

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



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

**Análisis metabolómico de la respuesta de
Vibrio cholerae ante nanopartículas de plata**

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

Presenta:

Anaid Meza Villezcas

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Anaid Meza Villezcas

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Director de tesis

Dr. Aldo Moreno Ulloa

Dra. Sharon Zinah Herzka Llona

Dra. Ana Lucía Gallego Hernández



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

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

Análisis metabólico de la respuesta de *Vibrio cholerae* ante nanopartículas de plata

Resumen aprobado por:

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Director de tesis

La bacteria enteropatógena *Vibrio cholerae* causa la enfermedad del cólera. Puede cambiar entre las formas de vida planctónica y biopelícula, en donde la biopelícula mejora su transmisión, virulencia y resistencia a antibióticos. La aparición de microorganismos multirresistentes a antibióticos ha llevado a la exploración de nuevos agentes antimicrobianos como las nanopartículas de plata (AgNPs). Sin embargo, poco se sabe sobre los cambios metabólicos ejercidos por AgNPs en ambas formas de vida. Este estudio muestra el perfil metabólico de la respuesta de células planctónicas y biopelícula de *V. cholerae* frente a concentraciones subletales de AgNPs mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en Tándem de alta resolución (LC-MS2). Se cuantificaron 690 metabolitos en todas las condiciones experimentales. Se modularon significativamente más metabolitos en las células planctónicas (n=71) en comparación con las biopelículas (n=37). Solo tres de los 105 metabolitos perturbados se compartieron entre las células planctónicas y las biopelículas, lo que sugiere alteraciones metabólicas únicas para cada forma de vida causada por las nanopartículas. Los perfiles de clase química diferían entre las células planctónicas y las biopelículas, lo que indica una respuesta metabólica dependiente del fenotipo a las nanopartículas. El análisis de enriquecimiento químico mostró cantidades alteradas de ácidos grasos oxidados, ácidos grasos saturados, ácidos fosfatídicos y ácido esteárico saturado en células planctónicas tratadas con AgNPs, lo que sugiere una posible recomposición de la membrana. Por el contrario, no se enriquecieron clases químicas en la biopelícula. En conclusión, este estudio muestra que la respuesta de *V. cholerae* a las nanopartículas de plata depende del fenotipo y que las células planctónicas sufren un posible proceso de recomposición lipídica, posiblemente relacionado con un mecanismo adaptativo que involucra la membrana celular.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, células planctónicas, biopelícula, nanopartículas de plata, espectrometría de masas en Tándem (MS2), perturbación metabólica.

Abstract of the thesis presented by **Anaid Meza Villezcas** as a partial requirement to obtain the Doctor of science degree in Life Science with orientation in Microbiology.

Metabolomic analysis of *Vibrio cholerae* response against silver nanoparticles

Abstract approved by:

Dr. Alejandro Huerta Saquero
Thesis Director

The enteropathogenic bacterium *Vibrio cholerae* causes the cholera disease. It can switch between planktonic and biofilm life forms, and previous studies indicate that the biofilm improves its transmission, virulence, and antibiotic resistance. The appearance of multiresistant microorganisms has led to the exploration of new antimicrobial agents, such as silver nanoparticles (AgNPs). However, little is known about the metabolic changes exerted by exposure to AgNPs on both lifeforms. This study examines the metabolomic profile of the response of *V. cholerae* biofilm and planktonic cells to a range of sublethal concentrations of AgNPs by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS2). A total of 619 metabolites were quantified in the experimental groups. More metabolome perturbation in planktonic than in biofilm cells was found. Significantly more metabolites were modulated in planktonic cells (n=71) compared to biofilm (n=37). Only three out of 105 perturbed metabolites were shared between planktonic cells and biofilms suggesting metabolic alterations unique to each life form caused by the nanoparticles. Chemical class profiles were differed between planktonic cells and biofilms, indicative of a phenotype-dependent metabolic response to nanoparticles. Chemical enrichment analysis showed altered amounts of oxidized fatty acids (FAs), saturated fatty acids, phosphatidic acids, and saturated stearic acid in AgNPs-treated planktonic cells, suggesting possible membrane recomposition. In contrast, no chemical classes were enriched in the biofilm. In conclusion, this study shows that the response of *V. cholerae* to silver nanoparticles depends on the phenotype and that planktonic cells undergo a possibly lipid recomposition process, possibly related to an adaptive mechanism involving the cell membrane.

Keywords: *Vibrio cholera*; planktonic cells; biofilm; silver nanoparticles; tandem mass spectrometry (MS2); metabolic perturbation

Dedicatoria

A mi hija Helena Catalina, quien llegó en medio de este proyecto y se convirtió en mi motor y razón para concluirlo. Mi pequeño gran eslabón

Agradecimientos

Agradezco a CONACYT por su apoyo al brindarme una beca de posgrado, y el financiamiento CONACyT No. 284385 y No. 300437. También agradezco al Centro de Investigación Científico y de Educación Superior de Baja California (CICESE), a nuestro director el Dr. David Covarrubias y al posgrado en Ciencias de la Vida así como al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM.

Agradezco el apoyo, enseñanza, tiempo y paciencia de mi tutor el Dr. Alejandro Huerta Saquero, con quien por ya más de 10 años he compartido y desarrollado proyectos logrando el nivel académico que tengo hoy día, gracias por ser parte de mi desarrollo profesional y personal. A mis sinodales los doctores Aldo Moreno, Ana Lucía Gallego y Sharon Herzka quienes fueron un pilar clave en el desarrollo de mis proyectos y quienes siempre estuvieron presentes como asesores y guías en este proyecto, muchas gracias por su tiempo y retroalimentación.

Agradezco también el apoyo recibido Yahaira Sidón e Iván Castillo, siempre al pendiente y disposición de nuestro bienestar físico y mental, agradecer y felicitar a CICESE por preocuparse por nosotros y activamente brindarnos herramientas para lograr nuestros proyectos. Agradecer también el apoyo brindado por todos los integrantes de Dirección de Estudios de Posgrado, Pedro, Dolores, Elizabeth, Citlalli, Norma Alicia, Álvaro, Ruth; y a nuestra súper Adriana Mejía. A biblioteca, a nuestra querida Eli y a Nadua, por su gran compromiso en que todo sea perfecto. Agradezco también a la estancia infantil de CICESE con especial cariño a la profe Aby y a Marcela.

A mis compañeros, quienes en estos más de 4 años han sido muchos y todos muy valiosos, a todos los MS2-team en especial a mi colega Rommel. A mis alumnos y compañeros del Team-Huerta. Compañeros y amigos de Bionano, en especial a Ita quien siempre fue y es nuestro apoyo, a todos los investigadores de bioano por su retroalimentación, a las Doctoras Ana, Canchan, los doctores Rafael Andrés y Rubén; Gracias. A todos mis profesores de posgrado y a aquellos con los que tuve la oportunidad de colaborar.

A mi familia, mi esposo Israel, mi hija Helena, a mis padres, mi suegra, mi hermana y mi tía Rorra, gracias por su comprensión, empatía y apoyo siempre. Agradezco a mis amigos quienes en la distancia siempre me acompañaron, Felipe, Yasmin, Dianita y Ahui. A los amigos que son familia, mis compadres Héctor y Yahaira, Estrella, Filemón y Judith. A las amigas de reciente adquisición mis Martas, Sam y Nixia. Y a la Dra. Claudia Vega y a mis hermanas de MAPLE, pilar clave en la conclusión de este proyecto.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Vibrio cholerae.....	2
1.1.1.1 Impacto médico/económico, transmisión y patogénesis.....	2
1.1.1.2 El papel de las biopelículas en la transmisión y patogénesis de <i>Vibrio</i>	3
1.1.1.3 Multiresistencia a antibióticos.....	3
1.1.2 La actividad antimicrobiana de los nanomateriales.....	4
1.1.2.1 Biopelículas y Nanopartículas de plata.....	4
1.1.2.2 Estudio preliminar.....	5
1.2 Justificación.....	8
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	9
Capítulo 2. Metodología.....	10
2.1 Síntesis y caracterización de AgNPs.....	10

2.1.1	Método de síntesis y caracterización.....	10
2.2	Evaluación del efecto antimicrobiano de AgNPs	11
2.2.1	Condiciones de crecimiento.....	11
2.2.2	Análisis antimicrobiano de células planctónicas.....	11
2.2.3	Análisis antimicrobiano de biopelículas.....	12
2.3	Extracción, purificación y cuantificación de metabolitos intracelulares de cultivos planctónicos y biopelículas de <i>V. cholerae</i> tras tratamiento con AgNPs.....	13
2.3.1	Estandarización de los tiempos de exposición y dosis subletal para la evaluación cultivos planctónicos y biopelículas expuestos a AgNPs.....	13
2.3.2	Obtención y purificación de metabolitos.....	13
2.3.3	Extracción de metabolitos.....	14
2.3.4	Adquisición de datos.....	14
2.3.5	Procesamiento y análisis de datos de LC-MS2.....	15
2.4	Disponibilidad de datos.....	16
2.4.1	Análisis estadístico de metabolómica.....	16
Capítulo 3. Resultados		17
3.1	Caracterización de AgNPs	17
3.2	Actividad antimicrobiana de AgNPs en células planctónicas y biopelículas.....	18
3.3	Perfil metabolómico de células planctónicas y biopelículas de <i>V. cholerae</i> ante AgNPs	20
Capítulo 4. Discusión.....		27
Capítulo 5. Conclusiones		32
Literatura citada.....		33
Anexos.....		41

