis químico por medio de espectroscopía de dispersión de energía EDS y FEI Quanta 3D FEG) y microscopía electrónica de transmisión TEM (microscopio JEOL 2100F con detector para análisis químico por medio de espectroscopía de dispersión de energía EDS). Se determinó el porcentaje de plata, cobre y zinc soportado en la matriz de zeolita por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

2.2. Evaluación del efecto antimicrobiano de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs

2.2.1. Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa *V. cholerae* O1 biotipo El Tor A1552 variante rugosa y resistente a rifampicina utilizada en esta investigación fue donada por cepario de la Dra. Fitnat Yildiz del departamento de Microbiología y Toxicología Ambiental de la Universidad de California Santa Cruz.

Para todos los ensayos experimentales, las cepas fueron estriadas de glicerol 25% en placas de agar Lysogeny broth (LBA), adicionadas con 1 mg/L del antibiótico rifampicina (LBA-Rif) e incubadas durante la noche a 30°C. Para el precultivo, cinco colonias aisladas se inocularon en 5 ml de medio LB y se incubaron en ángulo por 15 h a 30°C, 200 rpm. Posteriormente, el precultivo se homogenizó por 30 segundos (OMNI International TH® Homogenizer). A partir de este se ajustó el inóculo inicial para los tratamientos a 1×10^4 CFU/ml, y se hicieron 8 diluciones seriadas 1:10 en LB (100 µl de cultivo en 900 µl de LB). Cada dilución seriada se mezcló 30 segundos con 3 perlas de vidrio (3mm) en vortex a máxima velocidad. Se estimó que la dilución 10^{-5} contenía un aproximado 1×10^4 CFU/ml y se confirmó por conteo en placa. Los cultivos fueron expuestos a los tratamientos de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs correspondientes a los parámetros y condiciones a evaluar. Se realizaron 2 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas para cada tratamiento. Los datos fueron analizados por una ANOVA de una vía ($p = 0.5$) seguido de un análisis *post hoc* por el método de comparaciones con el control de Dunnett's y Dunn's. Las diferencias se consideraron poco significativas para $p \leq 0.05$ - > 0.01 , significativas $p \leq 0.01$ - > 0.001 , o muy significativa $p \leq 0.001$. Los análisis estadísticos se realizaron con SigmaPlot versión 13.

2.2.2. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) e inhibitoria (CMI) de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en cultivos planctónicos y en formación de biopelícula en *V. cholerae*.

El potencial antimicrobiano de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs se evaluó en el patógeno humano *V. cholerae* O1 biotipo El Tor variante rugosa. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMB es la mínima cantidad de un agente antimicrobiano capaz de eliminar el 99.9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas (Murray, Rosenthal and Pfaller, 2017), mientras que la CMI es la mínima cantidad de un agente microbicida capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en comparación con el crecimiento del control (Slonczewski *et al.*, 2009).

Para determinar la CMB y la CMI de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en *V. cholerae* una concentración de inóculo inicial de 1×10^4 CFU/ml fue expuesta a los nanocompuestos. Se determinaron las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16 y 24 µg/ml de plata del nanocompuesto ZEO-AgNPs con base en el reporte previo de Jaime-Acuña O.E. y colaboradores (2016).

Los tratamientos de ZEO-AgNPs se realizaron a partir de una solución stock con una concentración de 500 µg de Ag/ml, para la cual se pesaron 33.3 mg de ZEO-AgNPs, se suspendieron en 1 ml de LB y se homogenizaron por vortex a máxima velocidad. A partir de esta solución stock se calcularon y prepararon las siguientes concentraciones de los tratamientos de ZEO-AgNPs: 2, 4, 8, 16, 32 y 48 µg/ml, soluciones al doble de la concentración final a evaluar (i.e., concentración 2X para una concentración final 1X). Un volumen de 500 µl de cada solución se colocaron por separado en placas de poliestireno de 24 pozos de fondo plano y posteriormente se inocularon con 500 µl del cultivo a 1×10^4 CFU/ml, las concentraciones finales de cada pozo fueron 1, 2, 4, 8, 16 y 24 µg de ZEO-AgNPs/ml. Los tratamientos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs se prepararon a partir de una solución stock a una concentración de 900 µg de cobre y zinc por mililitro a partir de 55.2 mg de ZEO-CuNPs y 68.7 mg de ZEO-ZnNPs suspendidas en 1 ml de LB. De las soluciones stock se prepararon las siguientes concentraciones: 320, 640 y 840 µg/ml, soluciones al doble de la concentración (2X) final a evaluar. Un volumen de 500 µl de cada solución se colocaron por separado en placas de 24 pozos y posteriormente se inocularon con 500 µl del cultivo a 1×10^4 CFU/ml; finalmente cada pozo tenía una concentración final de 160, 320 y 420 µg de ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs por mililitro. Se consideraron como controles el cultivo de la cepa a 1×10^4 CFU/ml con 33.8 mg/ml de zeolita sin NPs metálicas, siendo esta la concentración equivalente de zeolita en los tratamientos a 420 µg/ml y se verificó el crecimiento óptimo de la bacteria con el cultivo de la cepa *V. cholerae* solo en medio de cultivo LB sin nanocompuestos. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 30°C en estático.

Posteriormente, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (CFU) en todos los tratamientos en cultivos planctónicos y en los de formación de biopelícula. Este último fue sub-clasificado en dos tipos debido a sus formas de crecimiento: se denominó biopelícula bentónica al agregado que se forma en el fondo del pozo, y biopelícula superficial o pellicle al agregado que se forma en la superficie del pozo entre el cultivo planctónico y la columna de aire.

Se tomó por separado cada una de las fases y se colocaron en tubos independientes. Las biopelículas superficiales y bentónicas fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de fosfato 1X (PBS 1X) y se recuperó un mililitro de cultivo planctónico en un tubo independiente. Cada una de las fases de los cultivos se homogenizó por 30 segundos (OMNI International TH® Homogenizer) y posteriormente se realizaron 8 diluciones seriadas 1:10; cada dilución seriada se mezcló 30 segundos con 3 perlas de vidrio (3mm) en vortex a máxima velocidad. Un volumen de 100 µl de las diluciones de 10^0 a la 10^{-8} fueron inoculados en placas LBA-Rif (las diluciones para plaqueo fueron seleccionadas de acuerdo a los tratamientos) e incubadas durante toda la noche a 30°C. Posteriormente, se contó el número de colonias en las placas de LBA-Rif para todos los tratamientos y se estimó el número de CFU/ml con la fórmula 1.

$$\text{CFU / ml} = \frac{n \times \left(\frac{1}{\text{Factor de dilución}} \right)}{\text{Volumen de la muestra (ml)}} \quad (1)$$

Fórmula 1. Estimación del número de unidades formadoras de colonia por mililitro (CFU/ml), en donde n es el promedio del número de colonias contadas por placa.

2.3. Análisis ultraestructural del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en *V. cholerae*.

El análisis ultraestructural nos permite la visualización y el estudio de la arquitectura celular a magnificaciones mayores y con una mejor resolución que la microscopia óptica. Se analizó por microscopia electrónica de barrido (SEM) el efecto de 1 y 2 µg/ml ZEO-AgNPs y 160 y 420 µg/ml ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs sobre células planctónicas y sobre la formación de biopelícula en *V. cholerae*. Los tratamientos se realizaron siguiendo el protocolo previamente descrito en la sección 2.2.2 con modificaciones. Brevemente, una vez ajustado el inóculo inicial a 1 x10⁴ CFU/ml y preparadas las soluciones con las concentraciones de los tratamientos al doble, siendo para ZEO-AgNPs 2 y 4 µg/ml y para ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs 320 y 840 µg/ml, 500 µl de cada solución de los tratamientos y controles se colocaron en placas de 24 pozos sobre un cubre objetos redondo (12mm) estéril y se inocularon con 500 µl del cultivo ajustado a 1 x10⁴ CFU/ml. Los tratamientos se incubaron 48 horas a 30°C en estático.

Las muestras de cultivo planctónico y biopelícula superior y bentónica de todos los tratamientos y controles fueron fijadas en glutaraldehído con una concentración final del 2.5%. Con extremo cuidado se tomó la biopelícula superior con un cubre objetos redondo (12mm) evitando su perturbación, se secó por 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se cubrieron con una solución de glutaraldehído al 2.5% y se fijaron por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez eliminada la biopelícula superior se tomaron 900 µl del cultivo planctónico sin perturbar la biopelícula y se depositaron en un tubo cónico estéril al cual se agregaron 100 µl de glutaraldehído al 25%; se eliminó todo el cultivo planctónico restante en el pozo. Se fijó por 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente 20 µl del cultivo ya fijado se depositó en un cubre objetos redondo y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Por último, se tomó el cubre objetos del fondo del pozo, se dejó secar por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se cubrió

con una solución de glutaraldehído al 2.5%; se fijó por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez que las muestras se fijaron se prosiguió con la deshidratación seriada en etanol 10%, 25%, 50%, 75%, 90% y 100%. Las muestras estuvieron 5 min en cada una de las concentraciones y finalmente fueron preservadas en etanol al 100%. Para poder ser visualizadas por SEM las muestras fueron deshidratadas en un desecador de punto crítico y cubiertas con una capa de oro. Las observaciones se realizaron en el microscopio electrónico de barrido Quanta 3D FEG DualBeam en el laboratorio de Nano - And Microscale Fabrication and Characterization de la escuela de Ingeniería Jack Baskin en la Universidad de California Santa Cruz por el Dr. Tom Yuzvinsky.

2.4. Análisis del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs sobre la expresión de genes *vpsL*, *vpsR*, *rbmA*, *bap1*, *ompU* y *ompT* involucrados en la formación de biopelícula en *V. cholerae*

El análisis de la expresión génica permite conocer y cuantificar la expresión de genes de interés en un organismo mediante la medición de RNA mensajero y crear perfiles de expresión bajo determinadas condiciones, para determinar qué genes están siendo inducidos o reprimidos con respecto a un control. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-qPCR) se cuantificaron los niveles de expresión de los genes *vpsL* y *vpsR* involucrados en la producción de *Vibrio* polisacáridos; de *rbmA* y *bap1* como proteínas asociadas a la consolidación de la matriz de la biopelícula; y de *ompU* y *ompT* que codifican para porinas involucradas en la patogénesis de *V. cholerae*. Los tratamientos se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2.2.2 con 1 µg/ml de ZEO-AgNPs y 420 µg/ml ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. Luego de 48 horas de incubación se prosiguió con el protocolo de extracción, purificación y cuantificación de RNA descrito a continuación.

2.4.1. Extracción, purificación y cuantificación de RNA asociado a la formación de biopelícula de *V. cholerae* post tratamiento

Se siguió el protocolo de extracción de RNA total por medio de TRIzol® Reagent de la marca Invitrogen de Thermo Fisher Scientific. Brevemente, para la preparación de las muestras se resuspendieron 6

biopelículas superficiales de cada tratamiento en 1 ml de TRIzol®, se homogenizaron por pipeteo arriba-abajo y se conservaron en hielo. El cultivo planctónico se descartó debido a que el interés de este objetivo es analizar los cambios en los niveles de expresión en las biopelículas de *V. cholerae*. Por último, con un 1ml de TRIzol® se resuspendieron por pipeteo las biopelículas de 6 pozos para cada tratamiento, se homogenizaron por pipeteo arriba-abajo y se conservaron en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 10 min a 4°C, y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Para la fase de separación las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de TRIzol® y se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 15 minutos a 4°C, se tomó el sobrenadante acuoso y se transfirió a un tubo nuevo. Para la precipitación de RNA se agregaron 250 µl de isopropanol 100 % y 250 µl de buffer salino (235 mg de citrato de sodio y 70.1 mg de cloruro de sodio por 1 ml de agua libre de RNasas), se incubó por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12 000 x g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se conservó la pastilla de RNA. Para el lavado del RNA se agregó 1 ml de etanol 75 % y se agitó brevemente por vortex. Las muestras se centrifugaron a 7500 x g por 5 minutos a 4°C; posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente por 30 minutos. El RNA se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNasas y se incubó a 60 °C por 15 min. El RNA extraído se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000c de Thermo Scientific.