Lista de figuras

Figura

Página

- Figura 1.** Expresión relativa de genes involucrados en la formación de biopelícula superficial y biopelícula adherida a la superficie expuestos a los nanocompuestos. a) biopelícula superficial y b) biopelícula unida a la superficie tratados con 1 μg / ml de ZEOAgNPs (gris), 420 μg / ml de ZEO-CuNPs (verde) y ZEO-ZnNPs (amarillo). En la figura c) y d) se muestran las morfologías de las biopelículas en cultivo líquido. Se muestran los valores de la media (n = 3). La expresión basal = 1 (línea horizontal). Valor de p <0,05 como * y <0,01 como **.5
- Figura 2.** Abundancia relativa de las proteínas de la membrana externa en biopelícula superficial (a-b) y biopelícula adherida a la superficie (c-d) expuestos a nanocompuestos. a y c) GEL-SDS: fracción de membrana externa expuestas a ZEO, ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. Las OMPs están indicadas por flechas. b y d) Abundancia relativa de las porinas tratadas con 1 μg / ml de ZEO-AgNPs (gris), 420 μg / ml de ZEO-CuNPs (verde) y ZEO-ZnNPs (amarillo). El análisis densitométrico de los geles SDS se realizaron con el software ImageJ. Se muestran los valores de la media (n = 3). Los cambios significativos están marcados con asteriscos. valor de p <0,05 como * y <0,01 como **.7
- Figura 3.** Estimación del número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), en donde n es el promedio del número de colonias contadas por placa. 11
- Figura 4.** Caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs). a) Microscopía electrónica de transmisión de AgNPs, la barra representa 50 nm; en el inserto se muestra la distribución de tamaños de las AgNPs. B) Perfil UV-Vis de AgNPs y AgNO_3 17
- Figura 5.** Análisis de dispersión de luz dinámica de AgNPs sintetizadas. (a) Distribución de tamaño por radio hidrodinámico (nm) de las AgNPs. (b) Potencial zeta para caracterizar la estabilidad AgNPs por análisis de repulsión/atracción de carga. 18
- Figura 6.** Cálculos de la concentración de AgNPs de la síntesis. (a) Fórmula para calcular el peso porcentual. (b) Estimación del peso porcentual de AgNPs en la síntesis. 18
- Figura 7.** Actividad antimicrobiana de las AgNPs en células planctónicas y biopelículas. Se muestra la concentración mínima bactericida (CMB) de y concentración mínima bactericida de biopelícula (CMBB) por estampado (a-b), ensayo MTT (c-d), turbidez (e-f). Tres réplicas biológicas (cada una con tres réplicas técnicas). *V. cholerae* sin tratamiento (Ctrl Vc); medio *Lysogeny Broth* (LB) como control sin contaminación bacteriana; MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). 19
- Figura 8.** Visualización experimental de los ensayos de MTT. (a) Células planctónicas y (b) Biopelícula tratada con diferentes concentraciones de AgNPs. 20
- Figura 9.** Análisis quimiinformáticos y metabolómicos no dirigidos basados en espectrometría de masas de células planctónicas (PL) y biopelículas (BP) de *V. cholerae* expuestas a AgNPs. (a) Análisis de componentes principales (PCA) utilizando los picos alineados y filtrados entre los grupos (datos transformados logarítmicamente sin escalar). Las áreas sombreadas indican intervalos de confianza del 95%. Gráfica de volcán (Volcano-plot) de los picos cuantificados en (b) biopelícula (BP-AgNPs/BP-Ctrl) y (d) planctónica (PL-AgNPs/PL-Ctrl) de *V. cholerae* expuesta a AgNPs. Los puntos azules indican picos significativamente moduladas por el tratamiento con

AgNPs según los criterios de razón de cambio y valor-p (prueba de Limma). (c) Patrón superpuesto (Up-Set Plot) de metabolitos desregulados por AgNPs en condiciones en las que los puntos interconectados entre los grupos indican que se compartieron 3 de los 105 picos de metabolitos perturbados..... 22

Figura 10. Metabolitos anotados a nivel de clase química alterados por AgNPs en células planctónicas (PL) y biopelículas (BP). Los grupos horizontales se establecen en función de la forma de vida PL o BP, cada una señalando la dirección de cambio (aumento/diminución de abundancia). Las barras horizontales de color gris oscuro muestran el número de metabolitos en cada grupo. Los puntos indican si los metabolitos se modifican exclusivamente en un grupo (punto simple) o en más de uno (puntos vinculados). Las barras verticales representan el número de metabolitos en cada conjunto individual o combinado y los colores representan la abundancia relativa de la clase química señalada en el listado. 23

Figura 11. Visualización de mapa de calor (*Heat map*) de los 50 metabolitos principales clasificados por la prueba ANOVA de los picos alineados entre condiciones con cuantificación reproducible. Las clases químicas se muestran en diferentes colores. A la derecha del mapa de calor, se muestran los valores de m/z de cada metabolito. Los datos se transformaron logarítmicamente sin escalar para los análisis de mapas de calor. El método de agrupamiento utilizado fue Ward, utilizando la distancia euclidiana como medida de distancia. (BP-AgNP: biopelícula expuesta a AgNPs; BP-Ctrl: control de biopelícula no expuesta; PL-AgNP: células planctónicas expuestas a AgNPs; PL-Ctrl: control de células planctónicas no expuestas; QC: control de calidad. 24

Figura 12. Análisis de enriquecimiento químico de los metabolitos desregulados en células planctónicas por AgNPs. Cada nodo representa un grupo de metabolitos significativamente perturbado. Los tamaños de los nodos reflejan el número total de compuestos que pertenecen a la clase química. La escala de color del nodo muestra la proporción de compuestos aumentados (rojo) o disminuidos (azul) para cada grupo. Diferentes tonos de púrpura reflejan la proporción de metabolitos aumentados y disminuidos. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov..... 25

Figura 13. Modelo de recomposición de membrana en células planctónicas de *V. cholerae* tratadas con dosis subletal de AgNPs. Se muestra la composición de la membrana celular control (fosfolípidos uniformes en color morado) y la propuesta del cambio de composición (fosfolípidos en colores distintos señalando los posibles cambios) tras el efecto dosis subletales de las AgNPs (Esferas plateadas)..... 31

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Descripción de los softwares y páginas web	43
Tabla 2. Descripción del análisis estadístico	44

Capítulo 1. Introducción

Vibrio cholerae es el agente etiológico del cólera, una infección diarreica aguda causada por la ingesta de agua y alimentos contaminados (Clemens et al., 2017; Fanous and King, 2021; World Health Organization, 2022). *V. cholerae* es un habitante natural de ambientes acuáticos en donde se asocia a fitoplancton, zooplancton, crustáceos, bivalvos y sedimentos; también usa al humano como hospedero, dispersándose en el intestino y causando la enfermedad del cólera (Harris et al., 2012). Tanto en el ambiente como en el hospedero humano, *V. cholerae* modula su expresión génica en respuesta a cambios ambientales o situaciones de estrés, generando estrategias de supervivencia como alteraciones al control de la motilidad flagelar característica de las células planctónicas de vida libre, o bien desarrollando comunidades sésiles multicelulares llamadas biopelículas (Teschler et al., 2015). La formación de biopelículas mejora el crecimiento y la persistencia de las especies de *Vibrio* en ecosistemas acuáticos, y también aumenta su resistencia a antibióticos (Das et al., 2020; Davies, 2003; Lee Ventola, 2015; Mah and Toole, 2001; Olsen, 2015). Por otro lado, *V. cholerae* infecta al ser humano, y se ha reportado que las biopelículas desempeñan un papel importante en el proceso de la enfermedad, siendo más infecciosas que las células planctónicas (Gallego-Hernández et al., 2020). En el área clínica, las biopelículas son de gran preocupación debido a su resistencia intrínseca a los antibióticos convencionales, y se estima que aproximadamente el 80% de las infecciones crónicas y recurrentes en los humanos es causada por biopelículas (Das et al., 2020; Gallego-Hernández et al., 2020; Sharma et al., 2019; Teschler et al., 2015).

Actualmente, la tasa de resistencia en bacterias patógenas como *V. cholerae* supera la del desarrollo de nuevos antibióticos (Lee Ventola, 2015; Li et al., 2020; Mlynarcik and Kolar, 2019). Por lo tanto, encontrar nuevas sustancias con propiedades antimicrobianas como las nanopartículas (NPs) metálicas podría ser una alternativa efectiva. La actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata (AgNPs) ha sido ampliamente documentada y las AgNPs se encuentran entre los nanomateriales más comercializados en el cuidado de la salud (Cheeseman et al., 2020; Jaime-Acuña et al., 2016; Kailasa et al., 2019; Martinez-Gutierrez et al., 2013; Slavin et al., 2017; Tang and Zheng, 2018; Vazquez-Muñoz, Meza-Villezcás, et al., 2019). En estudios previos sobre los efectos de las AgNPs en *Vibrio cholerae*, se evaluó el efecto de AgNPs incrustadas en nanocompuestos de zeolita sobre células planctónicas y en dos estados de biopelícula, la biopelícula superficial (BS) que se forma entre la interfaz aire-líquido, y biopelícula adherida a la superficie (B), desarrollada en la interfaz sólido-líquido del cultivo. El nanocompuesto ZEO-AgNPs inhibió la formación de biopelícula superficial, evitó la formación de biopelícula adherida a la superficie y eliminó las

células planctónicas (Meza-Villezcas et al., 2019). A nivel transcripcional, las ZEO-AgNPs no modificaron los genes implicados en la formación de biopelículas (*vpsL*, *rbmA* y *bap1*). Además, la abundancia relativa de las proteínas de membrana externa (OMP) OmpA y OmpW fue diferente entre BP y B. Dicha investigación nos llevó a concluir que estudiar las diferencias en la respuesta metabólica y los mecanismos moleculares entre las células planctónicas y la biopelícula en *V. cholerae* nos brindará un mayor entendimiento sobre el mecanismo de acción de las AgNPs. Sin embargo, aún falta información sobre los mecanismos celulares que regulan los microorganismos y la abundancia de sus metabolitos en respuesta al efecto de AgNPs. En este sentido, la metabolómica –ciencia que estudia a gran escala los metabolitos en un sistema biológico– nos brinda un enfoque para estudiar toda la red del metabolismo celular en un tiempo y una condición específica (Bertini et al., 2014; Dayalan et al., 2018). La investigación molecular sobre el metabolismo bacteriano en respuesta a las AgNPs puede contribuir al entendimiento de la generación de resistencia, y con ello, al desarrollo de nuevos materiales antimicrobianos para prevenir o tratar infecciones crónicas resistentes. En este proyecto buscamos describir desde una perspectiva metabólica la respuesta de los fenotipos planctónico y biopelícula de *V. cholerae* ante concentraciones subletales de AgNPs.

1.1 Antecedentes

1.1.1 *Vibrio cholerae*

1.1.1.1 Impacto médico/económico, transmisión y patogénesis.

V. cholerae es considerada en la actualidad un microorganismo de importancia clínica debido a que ocurre en 1-4 millones de personas anualmente y se registran 21 000 a 143 000 casos fatales (Clemens et al., 2017; Fanous and King, 2021; World Health Organization, 2022). Es una bacteria persistente y de impacto pandémico (World Health Organization, 2022). Países en vías de desarrollo o regiones que han experimentado desastres naturales son particularmente vulnerables a brotes de cólera. Su incidencia se vincula principalmente al consumo de agua y alimentos contaminados (Fanous and King, 2021; Harris et al., 2012). La ingesta de este microorganismo causa infección intestinal aguda, la cual se caracteriza por una diarrea acuosa aguda de aparición súbita. Sin el tratamiento adecuado, la pérdida de agua conduce a choque hipovolémico, acidosis y la muerte. Durante la infección, *V. cholerae* produce factores de virulencia

que promueven la colonización del intestino delgado (Gallego-Hernández et al., 2020). Los principales factores de virulencia asociados a la infección son la excreción de toxinas como la toxina del cólera y la toxina co-regulada del pilus, la formación de biopelículas mediante la excreción de lipopolisacáridos (LPS) y Vibrio-polisacáridos (VPS), así como la expresión de porinas de membrana externa (OMP's), entre otros (Almagro-Moreno et al., 2015; Faruque et al., 2006)

1.1.1.2 El papel de las biopelículas en la transmisión y patogénesis de *Vibrio*.

Una biopelícula es una asociación microbiana consolidada por la excreción de matriz extracelular la cual le permite a las células adherirse fuertemente a superficies, brinda protección contra cambios ambientales, protege a las bacterias e incrementa su tolerancia a antibióticos y desinfectantes (Bjarnsholt, 2013; Yildiz and Visick, 2010). La formación de biopelículas incrementa la sobrevivencia y persistencia de *Vibrio* en ambientes acuáticos y juega un papel importante en la virulencia y el proceso infeccioso en humanos (Alam et al., 2006; Huq et al., 2005). Se ha demostrado que las biopelículas de *V. cholerae* presentan una capacidad infecciosa significativamente mayor que la de las células planctónicas (Faruque et al., 2006; Gallego-Hernandez et al., 2020). Estudios con mutantes de *V. cholerae* incapaces de formar biopelículas demuestran que las células pierden la capacidad de colonizar el intestino, lo que resulta en el decremento de su virulencia y por consiguiente no se desarrolla la enfermedad del cólera (Fong et al., 2010; L. Wang et al., 2013).

1.1.1.3 Multiresistencia a antibióticos.

Las enfermedades infecciosas representan una proporción significativa de los recursos públicos y privados en el sector de la salud (World Health Organization, 2015). Agentes antimicrobianos, como los antibióticos, son utilizados para tratar las infecciones causadas por microorganismos y son considerados como la única alternativa para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, su utilización excesiva y errónea se ha vinculado a la aparición y propagación de bacterias multiresistentes a antibióticos (Jung and Jik, 2011; Taubes, 2008; Taylor et al., 2002). La adquisición de resistencia constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial, pues reduce la eficacia de los tratamientos e incrementa el riesgo de propagación de microorganismos patógenos. A pesar de la investigación científica relacionada con el desarrollo de nuevos antibióticos o modificación química de los ya existentes, no hay seguridad de que se puedan seguir generando nuevos antibióticos a la tasa requerida, debido a la alta tasa evolutiva de los

organismos que confiere un alto potencial de adaptación por medio del desarrollo de mecanismos de resistencia (Jung and Jik, 2011; Taubes, 2008; Taylor et al., 2002).

1.1.2 *La actividad antimicrobiana de los nanomateriales.*

Los nanomateriales son estructuras que tienen tamaños de entre 1 y 100 nanómetros (nm) (Buzea et. al., 2007; Re et. al., 2012). El tamaño, forma y composición de los nanomateriales determinan el tipo de interacción con los sistemas biológicos (Mohanraj & Chen, 2006). En el área biomédica, los nanomateriales más comúnmente empleados son las nanopartículas (NPs), los liposomas y los sistemas de administración de fármacos. Debido a su actividad antimicrobiana y la posibilidad de superar los mecanismos de resistencia microbiana, las NPs se proponen como una posible alternativa para el tratamiento de infecciones microbianas (Allaker et. al., 2000; Baker et. al., 2005).

1.1.2.1 Biopelículas y Nanopartículas de plata

Se ha demostrado que la formación de biopelículas aumenta la tolerancia de las bacterias a altas concentraciones de diversos antibióticos, resultando en infecciones crónicas a pesar del tratamiento. Las bacterias que forman biopelículas son hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las planctónicas (Pelgrift & Friedman, 2013; Choi et. al., 2010). Se ha documentado que la formación de biopelículas confiere protección contra el efecto tóxico de NPs de Cu, Pb, Zn y Ag en *P. aeruginosa* (Bjarnsholt et. al., 2007; Teitzel et. al., 2003). También se ha evaluado el efecto de NPs en la formación de biopelículas de diferentes bacterias patógenas como *E. faecium*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans* y *P. proteamaculans* (Hwang et. al., 2012; Radzig et. al., 2013).

Un estudio demostró que que las NPs de Ag y Zn tienen un efecto antimicrobiano sobre *V. cholerae* y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), pues su administración oral impide la colonización de *V. cholerae* y de ETEC en un modelo de ratón lactante (Salem et. al., 2015). También, se ha demostrado un efecto antibacteriano sinérgico ejercido por la combinación de AgNPs y antibióticos, lo que abre la posibilidad de nuevos tratamientos terapéuticos contra las enfermedades infecciosas (Smekalova et al., 2016; Vazquez-Muñoz et al 2017).

1.1.2.2 Estudio preliminar.

Se evaluó el efecto de nanocompuestos de mordenita dopados con NPs metálicas, denominados ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs, sobre cultivos planctónicos y en los dos estados de biopelícula de *V. cholerae*. El nanocompuesto ZEO-AgNPs inhibió la formación de la biopelícula superficial a 4 $\mu\text{g/ml}$, y evitó la formación de la biopelícula adherida y eliminó las células planctónicas a 8 $\mu\text{g/ml}$. En contraste, no fue posible encontrar concentraciones letales de los nanocompuestos ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs en ninguna forma de vida de *V. cholerae* (concentración máxima 420 $\mu\text{g/ml}$). Imágenes de microscopía electrónica de barrido no mostraron daño aparente en la estructura celular de la biopelícula superficial y la biopelícula adherida. Las células planctónicas mostraron modificaciones de la arquitectura celular. A nivel transcripcional, la exposición de ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs generó cambios en la expresión relativa de los genes *vpsR*, *vpsL*, *rbmA* y *bap1*, todos ellos involucrados en la formación de biopelículas (Figura 1). Específicamente, en la biopelícula superficial se registró un aumento significativo en la expresión de *vpsL* durante el tratamiento con ZEO-CuNPs.

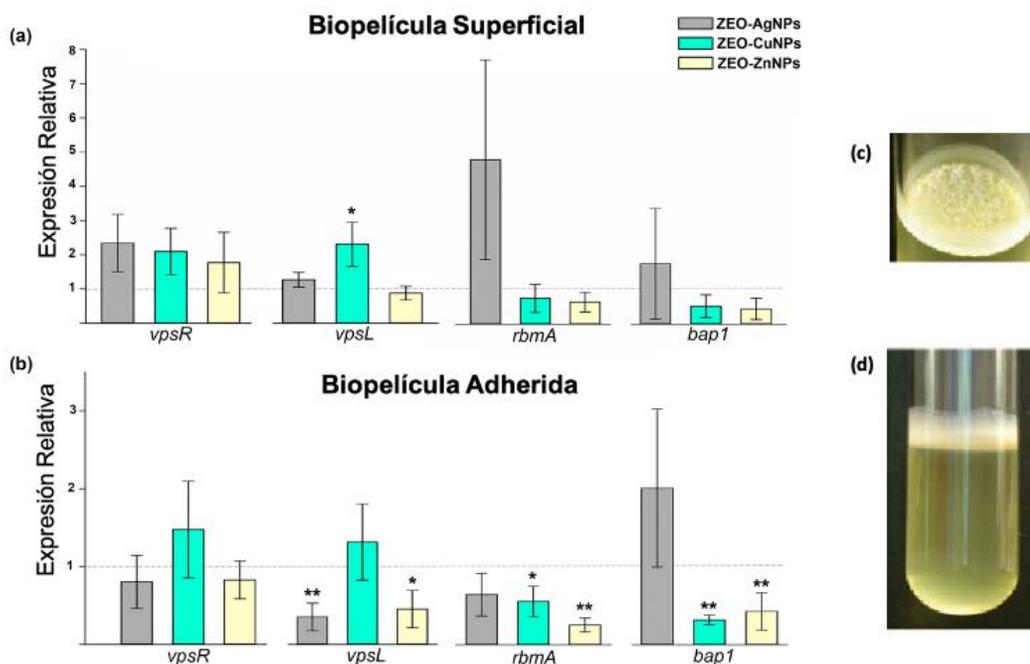


Figura 1. Expresión relativa de genes involucrados en la formación de biopelícula superficial y biopelícula adherida a la superficie expuestos a los nanocompuestos. a) biopelícula superficial y b) biopelícula unida a la superficie tratados con 1 $\mu\text{g/ml}$ de ZEOAgNPs (gris), 420 $\mu\text{g/ml}$ de ZEO-CuNPs (verde) y ZEO-ZnNPs (amarillo). En la figura c) y d) se muestran las morfologías de las biopelículas en cultivo líquido. Se muestran los valores de la media (n = 3). La expresión basal = 1 (línea horizontal). Valor de $p < 0,05$ como * y $p < 0,01$ como **.

Uno de los principales mecanismos de acción de las NPs contra bacterias Gram-negativas es provocar cambios en la integridad de la membrana, por lo que también nos interesó explorar el papel de las proteínas de la membrana externa (OMPs) como sistemas de desintoxicación bacteriana para expulsar o evitar la entrada de los nanocompuestos con efectos tóxicos. Nuestros resultados muestran primeramente que el perfil de OMPs entre biopelícula superficial y la biopelícula adherida expuestas a ZEO (matriz de mordenita sin NPs, usada como control) varía en la abundancia relativa de OmpT, OmpC y OmpA (primera línea, Fig. 2 a y c, respectivamente). Específicamente, ZEO-CuNP regula a la baja tres de las OMPs OmpT, OmpU y OmpW en la biopelícula adherida mientras que ZEO-ZnNPs solo afecta la expresión de la OmpT en la biopelícula superficial. Es importante notar que OmpC, no cambia su expresión con ningún tratamiento ni en cualquier condición (Figura 2 b y d). Cabe mencionar que se ha demostrado que existe una coregulación de los factores de virulencia, incluidas las OMPs y la formación de biopelículas, por lo que es importante determinar la asociación entre OMPs, biopelículas y virulencia en *V. cholerae* en presencia de NPs metálicas.