Para la purificación del RNA se siguió el protocolo descrito en el kit TURBO DNA-free™ TURBO™ DNase Treatment de la marca Invitrogen de Thermo Fisher Scientific. Las extracciones se ajustaron a una concentración de 3 µg/ml en 50 µl de agua libre de RNasas. Se agregaron 5 µl del buffer 10X TURBO DNase más 1 µl de TURBO DNase y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se agregó de nuevo 1 µl de TURBO DNase y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 10 µl de DNase Inactivation Reagent y se mezcló bien, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugo a 10 000 x g por 1.5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se continuó con el protocolo del kit RNeasy® MinElute® de QIAGEN. Brevemente, se ajustaron los volúmenes de las muestras a 100 µl en agua libre de RNasas, se agregaron 350 µl del buffer RLT y se mezcló bien, se agregaron 250 µl de etanol 100% y la mezcla se transfirió a una columna de centrifugación y se centrifugó por 15 minutos a 8 000 x g. Se agregaron 500 µl del buffer RPE y se centrifugó por 15 minutos a 8000 x g. Posteriormente, se agregaron 500 µl de etanol 80 % para lavar la columna y se centrifugó a 8000 x g por 2 minutos. Finalmente, se colocó la columna en un tubo cónico nuevo y se agregaron 14 µl de agua libre de RNasas y se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. El RNA purificado se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000c de Thermo Scientific.

2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real: Síntesis de cDNA y cuantificación por tiempo real RT-qPCR

Para la generación de cDNA se siguió la metodología descrita en el protocolo del kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-qPCR de la marca Invitrogen por Thermo Fisher Scientific. Brevemente, se ajustaron los tratamientos a una concentración de 96 ng/ml en 8 µl como volumen final. Se mezclaron 8 µl del RNA, 1 µl de hexámeros aleatorios y 1 µl de dNTP. Las muestras se incubaron a 65 °C por 5 minutos, y luego se conservaron en hielo al menos 1 minuto. Se preparó la solución cDNA Synthesis mix y se agregaron 10 µl a cada una de las muestras. En un termociclador modelo MyClicler™ marca BIO-RAD se incubaron las muestras 10 minutos a 25°C, 50 minutos 50°C y 5 minutos 85°C. Se conservaron en hielo y las muestras se colectaron por centrifugación. Se agregó 1 µl de RNase H a cada muestra y se incubó por 20 minutos a 37 °C.

Una vez sintetizado el cDNA se prosiguió a evaluar los niveles de expresión relativa de los genes de interés por medio de Tiempo Real RT-qPCR. Se siguió el protocolo descrito para el reactivo SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de la marca BIO-RAD como marcador intercalante para cuantificar el amplicón. Brevemente, 1 µl de cada una de las síntesis de cDNA se mezcló con 5 µl de SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix (2x), 1µl del oligo sentido y 1µl del oligo antisentido (5 µM) mas 2 µl de agua libre de RNasas. Las muestras fueron colocadas por triplicado en placas para qPCR de 96 pozos, se realizó la corrida de PCR bajo las condiciones de reacción establecidas para cada par de oligo a evaluar. Se confirmó la pureza de las extracciones de RNA transformadas en cDNA por medio Tiempo Real RT-qPCR y previamente se determinaron las condiciones óptimas de amplificación para todos los oligos (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes de interés y su eficiencia de amplificación.

Gen	Oligonucleótido		E.A	R ²
	Sentido	Antisentido		
<i>vpsR</i>	5'-CTCTTGTGTGGTGGGAGGT-3'	5'-GGCCCAGTCTCGACAAATAA -3'	95.5	0.968
<i>vpsL</i>	5'-CCTTGCTAGGGGTGCTTTTT-3'	5'-TAGGGTCAAGCTAGCGATGG-3'	89.9	0.9985
<i>rbmA</i>	5'-TGGCAAGTAACGGTGGATAC-3'	5'-GCTTTGGCTGGGAAGTAGAT-3'	91.1	0.9992
<i>bap1</i>	5'-GGCGAGTCAACAACCTATCT -3'	5'-CCAGTCGGTGTAGCCATAAA-3'	88.1	0.9996
<i>ompU</i>	5'-CAACCAAAGCGGTGACAAAG-3'	5'-AGAGTTGTCTTGTGCCTTACC-3'	95.0	0.9926
<i>ompT</i>	5'-GCTCTGTAAACGCAGCTGAA-3'	5'-AGAACCAGAACCAATTGTTGGA-3'	95.8	0.9939
<i>dnaE</i>	5'-CCCGGTTACTCAGTTCGATAAG-3'	5'-AGCCCAGTCAATAATGGTAAGG -3'	90.7	0.9976

Abreviaturas: E.A, eficiencia de amplificación.

El análisis de los datos se realizó de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de cuantificación comparativa descrita en el manual de PCR en tiempo real (Lifetechnologies, 2012). Se calcula el valor ΔCt de la muestra y el del gen calibrador a partir del valor C_t (*cycle threshold*) del gen de interés (GOI) y del gen normalizador de la muestra tratada (S) (Formula 2-2); del mismo modo se calcula para el gen calibrador (C) (Formula 2-3). $\Delta\Delta Ct$ se calcula de la resta de ΔCt de la muestra menos el ΔCt del gen calibrador (Formula 2-4). Por último, la diferencia en la expresión relativa de los genes se estima con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*Fold difference*) (Formula 2-5).

$$\Delta C_t \text{ sample} = C_t \text{ GOI}^S - C_t \text{ norm}^S \quad (2)$$

$$\Delta C_t \text{ calibrator} = C_t \text{ GOI}^C - C_t \text{ norm}^C \quad (3)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ sample} - \Delta C_t \text{ calibrator} \quad (4)$$

$$\text{Fold difference} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (5)$$

Fórmula 2. Estimación de la expresión relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs

Imágenes representativas del análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs son ilustradas en la Figura 9 y 10. El análisis por SEM mostró que los polvos de los nanocompuestos presentan una forma esferoidal con un promedio aproximado de 40 μm de diámetro (Figura 9 - A, C, E). Cada grano está formado por el empaquetamiento de cristales en forma de aguja (Figura 9 - B, D, F), el cual es característico de los cristales de zeolita del tipo mordenita de bajo radio Si/Al (Jaime-Acuña *et al.*, 2016). El análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) mostró que la composición de los nanocompuestos corresponde a la esperada conforme al método de síntesis (Anexo 1) (Jaime-Acuña *et al.*, 2016). Las observaciones realizadas por microscopía electrónica de transmisión muestran nanopartículas metálicas (zonas oscuras) de plata (Figura 10 – A, B), cobre (Figura 3.2 – C, D) y zinc (Figura 10 – E, F) formadas homogéneamente y dispersas en la superficie de matriz de zeolita, como se ha reportado previamente (Jaime-Acuña *et al.*, 2016). Se estima que la distribución de tamaños de las nanopartículas es de 1 a 10 nm. El análisis químico de la composición global de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) se muestra en la Tabla 5. Los valores atómicos porcentuales del silicio y el aluminio, y el radio Si/Al están en el rango correspondiente con otros reportes de síntesis de zeolita. Se presenta el valor porcentual del metal presente en cada síntesis, ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. En conjunto estos resultados confirman que las síntesis de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs corresponde a lo esperado por la síntesis descrita en la patente MX/a/2012/0113218.

Tabla 5. Análisis químico de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs por ICP-AES.

Nanomaterial	Composición en nivel atómico (%)				Ref.
	Si	Al	Metal	Si/Al	
ZEO-AgNPs	28.1	4.3	1.5	6.5	Jaime-Acuña <i>et al.</i> , 2016
ZEO-CuNPs	33.43	2.48	1.63	13.45	Este trabajo
ZEO-ZnNPs	30.73	2.46	1.31	12.44	Este trabajo

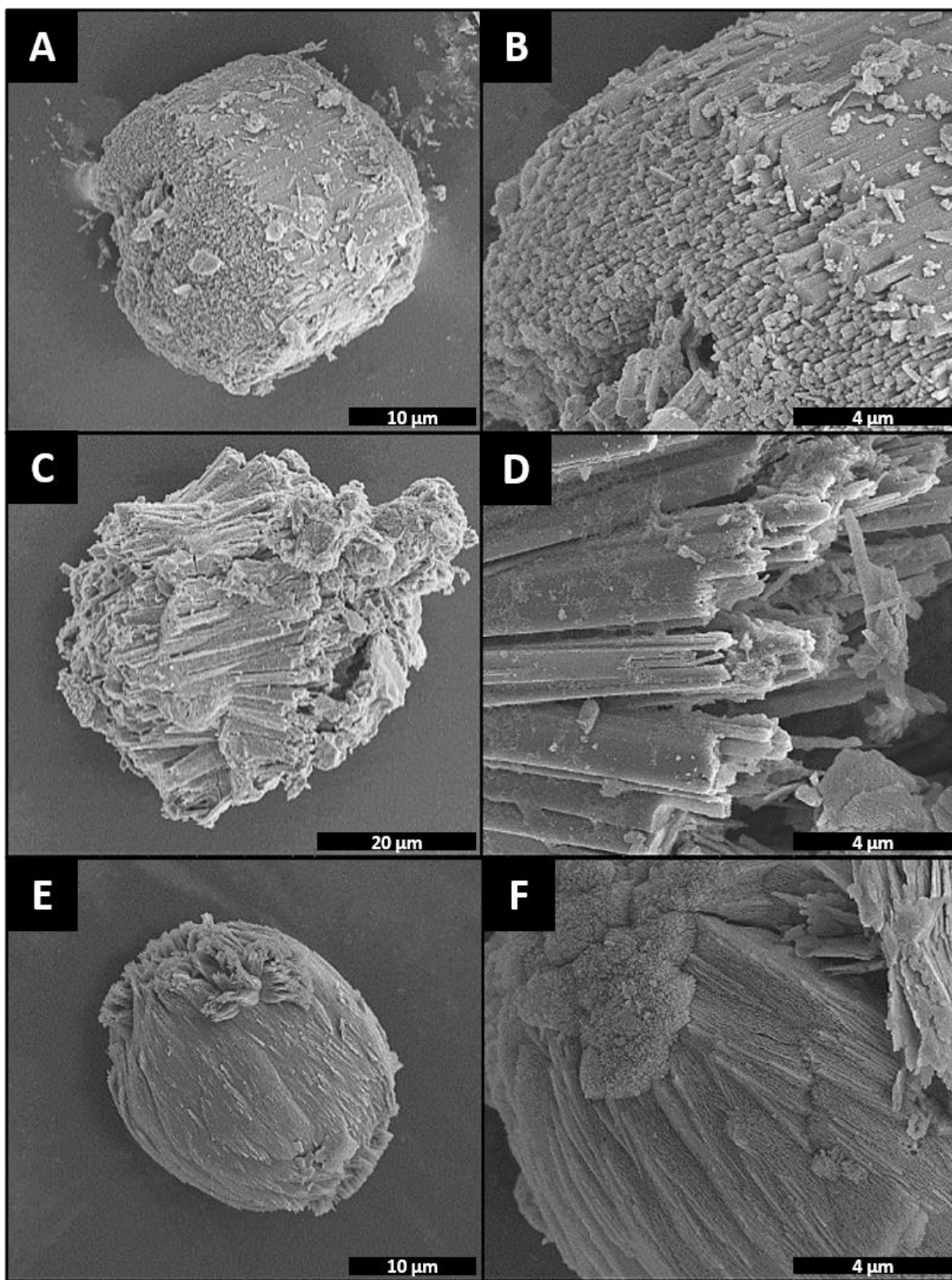


Figura 9. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los nanocompuesto ZEO-AgNPs (A, B), ZEO-CuNPs (C, D) y ZEO-ZnNPs (E, F).