Un análisis comparativo entre *E. coli*, *S. enterica Typhimurium*, *S. aureus* y *B. subtilis* tratadas con concentraciones subletales de AgNPs muestra que, las AgNPs despolarizan la membrana celular y que esto se asocia al aumento de la permeabilidad celular (Morones et al., n.d.; Ruben et al., 2013; Vázquez-Muñoz et al., 2019). Complementariamente, un análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión muestra que las AgNPs perturban a la pared celular (Ramalingam et al., 2016; Vázquez-Muñoz et al., 2019). Reportes específicos en *V. cholerae* señalan que 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 ADN (Gahlawat et al., 2016; Salem et al., 2015; Sarwar et al., 2016).

Todo lo anterior sugiere que las bacterias como *V. cholerae* expuestas a diferentes nanomateriales con actividad antimicrobiana responden a diferentes niveles para mantener una homeostasis celular y con ella sobrevivir al efecto tóxico de los nanomateriales. Dichas respuestas van desde modificaciones en la expresión genética de productos relacionados a la resistencia a metales, respuesta SOS, y al incremento en la actividad de porinas, entre otros. Es lógico predecir que, además de los cambios observados a nivel de expresión genética y niveles de proteínas, también se pueden observar cambios en el perfil metabólico de las bacterias, parte central del interés de este estudio.

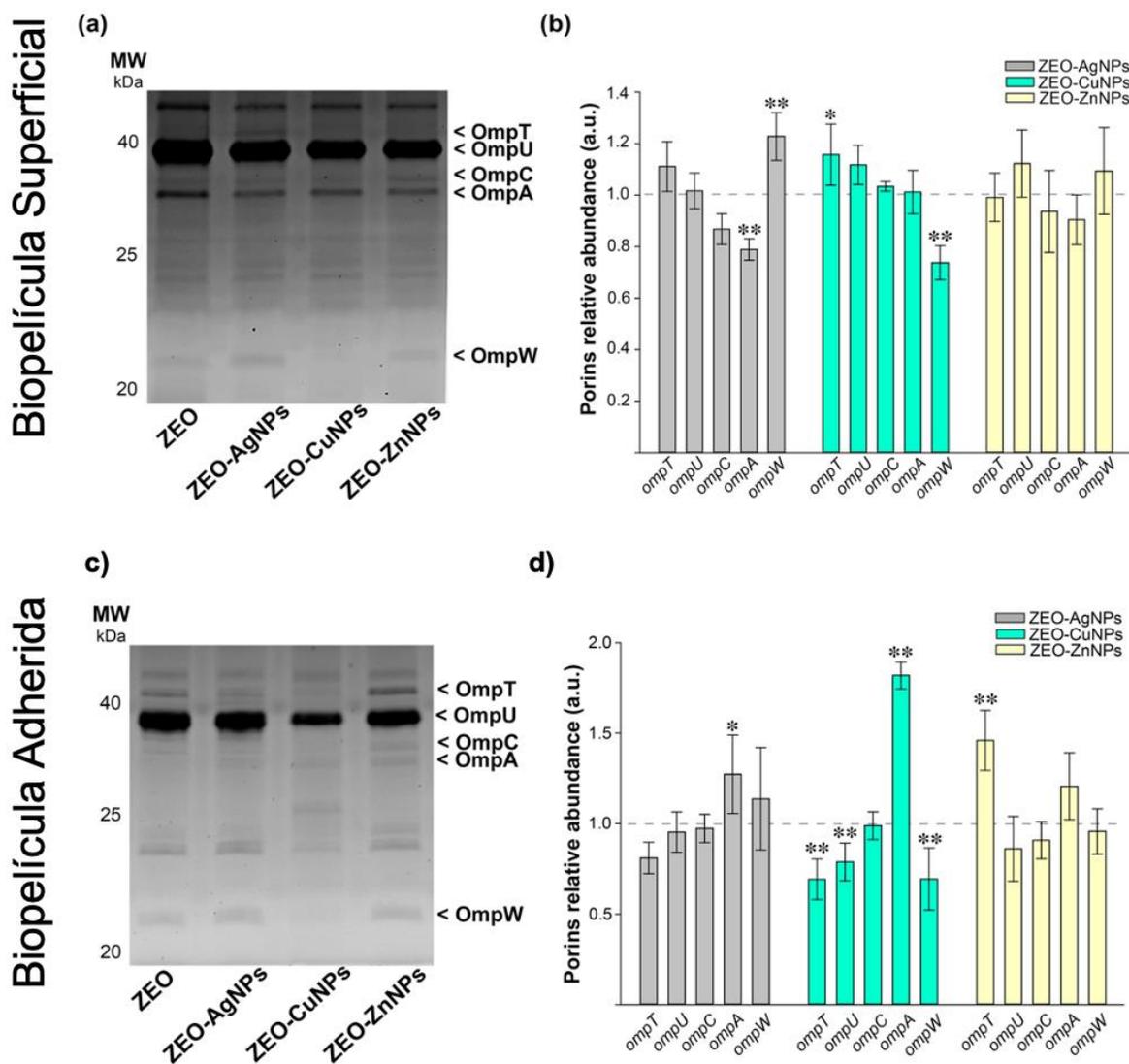


Figura 2. Abundancia relativa de las proteínas de la membrana externa en biopelícula superficial (a-b) y biopelícula adherida a la superficie (c-d) expuestas a nanocompuestos. a y c) GEL-SDS: fracción de membrana externa expuestas a ZEO, ZEO-AgNPs, ZEO-CuNPs y ZEO-ZnNPs. Las OMPs están indicadas por flechas. b y d) Abundancia relativa de las porinas tratadas con 1 µg / ml de ZEO-AgNPs (gris), 420 µg / ml de ZEO-CuNPs (verde) y ZEO-ZnNPs (amarillo). El análisis densitométrico de los geles SDS se realizaron con el software ImageJ. Se muestran los valores de la media (n = 3). Los cambios significativos están marcados con asteriscos. valor de p <0,05 como * y <0,01 como **.

En este sentido, la metabolómica nos permite estudiar las respuestas del metabolismo microbiano a los estímulos externos, lo que proporciona información sobre las respuestas celulares específicas bajo diferentes condiciones (Bertini et al., 2014; Dayalan et al., 2018; Jiménez-Gómez et al., 2022). Como ejemplo, un estudio de metabolómica basada en resonancia magnética nuclear (RMN) en variantes de *P. fluorescens* que sobre-producen biopelículas reveló cambios en la producción de aminoácidos y ciertos

metabolitos a través de la ruta del glutatión, por lo cual se infiere que desempeñan un papel en la homeostasis involucrando los sistemas redox y de resistencia a metales; dependiendo de la morfología de la colonia de la variante, la biopelícula responde de manera diferente para soportar el estrés ambiental provocado por las nanopartículas metálicas (Workentine et al., 2010). Otro estudio metabolómico combinando GC-MS y H NMR en *P. fluorescens* bajo estrés de iones de cobre mostró perfiles metabólicos significativamente diferentes entre las células planctónicas y los fenotipos de biopelículas (Booth et al., 2011). Las células planctónicas experimentaron estrés oxidativo y cambios en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la glucólisis, el metabolismo del piruvato, el nicotinato y la nicotinamida. Al mismo tiempo, la respuesta de la biopelícula estuvo dominada por cambios en el metabolismo relacionado con los exopolisacáridos, lo que sugiere respuestas dependientes del fenotipo a los tratamientos externos con metales.

En esta sección se profundiza en el conocimiento acerca del tema y la relación con el trabajo de investigación. Es una descripción apoyada por la literatura citada. Sin tratar de resumir todo lo que se conoce del tema, ni de demostrar que se conoce toda la literatura. Hay que limitarse al tema específico del trabajo de investigación y a las contribuciones que se consideren más relevantes.

1.2 Justificación

V. cholerae es un microorganismo de importancia clínica y económica. Se ha descrito que tiene la capacidad de mantener su integridad celular ante nanomateriales. Por lo que, estudiar los cambios metabólicos causados por concentraciones subletales de AgNPs en *V. cholerae* nos permitirá proponer a partir de sus cambios metabólicos posibles mecanismos de respuesta, adaptación o resistencia.

Por otro lado, el estudio comparativo de ambas formas de vida, células planctónicas y biopelículas, permitirá entender los posibles mecanismos intrínsecos que posee cada forma de vida y cómo estos podrían ser utilizados como mecanismos de defensa.

En este trabajo, perfilamos las respuestas metabólicas de células de *V. cholerae* planctónicas y en biopelículas ante la presencia de concentraciones subletales de AgNPs utilizando metabolómica no dirigida basada en espectrometría de masas y quimiinformática integral.

1.3 Hipótesis

V. cholerae en sus dos formas de vida, planctónica y biopelícula, modificarán su perfil metabólico ante la actividad antimicrobiana de AgNPs. Estos cambios en los perfiles metabólicos serán específicos para cada estilo de vida.

1.4 Objetivos

1.4.1 *Objetivo general*

Realizar un estudio comparativo de la respuesta metabólica de células planctónicas y células formadoras de biopelícula de *V. cholerae* expuestas a AgNPs.

1.4.2 *Objetivos específicos*

- Realizar la síntesis y caracterización de AgNPs con actividad antimicrobiana.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de AgNPs en cultivos planctónicos y la biopelícula (CMBB)
- Realizar un análisis comparativo del perfil metabólico global de *V. cholerae* en presencia y ausencia de concentraciones subletales de AgNPs por medio de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en sus dos formas de vida, células planctónicas y células formadoras de biopelícula.
- Proponer un modelo de respuesta global de *V. cholerae* ante la presencia de nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis y caracterización de AgNPs

2.1.1 Método de síntesis y caracterización.

Las AgNPs se sintetizaron siguiendo la metodología descrita por Vázquez-Muñoz con modificaciones (Vazquez-Muñoz et al., 2019a). Brevemente, 30 ml de una solución de AgNO_3 15 mM se calentó a 70 ± 5 °C en una placa térmica con agitación. Se añadieron 5 mL de polivinilpirrolidona (PVP) 30 mM a la solución de AgNO_3 (mantenida bajo agitación vigorosa).

Se agregó por goteo 300 μL de NaBH_4 4 mM hasta que se tornó de color marrón. La suspensión se agitó vigorosamente durante 10 min más a 70 ± 5 °C. La suspensión de AgNPs se transfirió a un tubo de plástico protegido de la luz, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C.

La síntesis se dializó durante 4 h (en membranas con un cutoff de 2K - MWCOs) a 4 °C en agitación continua para eliminar el AgNO_3 restante. Finalmente, la síntesis fue liofilizada para preservar su estabilidad y almacenamiento a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Se caracterizó por espectrofotometría UV-Vis (Multiscan GO, Thermo Scientific); el radio hidrodinámico y el potencial Z se determinaron por análisis de dispersión de luz dinámica (DSL) (Zetasizer NanoSeries, Malvern). Los análisis se realizaron al final de la síntesis, después de la diálisis y liofilización, y antes de cada tratamiento para corroborar la estabilidad de las AgNPs.