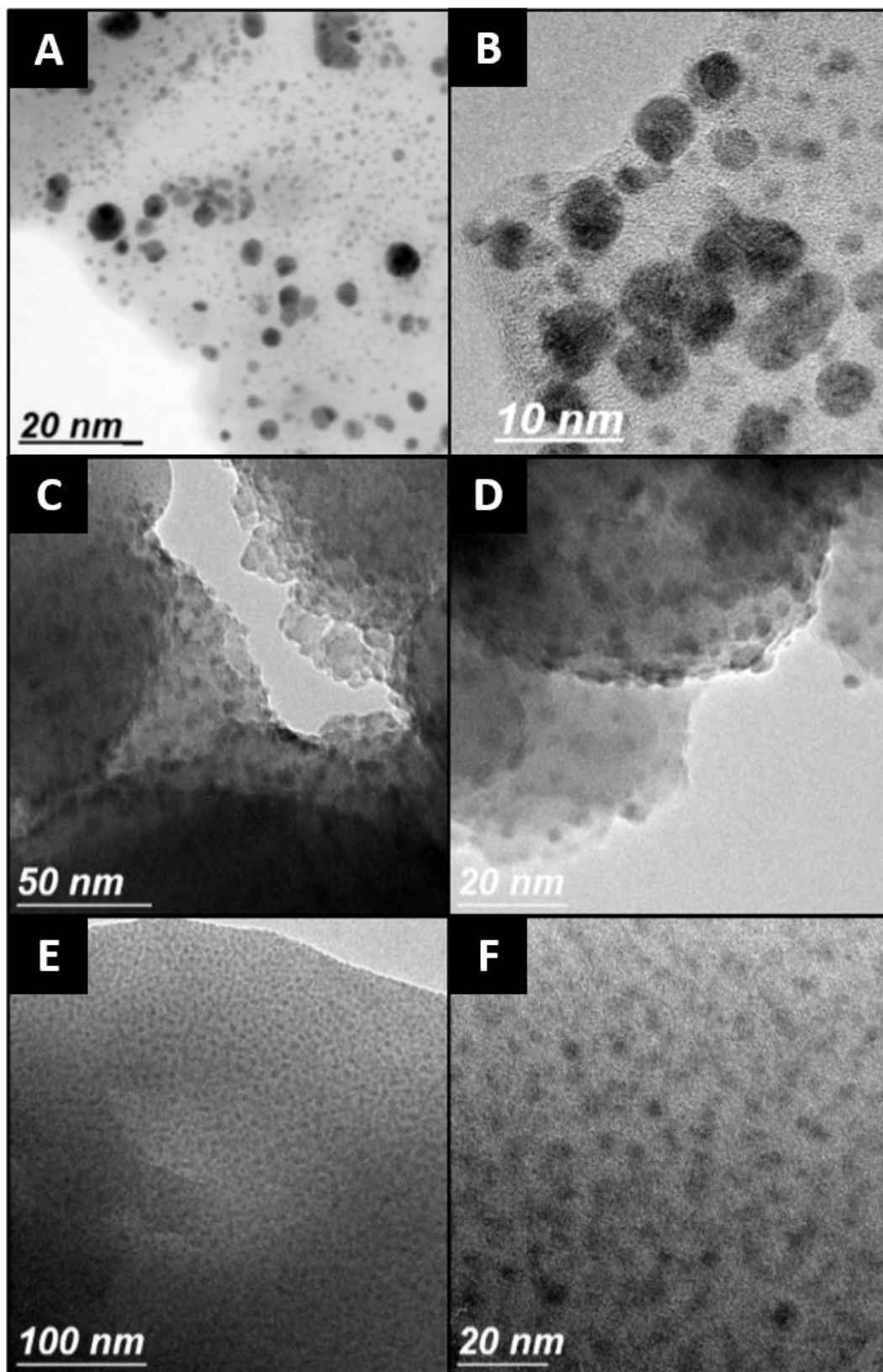


Figura 10. Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los nanocompuesto ZEO-AgNPs (A, B), ZEO-CuNPs (C, D) y ZEO-ZnNPs (E, F).

3.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs

Conforme a lo reportado en la literatura, el nanocompuesto ZEO-AgNPs exhibe propiedades antimicrobianas (Salem *et al.*, 2015; Gahlawat *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2016). Como se muestra en la Figura 11, la concentración inhibitoria de la biopelícula superior fue de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ZEO-AgNs; mientras que, la concentración mínima bactericida de ZEO-AgNPs para el crecimiento del cultivo planctónico y la formación de la biopelícula bentónica fue de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se ha descrito que las células planctónicas son las precursoras de la formación de las biopelículas superficial y bentónica en *V. cholerae* (Figura 3). En este sentido, la inhibición del cultivo planctónico por ZEO-AgNPs limita el establecimiento y formación de las biopelículas superficial y bentónicas como consecuencia. Cabe mencionar que no hay reportes previos en donde se haya evaluado el efecto de nanomateriales en la formación de la biopelícula superficial.

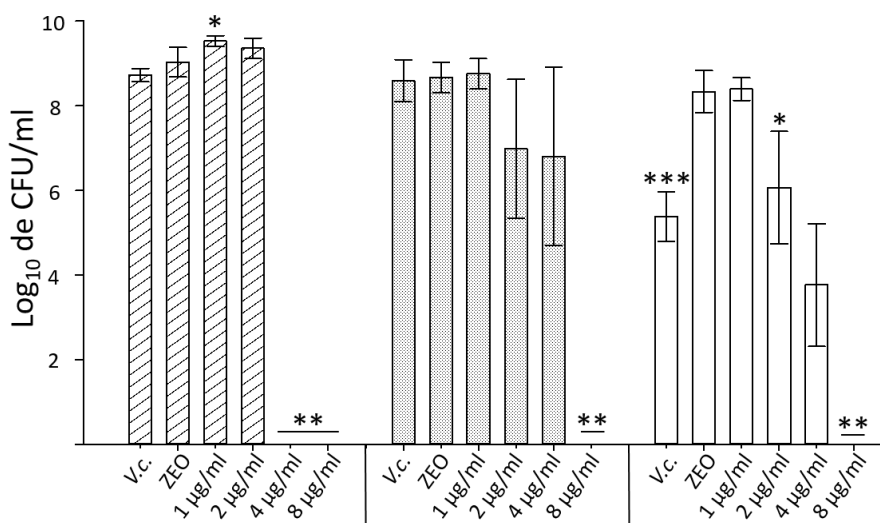





Figura 11. Promedio \pm DE (n=2) del crecimiento de *V. cholerae* en presencia de ZEO-AgNPs y cultivado bajo diferentes concentraciones de NPs expresado como el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml). , biopelícula superficial; , células planctónicas; , biopelícula bentónica. Valor de significancia estadística dado por: $p \leq 0.05$ - > 0.01 = *, $p \leq 0.01$ - > 0.001 = **; ZEO como control de referencia estadística.

Tras una primera aproximación con concentraciones desde 1 a 420 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cobre y zinc para ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs respectivamente, siendo 420 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la concentración límite anterior a la saturación de la solución, se establecieron concentraciones 160, 320 y 420 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los tratamientos de ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. Los nanocompuestos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs no ejercieron un efecto antibacteriano efectivo, ya que no se observaron diferencias significativas en el crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo

(Figura 12.A-B). Sin embargo, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs presentan una tendencia al decremento en CFU/ml que es proporcional al incremento en la concentración de cobre y zinc en las tres formas de vida de *V. cholerae* en comparación con el tratamiento control ZEO. El efecto más pronunciado se observó en los tratamientos con ZEO/CuNPs. Cabe mencionar que existen reportes de la actividad antibacteriana de nanopartículas de óxido de cobre y zinc. (Heinlaan *et al.*, 2008; Mortimer *et al.*, 2008; Rossetto *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2015; Gahlawat *et al.*, 2016; Sarwar *et al.*, 2016). Sin embargo, las condiciones de cultivo, las cepas y los nanomateriales son distintos a los utilizados en esta investigación. La nula actividad antimicrobiana de los nanomateriales ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs se puede deber al estado de oxidación de las nanopartículas embebidas en la matriz de zeolita, que difiere con las previamente reportadas (Tabla 2) (Hajipour *et al.*, 2012; Lemire *et al.*, 2013).

Cabe mencionar que los tratamientos control ZEO no mostraron diferencias significativas con respecto al control *V. cholerae* en las formas de vida planctónica y en biopelícula superior. Sin embargo, la presencia de ZEO incrementó significativamente el número de CFU/ml con respecto al control *V. cholerae* en la biopelícula bentónica. Este incremento en el número de células se mantuvo en los tratamientos de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. La presencia de zeolitas en el fondo del cultivo parece incrementar la superficie de adhesión para la bacteria, lo cual podría causar un incremento en las CFU's que no estaba previsto y es por ende un artefacto experimental que aplicaría tanto al control ZEO como a los tratamientos con nanocompuestos. Se requiere abordar experimentalmente esta posibilidad. Al margen del mecanismo de acción, se tomó a ZEO como tratamiento control para los análisis estadísticos y los análisis de niveles de expresión para poder evaluar rigurosamente la respuesta de los cultivos.

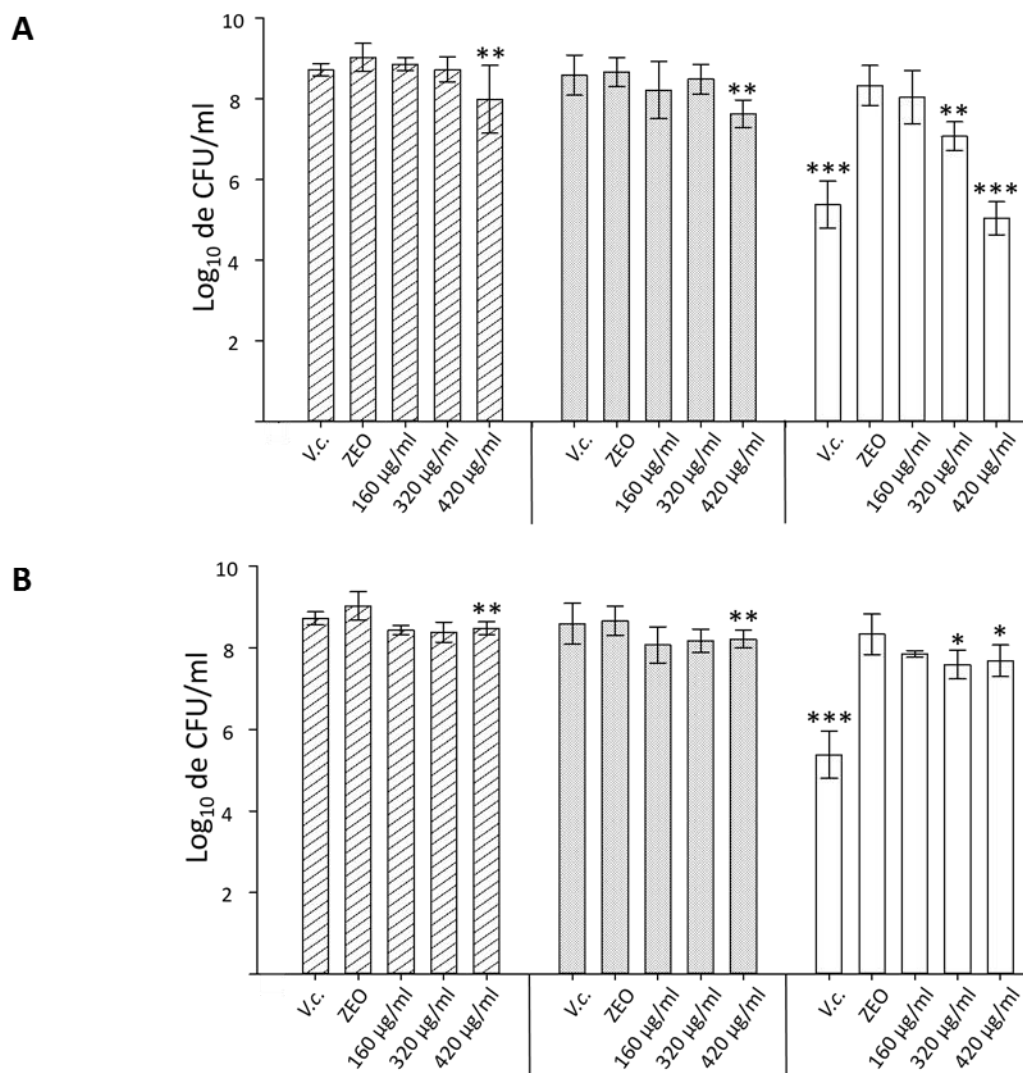


Figura 12. Promedio \pm DE ($n = 2$) del crecimiento de *V. cholerae* en presencia de ZEO-CuNPs (A) y ZEO-ZnNPs (B) y cultivado bajo diferentes concentraciones de NPs expresado como el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml). ▨, biopelícula superficial; ▩, células planctónicas; □, biopelícula bentónica. Valor de significancia estadística dado por: $p \leq 0.05$ - $\rightarrow 0.01 = *$, $p \leq 0.01$ - $\rightarrow 0.001 = **$, $p \leq 0.001 = ***$; ZEO como control de referencia estadística.

3.3 Análisis ultraestructural del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en *V. cholerae*

Se observó por microscopía electrónica de barrido el efecto de concentraciones subletales de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs sobre los cultivos planctónicos y sobre la formación de biopelícula superficial y bentónica en *V. cholerae*. En la formación de biopelícula superficial (Figura 13), se aprecia la integridad de

las células bacterianas, así como la formación de agregados asociados a la matriz extracelular. No se observaron cambios en las biopelículas superficiales formadas bajo concentraciones subletales de los nanomateriales probados. Es importante mencionar que esta es la primera vez que se visualiza la formación de este tipo de biopelícula tras el efecto de nanocompuestos antimicrobianos por microscopía electrónica de barrido.

En contraste, se identificaron modificaciones en la arquitectura celular, ausencia de flagelo en la mayoría de las células visualizadas, la presencia de posibles vesículas o restos de membrana celular y la formación de microagregados asociados a la matriz extracelular en los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs y en los controles de cultivos planctónicos de *V. cholerae* (Figura 14). En todos los tratamientos y controles de las células planctónicas se identificaron algunas células con deformaciones de la estructura celular. Se confirmó, tras la visualización de las células a las 6, 12 y 24 horas, que el daño de las células es dependiente del tiempo y se descartó que el daño identificado en las células planctónicas se debiera a la técnica de fijación, o bien, a la presencia de los nanomateriales (Anexo 3). Cabe resaltar que, a pesar de las modificaciones en la arquitectura celular y a la aparición de posibles vesículas en el cultivo planctónico, el número de células viables por campo de observación bajo el microscopio electrónico de barrido, no presentó diferencias significativas en comparación con los controles, y este era similar al número de células registrado en la formación de biopelículas.

Por otro lado, en la biopelícula bentónica hubo una reducción significativa en la distribución de los agregados sobre la superficie en presencia de ZEO-AgNPs (Figura 15). Las zeolitas se encontraban libres de crecimiento bacteriano y en la superficie circundante se apreciaba un nivel menor de colonización bacteriana. Las zeolitas con Cu y Zn no presentaron esta inhibición, y más aún, parecieron servir de andamio para la formación de biopelícula, esto debido a que se aprecia una mayor cantidad de biomasa en estos tratamientos.

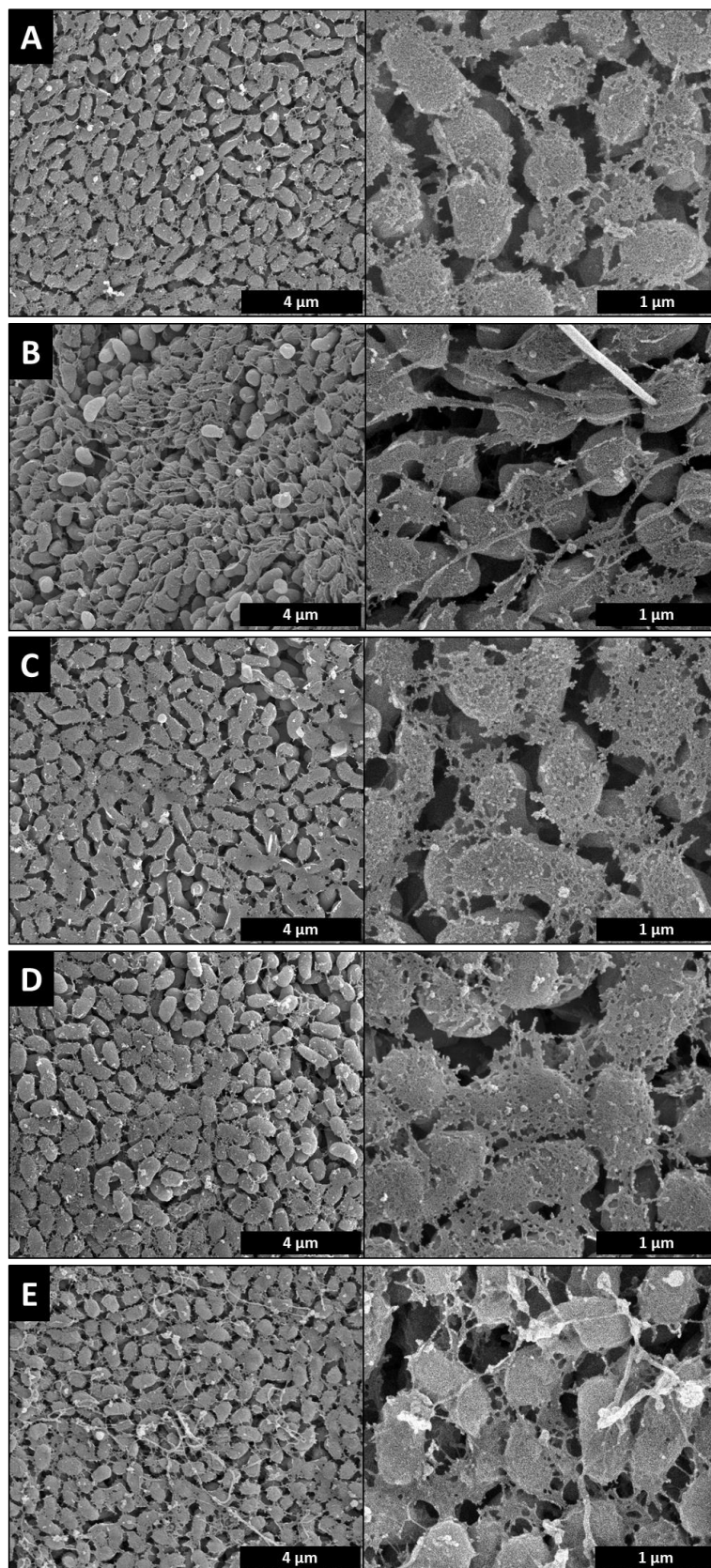


Figura 13. Estructura de la biopelícula superficial post-tratamiento con zeolitas con y sin nanopartículas. (A) tratamiento control; (B) tratamiento de zeolita sin nanopartículas; (C) tratamiento de ZEO-AgNPs 2 $\mu\text{g/ml}$; (D) tratamiento de ZEO-CuNPs 420 $\mu\text{g/ml}$; (E) tratamiento de ZEO-ZnNPs 420 $\mu\text{g/ml}$.

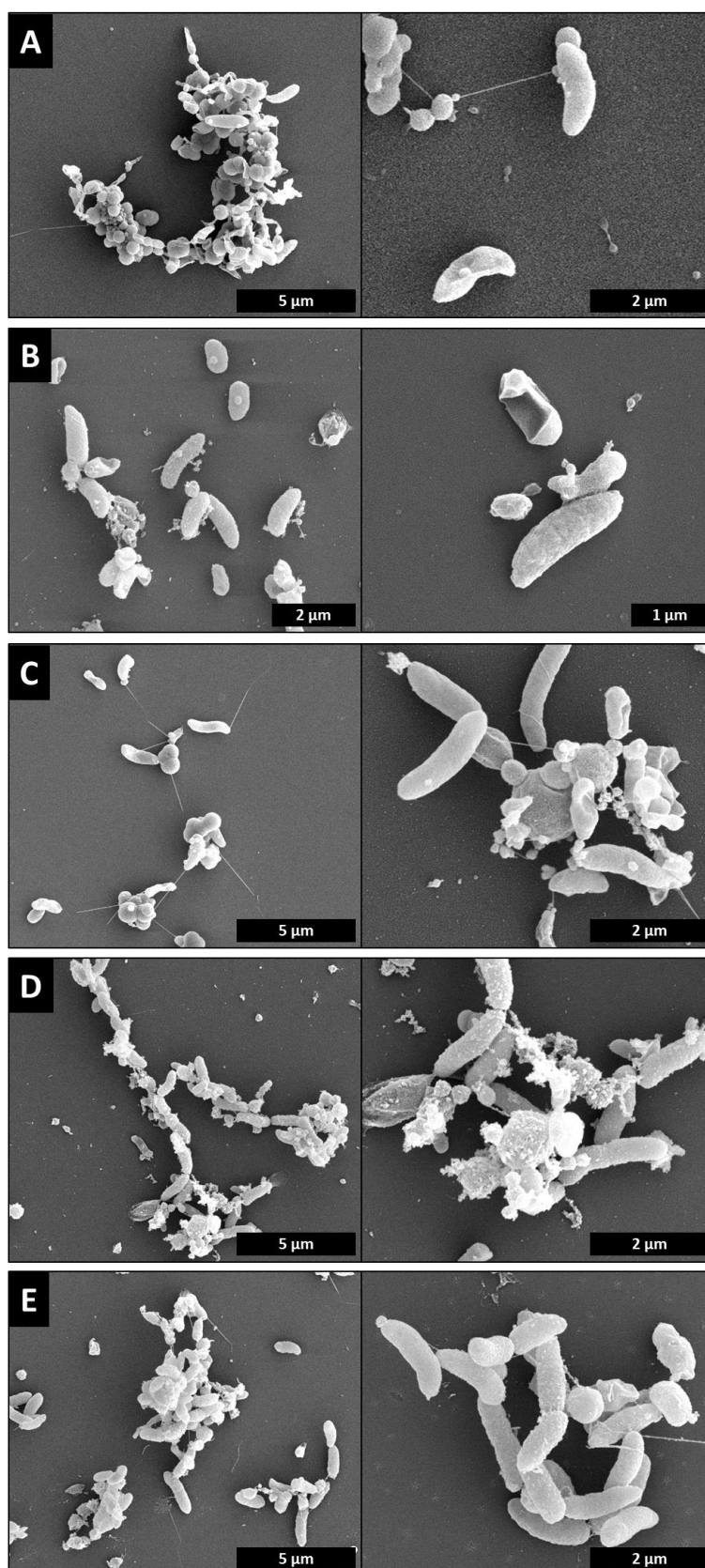


Figura 14. Estructura de las células planctónicas post-tratamiento con zeolitas con y sin nanopartículas (A) tratamiento control. (B) tratamiento de zeolita sin nanopartículas. (C) tratamiento de ZEO-AgNPs 2 $\mu\text{g/ml}$. (D) tratamientos de ZEO-CuNPs 420 $\mu\text{g/ml}$. (E) tratamientos de ZEO-ZnNPs 420 $\mu\text{g/ml}$.