La concentración de plata de la síntesis se calculó teóricamente y se confirmó mediante un análisis químico global realizado mediante espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES, Variant Liberty 110 Spectrometer). La forma y el tamaño se visualizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM Hitachi H7500).

2.2 Evaluación del efecto antimicrobiano de AgNPs

2.2.1 Condiciones de crecimiento.

La cepa *V. cholerae* O1 biotipo El Tor A1552 variante lisa y resistente a rifampicina utilizada en esta investigación fue donada por 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 caldo lisogénico (LBA) (caldo: 1% triptona, 1% cloruro sódico, 0,5% extracto de levadura; placas de agar: 2% agar bacteriológico añadido, ajustado a pH 7,5), adicionadas con 100 µg/ml de rifampicina (LBA-Rif) e incubadas durante la noche a 30°C. Para el preinóculo se cultivaron cinco colonias de *V. cholerae* en 5 ml de caldo lisogénico (LB) (caldo: 1% triptona, 1% cloruro sódico, 0,5% extracto de levadura; ajustado a pH 7,5), durante la noche a 30 °C y 200 rpm. Todos los tratamientos se realizaron con un inóculo bacteriano inicial de 1×10^4 UFC preparado a partir del preinóculo (el inóculo inicial se confirmó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias, UFC, Figura 3). Los experimentos se realizaron por triplicado (3 réplicas técnicas por tres réplicas biológicas). Los datos fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($p = 0.05$) seguido de un análisis post hoc de Dunnett's (método de múltiples comparaciones contra el control). Las diferencias se consideraron significativas $p < 0.001$, o muy significativa $p \leq 0.001$. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism versión 8.4.0 (455) para IOS, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

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

Figura 3. Estimación del número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml), en donde n es el promedio del número de colonias contadas por placa.

2.2.2 Análisis antimicrobiano de células planctónicas.

V. cholerae se cultivó sin nanopartículas y bajo diferentes concentraciones de AgNPs (de 9 µg/ml a 17.6 mg/ml) en una placa de 96 pozos de fondo plano con un volumen final de 200 µl por pocillo durante 24 h a 30 °C. Después del tratamiento, se tomó una muestra representativa de cada pocillo con un estampador

de 96 puntas esterilizado, se estampó una placa Petri de LBA y se incubó durante la noche a 30 °C. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), siendo ésta la concentración de los nanomateriales capaz de matar el 99,99 % de las bacterias inoculadas en condiciones estandarizadas. Complementariamente, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) midiendo el crecimiento bacteriano por espectrofotometría a 600 nm con los controles correspondientes, y se realizó el ensayo de MTT (por reducción del colorante de tetrazolio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro a formazán insoluble) para validar la viabilidad bacteriana por su actividad metabólica. Se seleccionó una concentración subletal para el análisis del metaboloma bajo el criterio de que la concentración de AgNPs causará modificaciones en las células a AgNPs sin matarlas tras 24 horas de tratamiento.

2.2.3 *Análisis antimicrobiano de biopelículas.*

Se inocularon 200 µl del inóculo inicial en una placa de 96 pozos de fondo plano y se incubaron durante 48 h a 30 °C en condiciones estáticas para promover la formación y maduración de la biopelícula. Después de la incubación, se descartó el cultivo planctónico y los pozos se enjuagaron cuidadosamente una vez con PBS 1X, dejando solo la biopelícula madura adherida al pozo. Se seleccionó un rango de concentraciones de AgNPs como tratamientos (137 µg/ml a 35,2 mg/ml), y se colocaron en placas de 96 pozos de fondo plano a un volumen final de 200 µl. A continuación, se incubó durante 24 h a 30 °C en condiciones estáticas para no perturbar la biopelícula. Después de 24 h de tratamiento, se tomó una muestra representativa de cada pocillo con un estampador de 96 puntas esterilizado, se estampó en una placa Petri de LBA y se incubó durante la noche a 37 °C.

La concentración mínima bactericida de biopelícula (CMBB), que es la concentración mínima de agente antimicrobiano requerido para matar el 99% de una biopelícula madura preformada. Complementariamente, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) midiendo el crecimiento bacteriano a 600 nm en un espectrofotómetro lector de placas con los controles correspondientes y un ensayo por MTT (por reducción del colorante de tetrazolio MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro a formazán insoluble) para validar la viabilidad bacteriana por su actividad metabólica.

Se seleccionó una concentración subletal para el análisis del metaboloma bajo el criterio de que la concentración causará modificaciones las células tratadas con AgNPs sin matarlas.

2.3 Extracción, purificación y cuantificación de metabolitos intracelulares de cultivos planctónicos y biopelículas de *V. cholerae* tras tratamiento con AgNPs

2.3.1 Estandarización de los tiempos de exposición y dosis subletal para la evaluación cultivos planctónicos y biopelículas expuestos a AgNPs.

Siguiendo el criterio descrito en la sección 2.2.2 y 2.2.3, los cultivos planctónicos y biopelículas fueron tratados con una concentración de 2.2 mg/ml y de 275 µg/ml, respectivamente, por 30 min para evaluar la respuesta metabólica ante dosis subletales de AgNPs. Para los cultivos planctónicos, a partir del precultivo se tomaron 125 µl y se inocularon en 25 ml de medio LB, se incubaron a 30 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 (longitud de onda de 600 nm), una vez alcanzada esta densidad óptica, 75 µl del cultivo previo se inoculó en 15 ml de medio LB, se incubaron a 30 °C a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Este cultivo homogéneo fue expuesto a 137 µg/ml de AgNPs por 30 min. Se formaron biopelículas en placas de 24 pozos con 2 ml de precultivo de *V. cholerae* a 0.6 DO, por 48 h a 30° C en condiciones estáticas. Una vez formada la biopelícula, se retiró el cultivo planctónico y se lavó 1 vez con LB estéril. Las biopelículas fueron expuestas a 2.2 mg/ml de AgNPs por 30 minutos. Tras 30 minutos de exposición se obtenía suficiente biomasa para la extracción de metabolitos, en tiempos prolongados el efecto antimicrobiano de las AgNPs reducía considerablemente la biomasa.

2.3.2 Obtención y purificación de metabolitos.

A partir de un precultivo, se cultivaron células de *V. cholerae* en modo planctónico o de biopelícula como se describe anteriormente para analizar el metaboloma. Para evaluar el metaboloma de las células planctónicas, se inocularon 50 ml de caldo LB con 125 µl de precultivo, se incubaron a 30 °C y se agitaron a 200 rpm. El crecimiento se monitoreó midiendo la absorbancia a 600 nm. Cuando el cultivo celular alcanzó una DO 600 nm de 0.3, se reinocularon 15 µl de células en volúmenes de cultivo de 15 ml de caldo LB y se incubaron a 30 °C y 200 rpm. Cuando el cultivo celular alcanzó una DO a 600 nm de 0.6 (considerando el cultivo homogenizado a la fase de crecimiento exponencial), se añadió la concentración subletal de 275 µg/ml de AgNPs (considerada como la mitad de la CMI) y se expuso durante 30 minutos a 30 °C. y 200 rpm. Los cultivos bacterianos tratados y el control se recolectaron y lavaron con PBS 1X tres

veces durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar el metaboloma de la biopelícula, se cultivaron 2 ml de *V. cholerae* en una placa de 24 pozos durante 48 h a 30 °C en condiciones estáticas para promover la formación y maduración de la biopelícula (Inóculo inicial a 1×10^4 UFC/ml). Luego, se eliminó el sobrenadante, se agregó una concentración subletal de 2.2 mg/ml de AgNPs y las células se incubaron durante 30 minutos a 30 °C. Después, las células se lavaron una vez con LB para eliminar el exceso de AgNPs y las células planctónicas suspendidas. La biopelícula se recuperó pipeteando hacia arriba/abajo para resuspenderla en 2 ml de PBS. Las biopelículas se recogieron y se lavaron 3x con PBS 1X.

2.3.3 Extracción de metabolitos.

Las muestras de los cultivos planctónicos y las biopelículas se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento bacteriano se resuspendió en PBS 1X. Cada cultivo se ajustó a 1.0 de absorbancia (600 nm) en 1 ml de volumen final de PBS en un tubo limpio para la siguiente extracción. Después de eso, las muestras se centrifugaron a $10\,000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, el sedimento se secó con un sistema SpeedVac y las muestras se almacenaron a -80 °C para su posterior procesamiento. Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente se extrajeron los metabolitos con 500 μ L de una mezcla de metanol:acetonitrilo:acetato de etilo en una proporción de 1:1:1 bajo sonicación durante 30 min a temperatura ambiente. Se mezclaron volúmenes iguales de todos los sobrenadantes libres de partículas en un tubo para preparar muestras de control de calidad (QC).

2.3.4 Adquisición de datos.

Los metabolitos se separaron (inyección de muestra de 2 μ L) utilizando un sistema Agilent nanoLC 1260 Infinity (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) y una columna rellena con ZORBAX 80 SB-C18 (75 μ m x 43 mm, 5 μ m C18 con una columna trampa o de enriquecimiento de 40 nL). Se utilizó agua y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 % como fases móviles A y B a un caudal de 300 nl/min y 2 μ L para las nanobombas (a columna de separación) y microbombas (a columna de enriquecimiento), respectivamente. El gradiente comenzó en 5 % B, aumentó linealmente hasta 40 % B en 20 min y aumentó linealmente hasta 100 % en 5 min, se mantuvo en 100 % B durante 5 min y volvió a 5 % B en 1 min y luego se mantuvo a 5% B durante 9 min antes de la siguiente muestra (para asegurar el reequilibrio de la columna). Para minimizar el posible arrastre, se analizaron dos muestras en blanco (3 μ L de las fases móviles A y B en una proporción de 95:5) entre inyecciones de muestras experimentales. El eluato de la columna se entregó a un espectrómetro de

masas Q-TOF de masa precisa 6530 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) a través de una interfaz HPLC-Chip Cube MS. Se empleó ionización por nanopulverización en modo positivo. Los datos de MS se adquirieron usando las siguientes condiciones: voltaje capilar, 1850 V; temperatura del gas, 350 °C; flujo de gas de secado, 5 L/min; voltaje del skimmer, 65 V; octapolo RF, 750 V; voltaje del fragmentador, 175 V; velocidad de adquisición de espectros, 4 espectros/s en un rango de masas de 110 a 2000 m/z. Las condiciones de los datos de MS2 fueron: ventana de aislamiento, estrecha (1,3 m/z); tasa de adquisición de espectros, 3 espectros/s; máximo de precursores por ciclo, 5 en un rango de masas de 50-2000 m/z. La opción de exclusión activa se habilitó, se configuró en 2 espectros y se liberó después de 0,25 min. La opción de energía de colisión en rampa (CE) se utilizó con valores de pendiente y desplazamiento de 6 y 4, respectivamente. El instrumento se calibró externamente antes de la adquisición de la muestra utilizando la solución de mezcla de sintonización de concentración de mezcla baja ESI-L (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) para garantizar una precisión de masa de <5 ppm para los datos de MS y MS2. El rendimiento del instrumento se controló durante la adquisición de datos mediante la inclusión de muestras de control de calidad por cada 3 muestras experimentales y la evaluación de las señales de las muestras en blanco. Las muestras se asignaron aleatoriamente para la adquisición de datos.