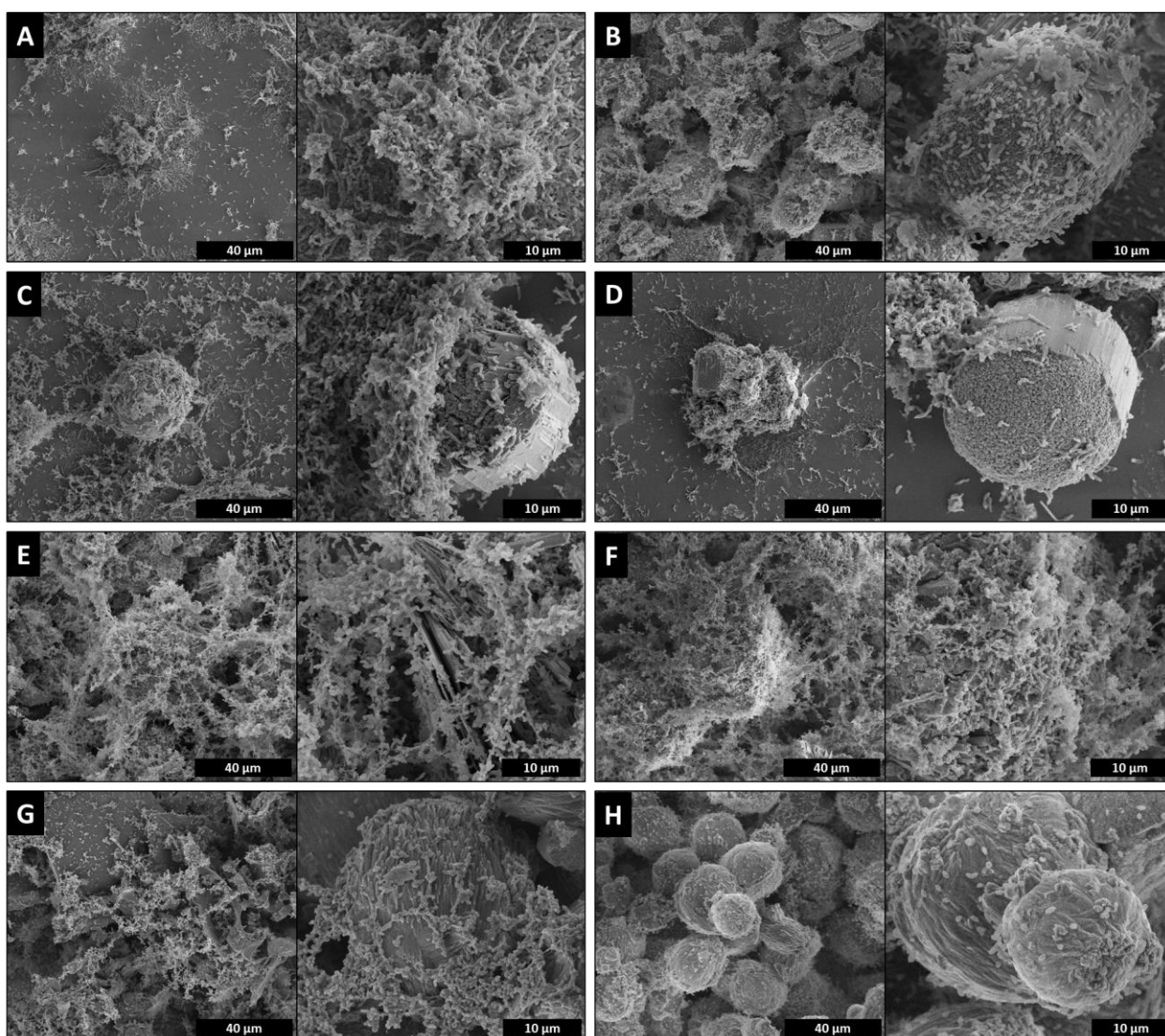


Figura 15. Estructura de la biopelícula bentónica post-tratamientos con zeolitas con y sin nanopartículas (A) tratamiento control. (B) Tratamiento con zeolita sin nanopartículas. (C y D) tratamientos de ZEO-AgNPs 1 $\mu\text{g/ml}$ y 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, (E, F) trata tratamientos de ZEO-CuNPs 160 y 420 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. (G y H) tratamientos de ZEO-ZnNPs 160 y 420 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Las características morfológicas y las modificaciones encontradas y descritas en las células de *V. cholerae* tras su tratamiento con ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs no son indicativos de daños en la estructura celular. Por lo que, el análisis por microscopía electrónica de barrido no es suficiente para confirmar que daños a la estructura celular, tales que repercutan en el metabolismo y funcionamiento celular. Por lo tanto, es necesario (i) verificar la viabilidad de las células post-tratamiento por ensayos colorimétricos para medir actividad metabólica (en especial en aquellos tratamientos en los cuales se presentaron modificaciones en la arquitectura celular), (ii) analizar de manera específica los posibles daños a la membrana y pared celular, (iii) confirmar si las vesículas identificadas son en efecto organelos de

transporte de productos o residuos, o bien restos celulares, así como (iv) realizar microscopía electrónica de transmisión (TEM) acoplada a análisis químicos para identificar dentro de las células vesículas y/o restos celulares y la presencia de los metales de interés.

3.4 Análisis del efecto de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en la expresión de genes involucrados en la formación de biopelícula y en la patogénesis de *V. cholerae*

Se analizó la expresión relativa de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1*, así como de las proteínas de membrana externa *ompU* y *ompT* en la biopelícula superficial y bentónica mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Esta técnica nos permite observar cambios en los niveles de expresión de genes ante un agente de interés. En este trabajo se considera un cambio notable en los niveles de expresión relativa cuando la expresión relativa incrementa o decrece 3 veces o más, de acuerdo al control (Mutch *et al.*, 2002). Se realizaron dos replicas biológicas para cada uno de los tratamientos evaluados. El análisis estadístico se vio limitado debido al número de réplicas biológicas ($n = 2$), por lo que no se presentan análisis estadísticos.

3.4.1 Expresión de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* en la biopelícula superficial de *V. cholerae*

El nivel de expresión de los genes de interés en la biopelícula superficial tras su tratamiento con ZEO-Ag, ZEO-Cu y ZEO-Zn se presenta en la Figura 16. Los cambios en la expresión relativa de los genes *vpsR* y *vpsL*, implicados en la regulación y producción de VPS, no fueron notables según los criterios establecidos con respecto al control en ningún tratamiento. Cabe señalar que *vpsR* codifica al regulador VpsR, el cual controla la expresión de los genes *vps*, *rbm* y *bap1* durante la formación, consolidación y mantenimiento de la biopelícula. El tratamiento ZEO-AgNPs promovió la expresión de *rbmA*, incrementándola 6 veces con respecto al control. Este gen codifica para la proteína RbmA, que está involucrada en la adherencia célula-célula (Hollenbeck *et al.*, 2014). Es posible que en la biopelícula superficial las células requieran constantemente de la expresión de RbmA, proteína crucial en el mantenimiento de la biopelícula superficial al encontrarse suspendidas en la columna de agua (Hollenbeck *et al.*, 2014). Por otra parte, sí

se observaron cambios notables en los niveles de expresión de *bap1* en el tratamiento ZEO-ZnNPs, ya que se documentó en decremento de 3.9 veces en el nivel de expresión con respecto al control.

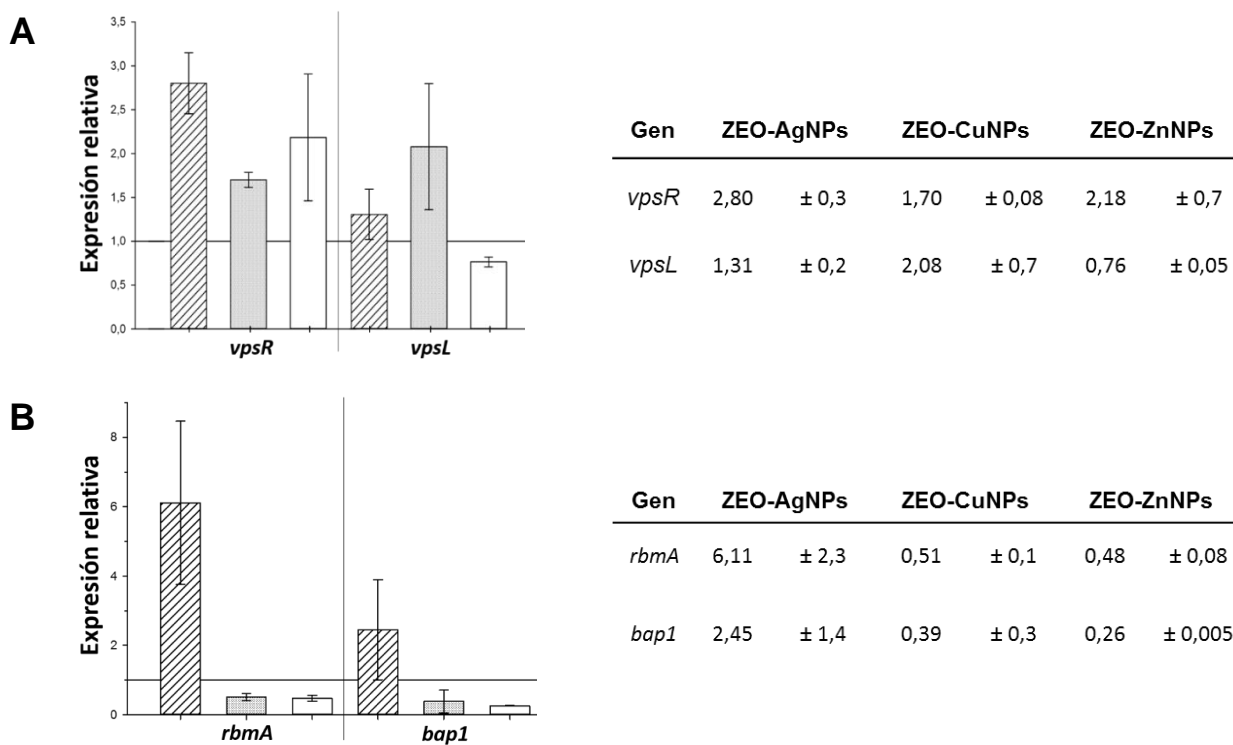


Figura 16. Promedio \pm DE (n=2) de los niveles de expresión de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* de la biopelícula superficial post-tratamientos: ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. La línea horizontal muestra la expresión del gen control *dnaE* normalizado a uno.

3.4.2 Expresión de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* en la biopelícula bentónica de *V. cholerae*

La expresión relativa de los genes de interés en la biopelícula bentónica tras su tratamiento con ZEO-Ag, ZEO-Cu y ZEO-Zn se presenta en la Figura 17. La diferencia en la expresión del gen *vpsR* no excedió 3 veces el valor correspondiente al control en ninguno de los tratamientos. En contraste, en los tratamientos ZEO-AgNPs y ZEO-ZnNPs fue notable la reducción de la expresión del gen *vpsL*. Este gen codifica para una enzima glicosiltransferasa, la cual está involucrada en la iniciación y/o elongación de subunidades de VPS. Finalmente, el tratamiento ZEO-ZnNPs provocó un decremento notable en la expresión de los genes *rbmA*

y *bap1* de 5 y 3.2 veces, respectivamente. Este tratamiento fue el único que llevó al decremento en la expresión relativa de *vpsL*, *rbmA* y *bap1* en la biopelícula bentónica.