2.3.5 *Procesamiento y análisis de datos de LC-MS2.*

Analizamos los conjuntos de datos LC-MS2 utilizando un flujo de trabajo propuesto por Flores Núñez (Flores-Núñez et al., 2022) compuesto por paquetes de software de acceso abierto y plataformas en línea y siguiendo tres pasos principales:

1. Los cromatogramas se extrajeron y alinearon entre los conjuntos de datos utilizando MZmine versión 2.53 (Olivon et al., 2017).
2. Se realizaron análisis estadísticos univariados y multivariados y visualización de agrupamiento jerárquico utilizando NormalyzerDE (Willforss et al., 2019) y Metaboanalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2011), respectivamente.
3. La anotación o identificación automática de metabolitos a nivel de estructura (Clasificación de la Metabolomics Standards Initiative [MSI], nivel 2), se realizó utilizando la plataforma web Global Natural Products Social Molecular Networking (Aron et al., 2020; M. Wang et al., 2016) y herramientas *in-silico* (MolDiscovery, CSI: FingerID) (MSI, nivel 3) (Cao et al., 2021).

Las clases químicas de los metabolitos modulados ($FC > 1.5/1$ o $< 1/1.5$, valor $p < 0.05$) (MSI, nivel 3) fueron asignadas por la herramienta CANOPUS (Dührkop et al., 2021) integrada dentro del software SIRIUS versión 4.9.12 (Dührkop et al., 2019). Los metabolitos modulados significativamente, en ambas formas de vida, por el tratamiento con AgNPs se analizaron con el software ChemRICH (Barupal and Fiehn, 2017) para un análisis de enriquecimiento químico con el cual observar clases químicas significativamente alteradas utilizando la ontología MeSH. Adjunto encontrará el *pipe-line* con los parámetros de procesamiento específicos (Anexo A), así como las descripciones del software y las páginas web (Anexo B) y el análisis estadístico (Anexo C).

2.4 Disponibilidad de datos.

Los conjuntos de datos sin procesar se depositaron en el repositorio público GNPS/MassIVE, con el número de acceso MSV000088670. Los parámetros para las redes moleculares clásicas y la coincidencia espectral utilizando todos los conjuntos de datos están disponibles en el siguiente enlace:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=db1a30deb7914986b876d09644eef080>.

Los resultados de MolDiscovery están disponibles en el siguiente enlace:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=53eabc6b4fa34830925f2c0296ca0f4d>.

2.4.1 *Análisis estadístico de metabolómica.*

Para los datos de metabolómica, los picos con cuantificación reproducible (con coeficiente de variación de control de calidad $< 25\%$ como criterio) y el *fold-change* $\geq 1,5$ o $\leq 1/1,5$ y un valor de $p < 0,05$ (prueba LIMMA) se consideraron diferencialmente abundantes al comparar los dos grupos. Se utilizó Metaboanalyst 4.0 (Xia and Wishart, 2011) para el análisis estadístico multivariado y la visualización del *Heat map*. Se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar el comportamiento de agrupación de muestras y la variación entre grupos. El registro de datos transformados (sin escalar), se utilizó para el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis de *Heat map*.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización de AgNPs

Se sintetizaron AgNPs siguiendo el protocolo descrito por Vázquez-Muñoz (2019) con modificación en el proceso de liofilización. Se ilustran imágenes representativas del análisis por TEM (Figura 4 a). El tamaño de las nanopartículas se midió utilizando ImageJ, y tuvieron entre 10 nm y 35 nm aproximadamente, de formas cuasi-esferoides. El perfil UV-Vis mostró un solo pico con una absorbancia máxima de $\lambda = 410$ nm, espectro típico de las AgNPs esféricas menores a 50 nm (Mock et al., 2002; Vazquez-Muñoz et al., 2019b) (Figura 4 b). Se indica el perfil de absorbancia de AgNO_3 $\lambda = 230$ nm (espectro naranja) y la síntesis después de la liofilización perdió el AgNO_3 que no se redujo a AgNPs (espectro azul). Las diversas síntesis mostraron picos máximos por encima de los 400 nm sin AgNO_3 (Figura 4 b).

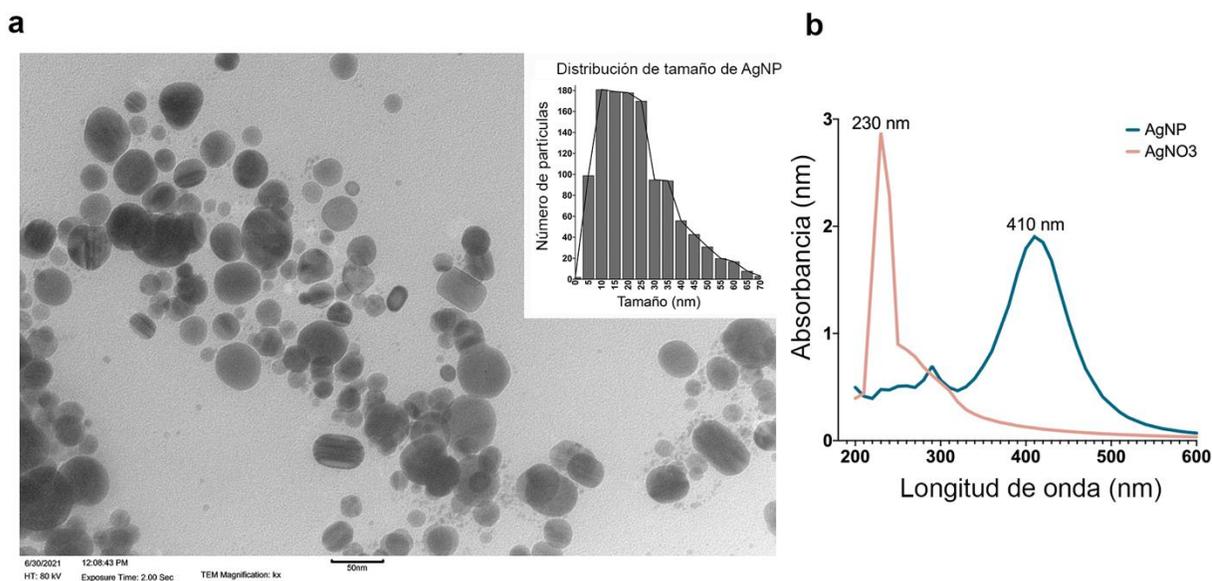


Figura 4. Caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs). a) Microscopía electrónica de transmisión de AgNPs, la barra representa 50 nm; en el inserto se muestra la distribución de tamaños de las AgNPs. B) Perfil UV-Vis de AgNPs y AgNO_3 .

El diámetro hidrodinámico de las AgNPs fue de 12 a 20 nm (Figura 5 a). El potencial Zeta de AgNPs es -6.2 mV (Figura 5 b). El porcentaje de peso de síntesis se calculó a partir de la concentración de 1.8 ppm y los

2.6 mg de síntesis calcinada y se analizó mediante ICP-OES, lo que resultó en un 89.3% de plata en la muestra, mostrado en la figura 6.

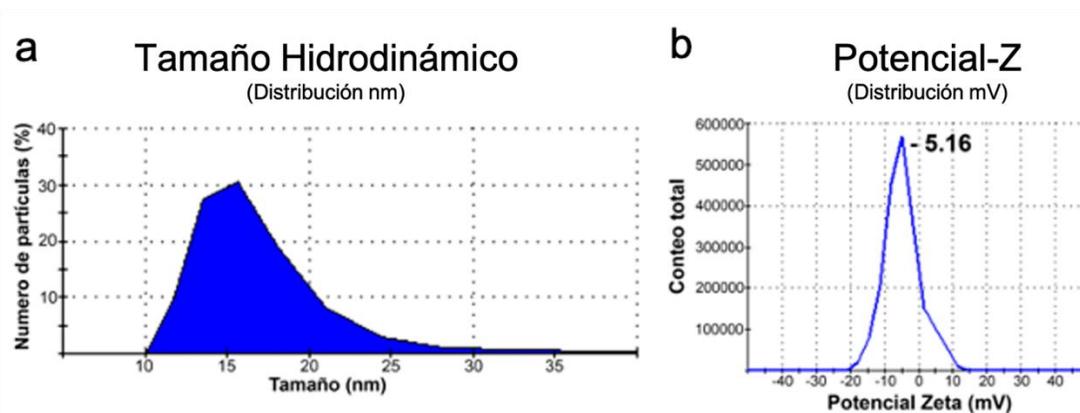


Figura 5. Análisis de dispersión de luz dinámica de AgNPs sintetizadas. (a) Distribución de tamaño por radio hidrodinámico (nm) de las AgNPs. (b) Potencial zeta para caracterizar la estabilidad AgNPs por análisis de repulsión/atracción de carga.

$$\begin{aligned}
 \text{a} \\
 \text{Peso \%} &= \left[\frac{\text{Concentración de Ag por ICP-OES (ppm)} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Peso de síntesis digerida (mg)}} \right] \times 100 \\
 \\
 \text{b} \\
 \text{Peso \%} &= \left[\frac{[1.8587 \text{ ppm}] \times \left[\frac{1}{50} \times \frac{1}{25} \right]}{2.6 \text{ mg}} \right] \times 100 = 88 \%
 \end{aligned}$$

Figura 6. Cálculos de la concentración de AgNPs de la síntesis. (a) Fórmula para calcular el peso porcentual. (b) Estimación del peso porcentual de AgNPs en la síntesis.

3.2 Actividad antimicrobiana de AgNPs en células planctónicas y biopelículas

Las propiedades antimicrobianas de las AgNPs se evaluaron en células planctónicas y biopelículas maduras de *V. cholerae*. La concentración mínima bactericida (CMB) de las células planctónicas y la concentración mínima bactericida de la biopelícula (CMBB) se determinaron por el estampado directo de los tratamientos (Figura 7 a - b). La concentración bactericida para células planctónicas y biopelículas fue de 550 µg/ml y 4.4 mg/ml, respectivamente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó por densidad óptica (Figura 5 c - d) y por el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Figura 7 e - f, - 8 a - b).

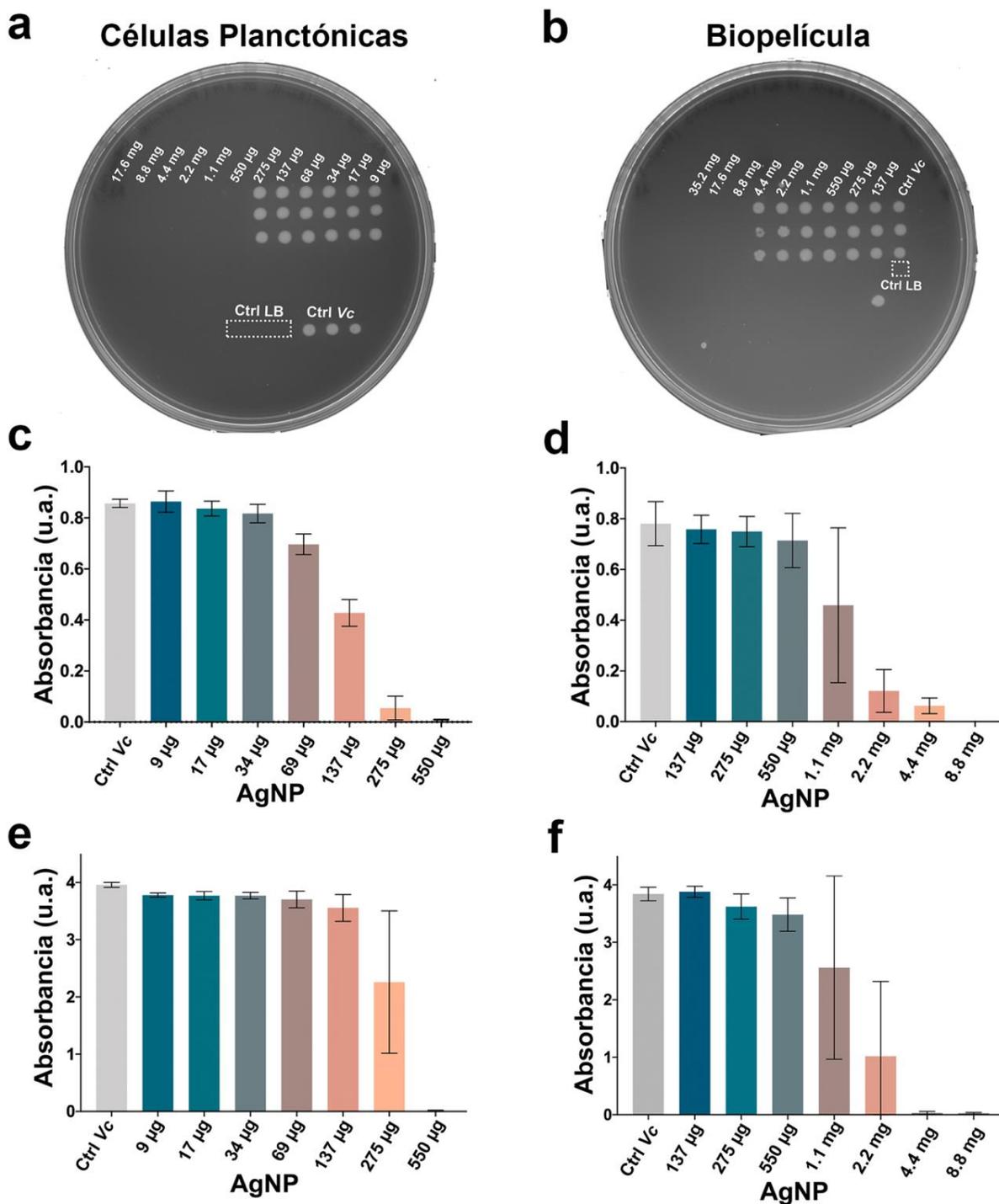
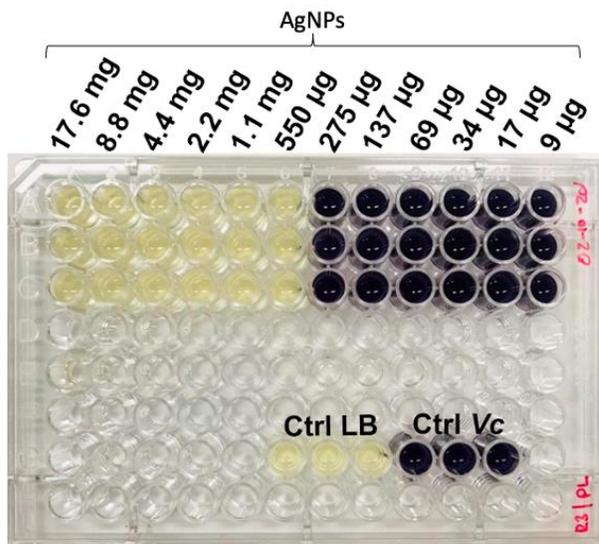


Figura 7. Actividad antimicrobiana de las AgNPs en células planctónicas y biopelículas. Se muestra la concentración mínima bactericida (CMB) de y concentración mínima bactericida de biopelícula (CMBB) por estampado (a-b), ensayo MTT (c-d), turbidez (e-f). Tres réplicas biológicas (cada una con tres réplicas técnicas). *V. cholerae* sin tratamiento (Ctrl Vc); medio *Lysogeny Broth* (LB) como control sin contaminación bacteriana; MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Para las células planctónicas, el ensayo MTT y la densidad óptica se confirman entre sí, siendo 275 µg/ml la concentración a la que ya no se observa turbidez óptica. Por otro lado, la biopelícula presentó un

rango más amplio de inhibición, que varió desde 1.1 hasta 4.4 mg (n=3). De acuerdo con los gráficos para biopelícula por ensayo MTT (Figura 7 c - d) y densidad óptica (Figura 7 e - f), la CMI para la biopelícula es de 4.4 mg/ml (Figura 7).

a) Células Planctónicas



b) Biopelículas

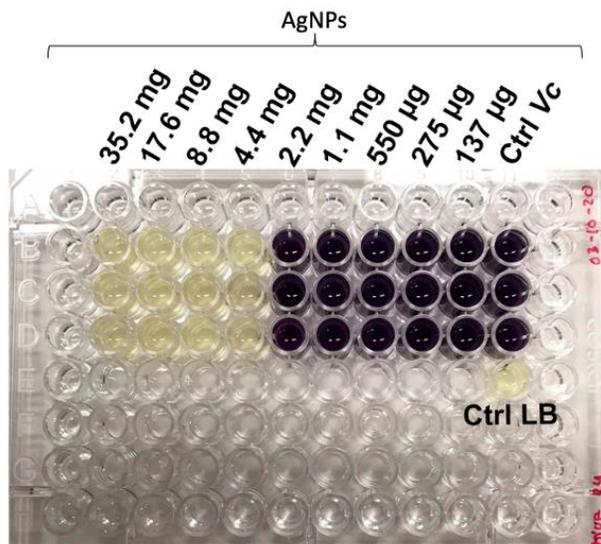


Figura 8. Visualización experimental de los ensayos de MTT. (a) Células planctónicas y (b) Biopelícula tratada con diferentes concentraciones de AgNPs.

Una vez establecido el CMB y la CMBB de *V. cholerae* para ambos estilos de vida, se eligió la LD₅₀ (dosis letal 50%) como la concentración subletal para los experimentos posteriores. Se expusieron cultivos bacterianos de células planctónicas y biopelículas a concentraciones de 275 µg/ml y 2.2 mg/ml, respectivamente, en donde tras 24 horas de estos tratamientos las células aún se mantenían vivas, lo cual nos permitió evaluar el efecto a un periodo corto de tiempo (30 min) en busca de la respuesta metabólica temprana al tratamiento.

3.3 Perfil metabólico de células planctónicas y biopelículas de *V. cholerae* ante AgNPs

Desde un enfoque de espectrometría de masas en tándem y quimioinformático, evaluamos la respuesta metabólica de las células planctónicas (PL) y biopelículas (BP) de *V. cholerae* expuestas a concentraciones subletales de AgNPs en un periodo corto de tiempo. Para visualizar la respuesta

metabólica global, empleamos un análisis de componentes principales (PCA), lo que nos permitió observar patrones de agrupación entre conjuntos de datos (Figura 9 a). Los grupos de control BP y PL se agruparon separados, lo que indica diferencias en el metaboloma basal entre ambas formas de vida. Las AgNPs perturbaron los metabolomas de manera diferente según la forma de vida y las células PL tratadas se agruparon lejos de las células no tratadas; sin embargo, no ocurrió lo mismo para la BP tratada y no tratada, ya que se observa cercanía entre los tratamientos con BP tratadas y el control. A manera de control interno, la estrecha agrupación de las muestras de control de calidad (QC) refleja la estabilidad del método y asegura que los cambios observados tienen un origen biológico y no técnico.

Para extraer los datos metabolómicos complejos y obtener información sobre los metabolitos específicos alterados por el tratamiento, comparamos las abundancias de picos de los grupos de biopelículas y células planctónicas tratadas con AgNPs con sus controles (células no tratadas). Se lograron cuantificar 619 metabolitos (con alta confianza) en todos los tratamientos, y las comparaciones cuantitativas se ilustran como gráficos de volcán (Figura 9 b y d). Se encontraron más metabolitos alterados significativamente (según los criterios de Fold change y valor p) en los tratamientos de células planctónicas (35 aumentaron su concentración, mientras que 36 disminuyeron), que en la biopelícula (27 en aumento, 10 en disminución).

Para determinar si las AgNPs alteraron el mismo tipo de metabolitos en ambas formas de vida microbiana, se realizó un gráfico UpSet-plot usando todos los metabolitos desregulados (Figura 9c). Solo se compartieron tres de los 105 metabolitos perturbados, lo que indica una respuesta metabólica distintiva para cada modo de crecimiento cuando se exponen a AgNPs.