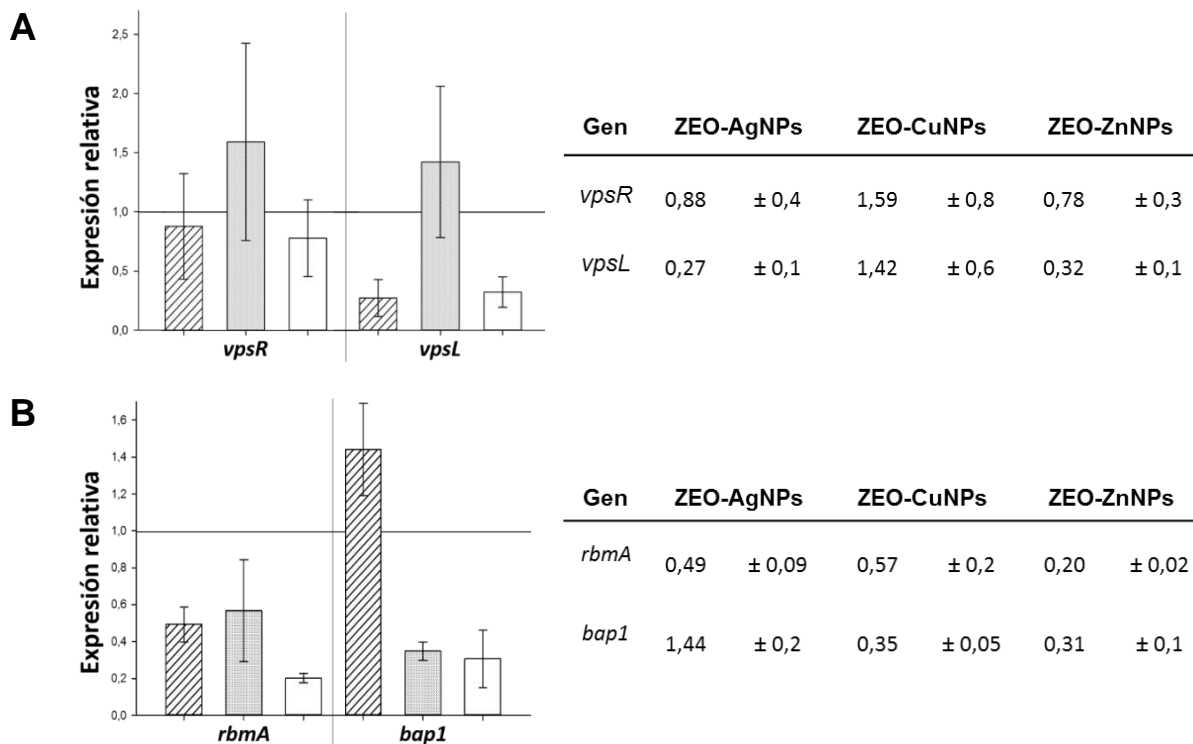


Figura 17. Promedio \pm DE (n=2) de los niveles de expresión de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* de la biopelícula bentónica post-tratamientos: ZEO-AgNPs (hatched), ZEO-CuNPs (dotted) y ZEO-ZnNPs (white). La línea horizontal muestra la expresión del gen control *dnaE* normalizado a uno.

Cabe mencionar que en los análisis realizados con las biopelículas superficiales y bentónicas, solo se evaluó la expresión del gen regulador VpsR, que regula positivamente la expresión del grupo de genes de biopelícula de *V. cholerae* (VcBMC) que incluye a los genes *vps*, *rbm* y *bap1*. Sin embargo, este grupo es también regulado por VpsT, considerado un segundo regulador positivo, y c-di-GMP, un segundo mensajero, y HapR y H-NS, que son reguladores negativos. Por lo que, no es posible proponer algún mecanismo de respuesta con los resultados obtenidos. Sin embargo, estos resultados ofrecen los fundamentos necesarios para profundizar en el estudio de los efectos de los nanomateriales a nivel transcripcional.

3.4.3 Expresión de los genes *ompU* y *ompT* en la biopelícula superficial y bentónica de *V. cholerae*

Se ha demostrado que las porinas OmpU y OmpT juegan un papel importante en la sobrevivencia de *V. cholerae* durante su patogénesis (Provenzano *et al.*, 2001; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). Se ha descrito que OmpU protege a la célula e incrementa su sobrevivencia en el intestino al excluir selectivamente los aniones tóxicos de la bilis, mientras que la sobreproducción de OmpT incrementa la susceptibilidad de *V. cholerae* a detergentes aniónicos y reduce la expresión de la toxina del cólera y de la toxina correguladora del pili (Provenzano *et al.*, 2001; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004). En este estudio, solo el tratamiento ZEO-AgNPs en la biopelícula superficial de *V. cholerae* promovió considerablemente la sobreexpresión de los genes *ompU* y *ompT*, 2.9 y 4.4 veces, respectivamente (Figura 18.A).

El resto de los tratamientos que se aplicaron a las biopelículas superficiales y bentónicas presentaron una expresión de *ompU* y *ompT* igual o menor al del control. El decremento en la expresión de *ompT* es considerable (menos de un tercio) en los tratamientos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en las biopelícula superficial y bentónica. La biopelícula superficial muestra un decremento de 10 y 7.7 veces en los tratamientos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs respectivamente, mientras que la biopelícula bentónica muestra un decremento de 5.5 y 9 veces para los tratamientos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs, respectivamente. Con excepción del tratamiento ZEO-AgNPs en la biopelícula superficial, los niveles de expresión de todos estos tratamientos presentan una tendencia, en la cual la expresión de *ompU* es mayor que la de *ompT*, a pesar de que su expresión está por debajo del nivel de expresión control. En este sentido, se ha reportado que en un medio rico *ompU* se expresa a través de la regulación de ToxR, el cual reprime la expresión de *ompT* (Provenzano *et al.*, 2001). Esto fue observado en los tratamientos con ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en la biopelícula superficial y en todos los tratamientos en la biopelícula bentónica.

Por último, de acuerdo a los cambios en los niveles de expresión de *ompU* y *ompT* discutidos y considerando la descripción previa de la expresión coordinada entre las porinas OmpU/OmpT y las toxinas CT/TCP (Provenzano *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Wibbenmeyer *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2004), es posible que los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs modifiquen la regulación de la transcripción de la CT y TCP, impactando directamente en el grado de virulencia en las células de *V. cholerae*. En este sentido, es necesario estudiar el efecto de los nanocompuestos sobre los genes involucrados en la regulación de la patogénesis, así como de los genes que codifican para las principales toxinas de *V. cholerae*.

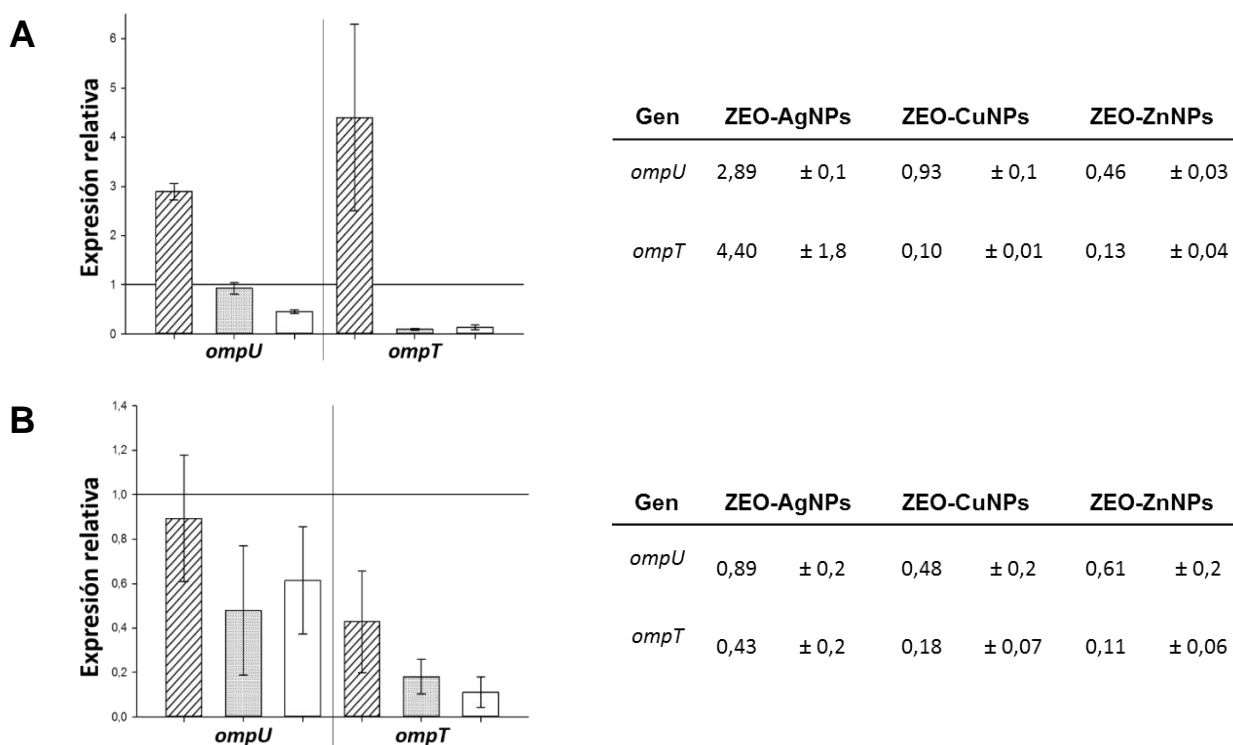





Figura 18. Promedio \pm DE (n=2) de los niveles de expresión de los genes *ompU* y *OmpT* de la biopelícula superficial (A) y bentónica (B) post-tratamientos: ZEO-AgNPs , ZEO-CuNPs  y ZEO-ZnNPs . La línea horizontal muestra la expresión del gen control *dnaE* normalizado a uno.

Finalmente, los resultados obtenidos no son suficientes para fundamentar los mecanismos de respuesta de *V. cholerae* generados por los nanocompuestos. Sin embargo, los cambios en la expresión relativa de los genes de interés en las formas de vida de *V. cholerae* tras los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs, ofrecen elementos necesarios para profundizar en el estudio de la respuesta de *V. cholerae* en nivel transcripcional generada por los nanomateriales.

La formación de biopelícula en *V. cholerae* incrementa su capacidad de colonizar el intestino humano, su sobrevivencia en ecosistemas acuáticos y su resistencia a tratamientos antimicrobianos convencionales. En esta investigación se describe a ZEO-AgNPs como un nanocompuesto capaz de eliminar e inhibir de manera efectiva la forma de vida planctónica y la formación de biopelícula superficial y bentónica de *V. cholerae*.

Cabe recalcar que, a pesar de que los nanocompuestos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs no presentaron un efecto inhibitorio sobre *V. cholerae*, es posible modificar la síntesis para promover su actividad antimicrobiana.

En este trabajo se visualiza por vez primera la formación de biopelícula superficial por microscopía electrónica de barrido, y es también la primera vez que se reportan los cambios en los niveles de expresión relativa de genes asociados a la formación de biopelículas y virulencia de *V. cholerae* tras su tratamiento con nanocompuestos. A pesar de que los datos obtenidos no son suficientes para identificar los mecanismos de respuesta de *V. cholerae* ante los nanocompuestos, sí se observaron cambios en el nivel de expresión de algunos genes que sustentan el profundizar en el estudio del efecto de los nanomateriales en nivel estructural y genético. Dicha información permitirá evaluar su posible aplicación como un agente antimicrobiano para el control de *V. cholerae*.

Capítulo 4. Conclusiones

- El nanocompuesto ZEO-AgNPs ejerce un efecto antimicrobiano en *V. cholerae*. Inhibe la formación de la biopelícula superior a una concentración de 4 µg/ml, mientras que a 8 µg/ml de ZEO-AgNPs es capaz de inhibir la formación de biopelícula bentónica y eliminar a las células planctónicas.
- Los nanocompuestos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs no ejercen un efecto antimicrobiano sobre las distintas formas de vida de *V. cholerae*.
- No se observó daño aparente en las biopelículas superficiales tras su tratamiento con concentraciones sub-letales de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.
- No se observó daño aparente en las células que conforman a las biopelículas bentónicas causado por los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.
- Las células del cultivo planctónico presentaron modificaciones en la arquitectura celular y presencia de vesículas o restos celulares. El daño aparente en los cultivos plantónicos se correlaciona al tiempo de cultivo y demanda de nutrientes y no a la presencia de nanomateriales.
- En la biopelícula bentónica, el nanocompuesto ZEO-AgNPs mostró un efecto inhibitorio parcial en la formación de la biopelícula directamente proporcional al incremento en la concentración de plata. Por el contrario, no se observó dicho efecto en los tratamientos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.
- Los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs generan modificaciones en los niveles de expresión relativa de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1* relacionados en la formación de la biopelícula superficial y bentónica, así como en los genes *ompU* y *ompT*, que codifican para proteínas que juegan un papel importante en la sobrevivencia de *V. cholerae*.

Capítulo 5. Perspectivas

- Evaluar el efecto de los nanocompuestos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en las formas de vida plantónica y formación de biopelícula superficial y bentónica de *V. cholerae* mediante su visualización por microscopía electrónica de transmisión acoplada a análisis químico.
- Realizar un análisis transcripcional global por medio de la técnica de secuenciación masiva RNA-seq con el objetivo de determinar los cambios en la regulación transcripcional de los genes involucrados en la formación de biopelícula y patogénesis de *Vibrio cholerae* en respuesta a los nanocompuestos con actividad antimicrobiana.
- Analizar el efecto de los nanocompuestos con actividad antimicrobiana en el proteoma de *Vibrio cholerae*.

Literatura citada

Almagro-Moreno, S. *et al.* (2015) Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*, *PLOS Pathogens*. Edited by J. B. Bliska, 11(5), e1004787. doi: 10.1371/journal.ppat.1004787.

Berk, V. *et al.* (2012) Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms, *Science*, 337(6091), 236–239. doi: 10.1126/science.1222981.

Beyhan, S. *et al.* (2007) Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: Comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR, *Journal of Bacteriology*, 189(2), 388–402. doi: 10.1128/JB.00981-06.

Beyhan, S. *et al.* (2007) Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway, *Molecular Microbiology*, 63(4), 995–1007. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x.

Davoodbasha, M. A. *et al.* (2016) The facile synthesis of chitosan-based silver nano-biocomposites via a solution plasma process and their potential antimicrobial efficacy, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Elsevier Inc, 605, 49–58. doi: 10.1016/j.abb.2016.01.013.

Dong, B. *et al.* (2014) Silver confined within zeolite EMT nanoparticles: preparation and antibacterial properties, *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 6, 10859–10864. doi: 10.1039/C4NR03169E.

Faruque, S. *et al.* (2008) *Vibrio Cholerae: Genomics and Molecular Biology*, 218. Available at: https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=fP67F_eOSgQC&pgis=1.

Faruque, S. M. *et al.* (1998) Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*., *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(4), 1301–14. doi: 10.1073/pnas.0703993104.

Fleischer, C. C. *et al.* (2013) Cellular Binding of Anionic Nanoparticles is Inhibited by Serum Proteins Independent of Nanoparticle Composition., *Biomaterials science*, 1(9), 975–982. doi: 10.1039/C3BM60121H.

Fong, J. C. N. *et al.* (2006) Identification and Characterization of RbmA, a Novel Protein Required for the Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Structure in *Vibrio cholerae*, *Journal of Bacteriology*, 188(3), 1049–1059. doi: 10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006.

Fong, J. C. N. *et al.* (2010) Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis, *Microbiology*, 156(9), 2757–2769. doi: 10.1099/mic.0.040196-0.

Gahlawat, G. *et al.* (2016) Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents against cholera, *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 15(1), 25. doi: 10.1186/s12934-016-0422-x.

Giglio, K. M. *et al.* (2013) Structural Basis for Biofilm Formation via the *Vibrio cholerae* Matrix Protein RbmA, *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3277–3286. doi: 10.1128/JB.00374-13.

Guerra, R. *et al.* (2013) Antimicrobial supported nanoparticles: Gold versus silver for the cases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, *Microporous and Mesoporous Materials*, 170, 62–66. doi: 10.1016/j.micromeso.2012.11.036.

- Hajipour, M. J. *et al.* (2012) Antibacterial properties of nanoparticles, *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 30(10), 499–511. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.06.004.
- Heinlaan, M. *et al.* (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, *Chemosphere*, 71(7), 1308–1316. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047.
- Hollenbeck, E. C. *et al.* (2014) Molecular determinants of mechanical properties of *V. cholerae* biofilms at the air-liquid interface, *Biophysical Journal*, 107(10), 2245–2252. doi: 10.1016/j.bpj.2014.10.015.
- Jaime-Acuña, O. E. *et al.* (2016) Synthesis and complete antimicrobial characterization of CEOBACTER, an Ag-Based nanocomposite, *PLoS ONE*, 11(11), 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0166205.
- Jamil, B. *et al.* (2017) Mechanism of Action: How Nano-Antimicrobials Act?, *Current Drug Targets*, 18(3), 363–373. doi: 10.2174/1389450116666151019101826.
- Kitaoka, M. *et al.* (2017) Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*, (2011), 397–407. doi: 10.1099/jmm.0.023051-0.
- Krishnani, K. K. *et al.* (2012) Bactericidal and ammonia removal activity of silver ion-exchanged zeolite, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 117, 86–91. doi: 10.1016/j.biortech.2012.04.044.
- Krishnaraj, C. *et al.* (2010) Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50–56. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.008.
- Lemire, J. A. *et al.* (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 11(6), 371–384. doi: 10.1038/nrmicro3028.
- Li, C. *et al.* (2002) ToxR interferes with CRP-dependent transcriptional activation of ompT in *Vibrio cholerae*, *Molecular Microbiology*, 43, 1577–1589. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952906><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952906>.
- Mathur, J. *et al.* (2004) The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides, *Infection and Immunity*, 72(6), 3577–3583. doi: 10.1128/IAI.72.6.3577.
- Moorthy, S. *et al.* (2005) Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development, *Molecular Microbiology*, 57(6), 1623–1635. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04797.x.
- Mortimer, M. *et al.* (2008) High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles, *Toxicology in Vitro*, 22(5), 1412–1417. doi: 10.1016/j.tiv.2008.02.011.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2017) *Microbiología Médica*. Edited by Elsevier. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mutch, D. M. *et al.* (2002) The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data., *BMC Bioinformatics*, 3, 17. doi: 10.1186/1471-2105-3-17.
- OMS (2015) *Cólera*. Available at: <http://www.who.int/topics/cholera/about/es/>.

- Provenzano, D. *et al.* (2001) Characterization of the Role of the ToxR-Modulated Outer Membrane Porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* Virulence Characterization of the Role of the ToxR-Modulated Outer Membrane Porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* Virulence, 183(12), 3652–3662. doi: 10.1128/JB.183.12.3652.
- Rossetto, A. L. de O. F. *et al.* (2014) Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 490, 807–814. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.056.
- Salem, W. *et al.* (2015) Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*, *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 305(1), 85–95. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005.
- Sarwar, S. *et al.* (2016) The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 12(6), 1499–1509. doi: 10.1016/j.nano.2016.02.006.
- Shameli, K. *et al.* (2015) Antibacterial effect of silver nanoparticles on talc composites, *Research on Chemical Intermediates*, 41(1), 251–263. doi: 10.1007/s11164-013-1188-y.
- Silva, A. J. *et al.* (2016) *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis, *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by S. Baker, 10(2), e0004330. doi: 10.1371/journal.pntd.0004330.
- Slonczewski, J. L. *et al.* (2009) *Microbiology, An Evolving Science*. 2nd edn, *Microbiology*. 2nd edn. Norton. doi: 10.1109/TE.2009.2022154.
- Smith, D. R. *et al.* (2015) In situ proteolysis of the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA promotes biofilm recruitment., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), 10491–6. doi: 10.1073/pnas.1512424112.
- Strigul, N. *et al.* (2009) Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Desalination*. Elsevier B.V., 248(1–3), 771–782. doi: 10.1016/j.desal.2009.01.013.
- Teschler, J. *et al.* (2015) Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(5), 255–268. doi: 10.1038/nrmicro3433.
- Vaseeharan, B. *et al.* (2010) Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*, *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 352–356. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02799.x.
- Wang, L. *et al.* (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future, *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. doi: 10.2147/IJN.S121956.
- WHO (2015) *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*, WHO. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.009.
- Wibbenmeyer, J. A. *et al.* (2002) *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT Porins Are Differentially Affected by Bile *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT Porins Are Differentially Affected by Bile, *American Society for Microbiology*, 70(1), 121–126. doi: 10.1128/IAI.70.1.121–126.2002.
- Yildiz, F. H. *et al.* (2001) VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory

Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPSETr-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor, *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1716–1726. doi: 10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001.

Yildiz, F. H. *et al.* (2008) Genetics and Microbiology of Biofilm Formation by *Vibrio cholerae*, in Shah M. Faruque and Nair, G. B. (eds) *Vibrio cholerae: Genomics and Molecular Biology*. Caister Ac. Norfolk, UK, 123–138. Available at:
https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=fP67F_eOSgQC&oi=fnd&pg=PA123&dq=genetics+and+microbiology+of+biofilm+formation+by+vibrio+cholerae&ots=Dd8TsUREsS&sig=RV9LkKP0Io_BWI_BFKPJH2NUirs#v=onepage&q&f=true.

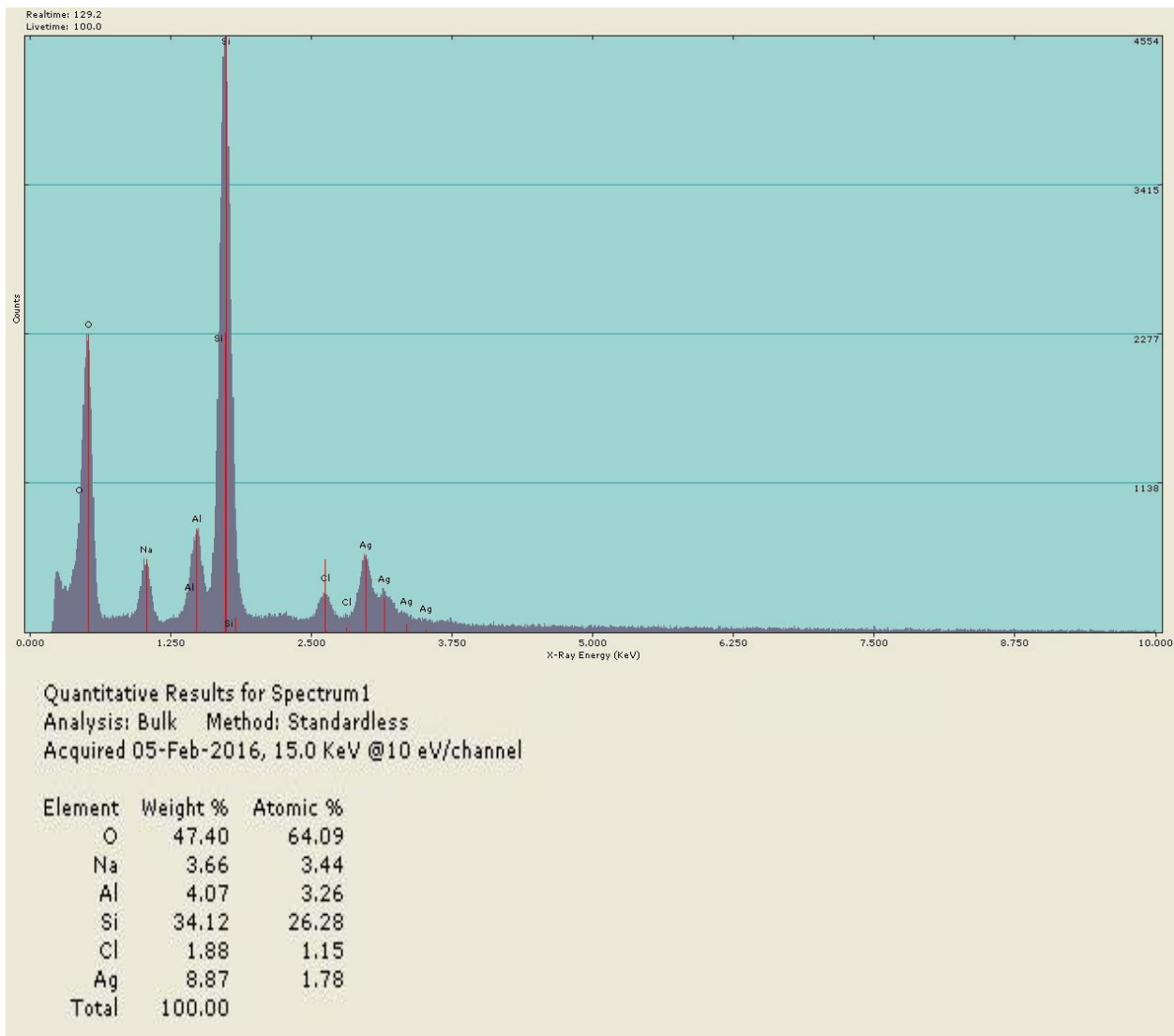
Yildiz, F. H. *et al.* (2009) *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different, *Trends in Microbiology*, 17(3), 109–118. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.004.Vibrio.

Yildiz, F. H. *et al.* (2015) Biofilm Matrix Proteins, *Microbiology Spectrum*, 3(2), 1–16. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.

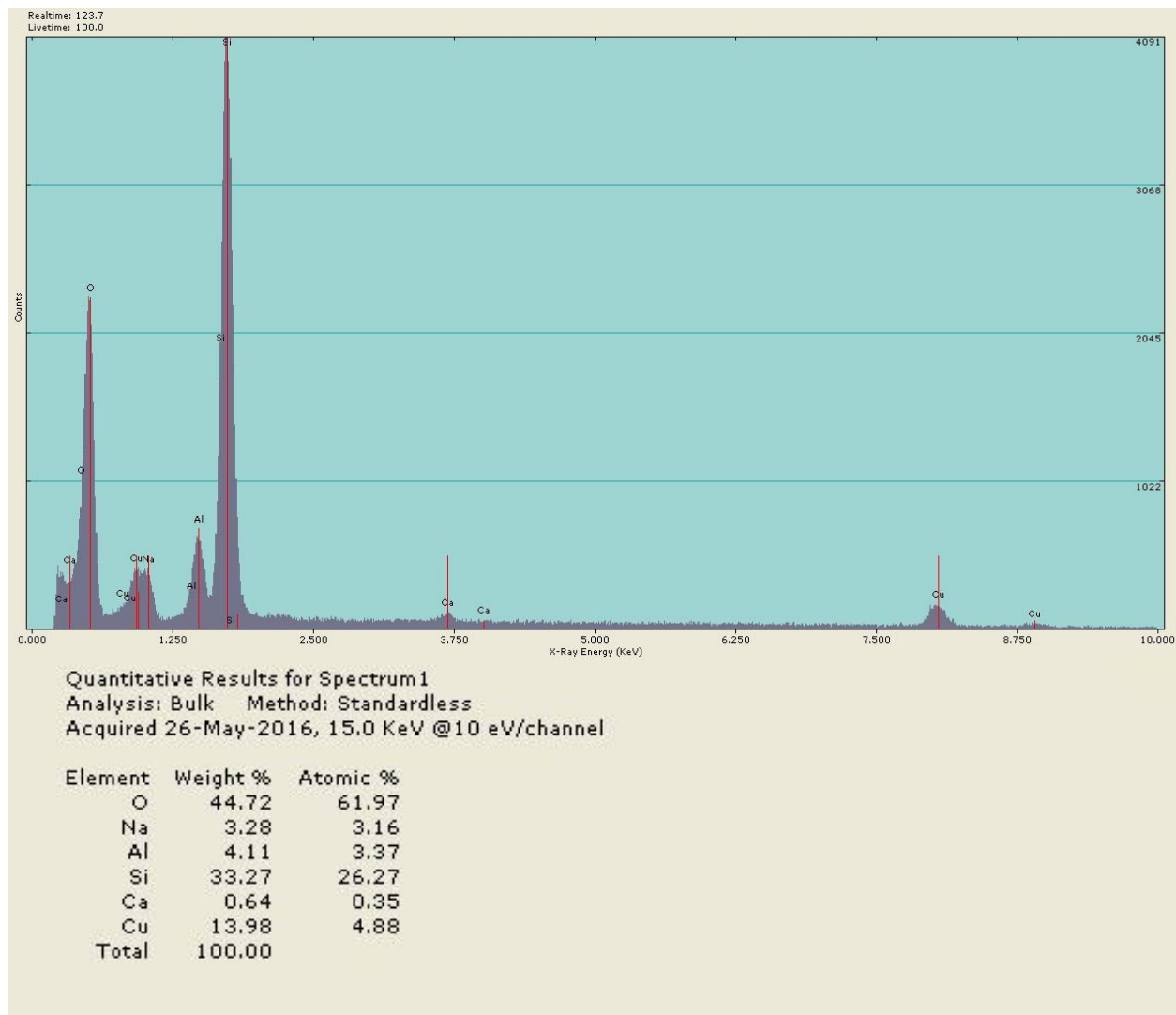
Anexos

Anexo 1. Análisis de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de los nanocompuestos (A) ZEO-AgNPs, (B) ZEO-CuNPs y (C) ZEO-ZnNPs.

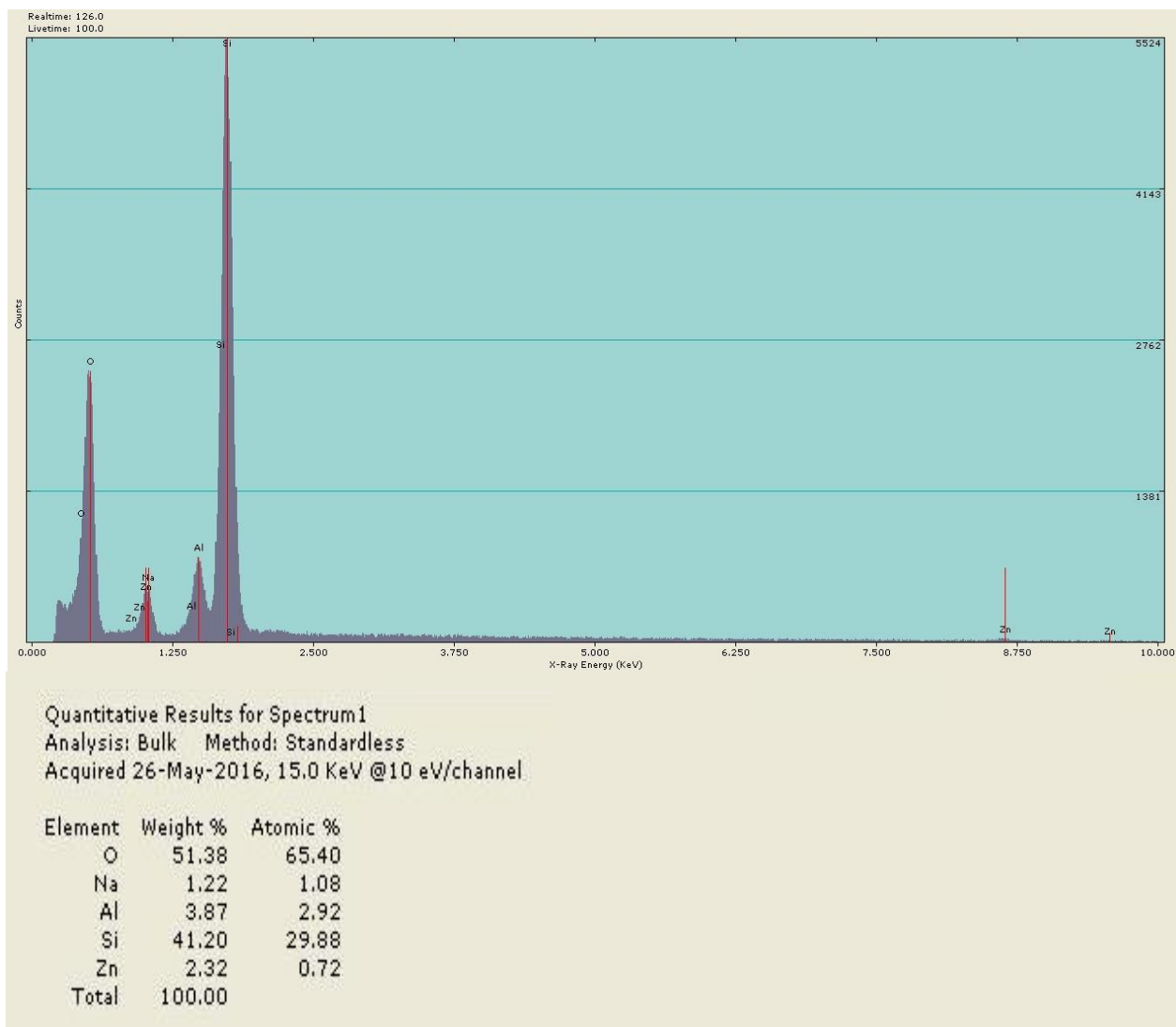
A



B



C



Anexo 2. Número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en los tratamientos ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs.

Tabla anexa 1. Número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en los tratamientos de ZEO-AgNPs

Tratamiento	biopelícula superficial		Células planctónicas		biopelícula bentónico	
	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05
ZEO (+)	$1.4 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$	Ref.	$5.9 \times 10^8 \pm 4.2 \times 10^8$	Ref.	$1.1 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^7$	Ref.
V.c. (+)	$5.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$	0.111	$2.1 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$	0.8	$4.1 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$	<0.001
1 µg/ml	$3.5 \times 10^9 \pm 1 \times 10^9$	0.028	$7.3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^8$	0.72	$2.9 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$	0.799
2 µg/ml	$2.5 \times 10^9 \pm 1.5 \times 10^9$	0.212	$3.9 \times 10^8 \pm 3.5 \times 10^8$	0.087	$4.9 \times 10^5 \pm 5.2 \times 10^5$	0.046
4 µg/ml	0	0	$2.6 \times 10^8 \pm 3 \times 10^8$	0.257	$1.3 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^4$	0.008
8 µg/ml	0	0	0	0	0	0.008
16 µg/ml	0	0	0	0	0	0.008
24 µg/ml	0	0	0	0	0	0.008

Abreviaturas: (+), control positivo; V.c., *Vibrio cholerae*; Ref., control positivo de referencia para los análisis estadísticos.

Tabla anexa 2. Número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en los tratamientos de ZEO-CuNPs

Tratamiento	biopelícula superficial		Células planctónicas		biopelícula bentónico	
	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05
ZEO (++)	$1.4 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$	Ref.	$5.9 \times 10^8 \pm 4.2 \times 10^8$	Ref.	$1.1 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^7$	Ref.
V.c. (+)	$5.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$	0.111	$2.1 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$	0.8	$4.1 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$	<0.001
160 µg/ml	$7.7 \times 10^8 \pm 3.4 \times 10^8$	0.352	$3.3 \times 10^8 \pm 3.9 \times 10^8$	0.229	$4.6 \times 10^7 \pm 3 \times 10^7$	0.247
320 µg/ml	$6.8 \times 10^8 \pm 5.6 \times 10^8$	0.8	$3.8 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$	0.492	$1.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	0.48
420 µg/ml	$1.9 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^8$	0.006	$5.4 \times 10^7 \pm 4.3 \times 10^8$	0.006	$1.5 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^7$	0.052

Abreviaturas: (+), control positivo; V.c., *Vibrio cholerae*; Ref., control positivo de referencia para los análisis estadísticos.

Tabla anexa 3. Número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) en los tratamientos de ZEO-ZnNPs

Tratamiento	biopelícula superficial		Células planctónicas		biopelícula bentónico	
	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05	CFU / ml	p <0.05
ZEO (++)	$1.4 \times 10^9 \pm 1.2 \times 10^9$	Ref.	$5.9 \times 10^8 \pm 4.2 \times 10^8$	Ref.	$1.1 \times 10^8 \pm 2.6 \times 10^7$	Ref.
V.c. (+)	$5.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^8$	0.111	$2.1 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$	0.8	$4.1 \times 10^5 \pm 3.2 \times 10^5$	<0.001
160 µg/ml	$2.8 \times 10^8 \pm 7,6 \times 10^7$	0,352	$1,5E+08 \pm 9,0 \times 10^7$	0,229	$7,2 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^7$	0,247
320 µg/ml	$2.7 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$	0,19	$1,8E+08 \pm 1,0 \times 10^8$	0,492	$6,4 \times 10^7 \pm 4,8 \times 10^7$	0,48
420 µg/ml	$3.2 \times 10^8 \pm 1,1 \times 10^8$	0,006	$1,8E+08 \pm 8,9 \times 10^7$	0,006	$5,1 \times 10^7 \pm 3,7 \times 10^7$	0,052

Abreviaturas: (+), control positivo; V.c., *Vibrio cholerae*; Ref., control positivo de referencia para los análisis estadísticos.