Para traducir las diferencias metabólicas observadas usando métodos de visualización de datos, perfilamos químicamente los metabolitos desregulados por AgNPs con la ayuda del software CANOPUS, una herramienta computacional para clasificaciones químicas sistemáticas basadas en las ontologías químicas de Classyfire (Djoumbou Feunang et al., 2016) usando espectros de fragmentación (Dührkop et al., 2021). La Figura 10 muestra las clases químicas desreguladas asignadas por CANOPUS, en las que los ácidos carboxílicos y los acilos grasos representan las clases químicas más alteradas en ambas formas de vida de *V. cholerae* expuestas a las nanopartículas. Otras clases químicas cambiaron de manera única en cada forma de vida. Específicamente, los compuestos organooxigenados, los sacarolípidos y los compuestos organonitrogenados se perturbaron en las células planctónicas, mientras que los glicerofosfolípidos y los azoles aumentaron en abundancia en las biopelículas.

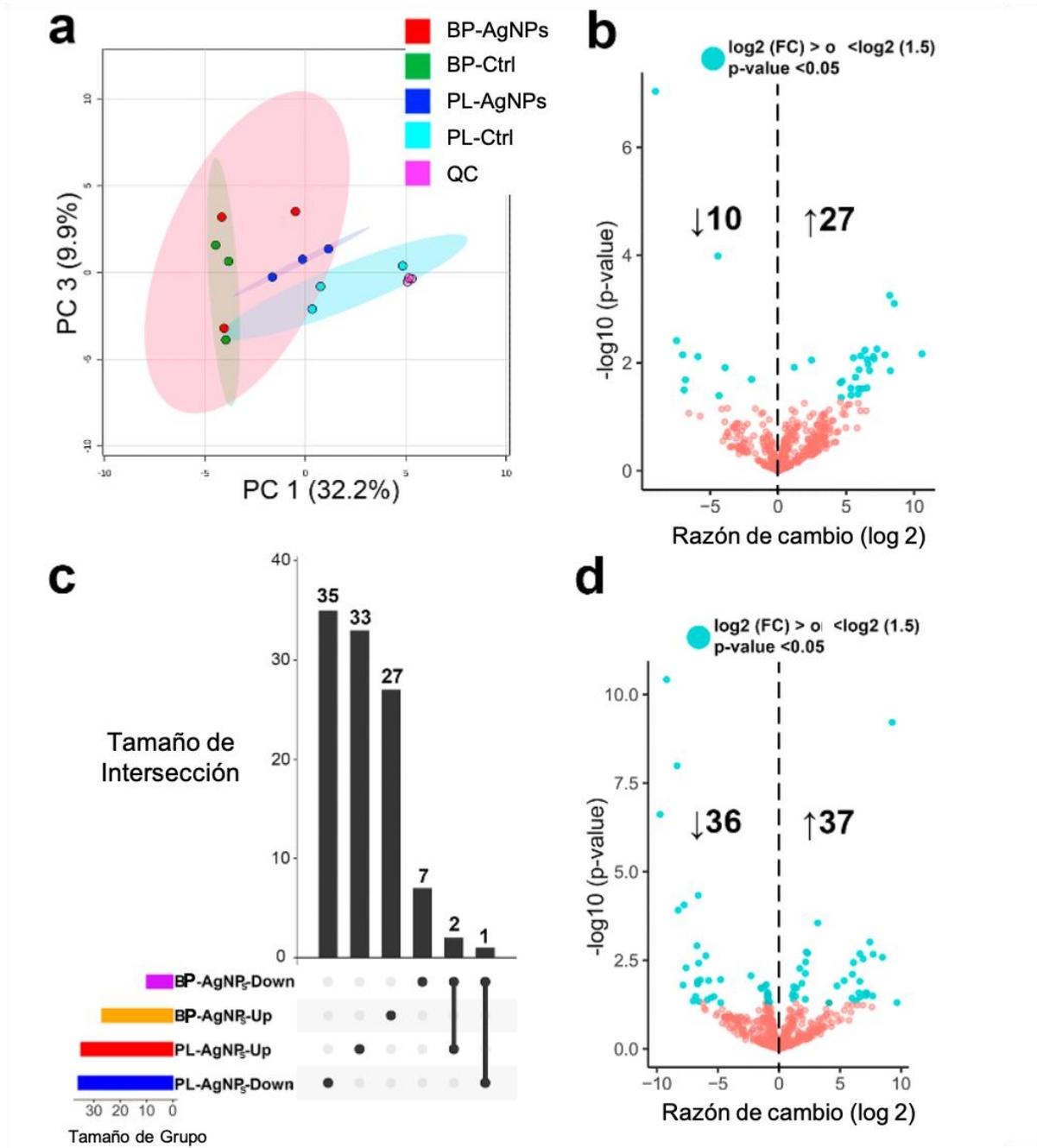


Figura 9. Análisis quimiinformático y metabolómico no dirigidos basados en espectrometría de masas de células planctónicas (PL) y biopelículas (BP) de *V. cholerae* expuestas a AgNPs. (a) Análisis de componentes principales (PCA) utilizando los picos alineados y filtrados entre los grupos (datos transformados logarítmicamente sin escalar). Las áreas sombreadas indican intervalos de confianza del 95%. Gráfica de volcán (Volcano-plot) de los picos cuantificados en (b) biopelícula (BP-AgNPs/BP-Ctrl) y (d) planctónica (PL-AgNPs/PL-Ctrl) de *V. cholerae* expuesta a AgNPs. Los puntos azules indican picos significativamente moduladas por el tratamiento con AgNPs según los criterios de razón de cambio y valor-p (prueba de Limma). (c) Patrón superpuesto (Up-Set Plot) de metabolitos desregulados por AgNPs en condiciones en las que los puntos interconectados entre los grupos indican que se compartieron 3 de los 105 picos de metabolitos perturbados.

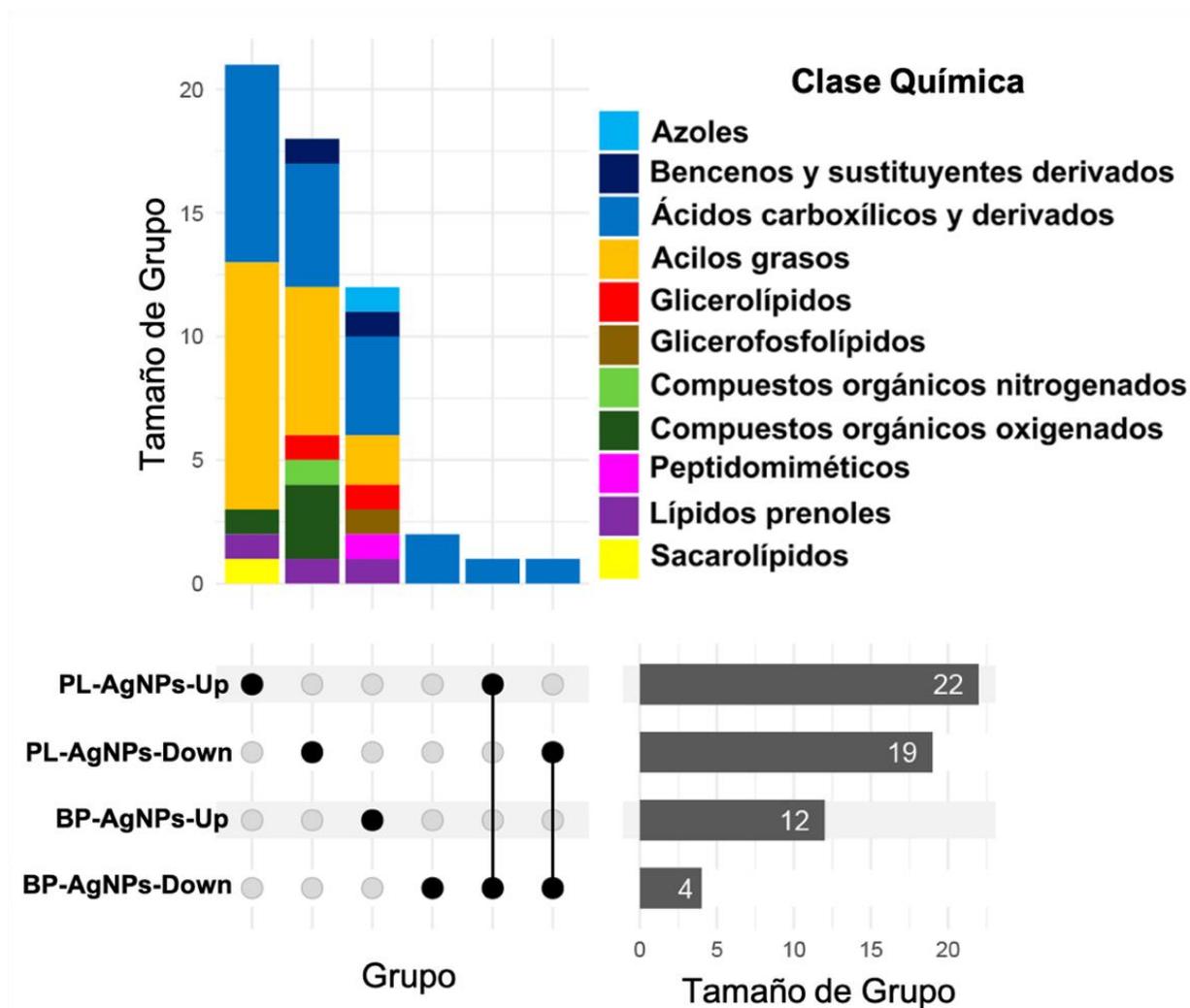


Figura 10. Metabolitos anotados a nivel de clase química alterados por AgNPs en células planctónicas (PL) y biopelículas (BP). Los grupos horizontales se establecen en función de la forma de vida PL o BP, cada una señalando la dirección de cambio (aumento/diminución de abundancia). Las barras horizontales de color gris oscuro muestran el número de metabolitos en cada grupo. Los puntos indican si los metabolitos se modifican exclusivamente en un grupo (punto simple) o en más de uno (puntos vinculados). Las barras verticales representan el número de metabolitos en cada conjunto individual o combinado y los colores representan la abundancia relativa de la clase química señalada en el listado.

Además, identificamos y anotamos a nivel de estructura molecular los metabolitos desregulados por el tratamiento utilizando GNPS (plataforma web de Global Natural Products Social Molecular Networking web platform), coincidencia espectral automática (MSI, nivel 2) y herramientas de anotación *in-silico* (es decir, SIRIUS y software MolDiscovery, MSI, nivel 3). La lista completa de todos los metabolitos identificados se encuentra en los materiales suplementarios en la siguiente referencia (Meza-Villezcás et al., 2022).

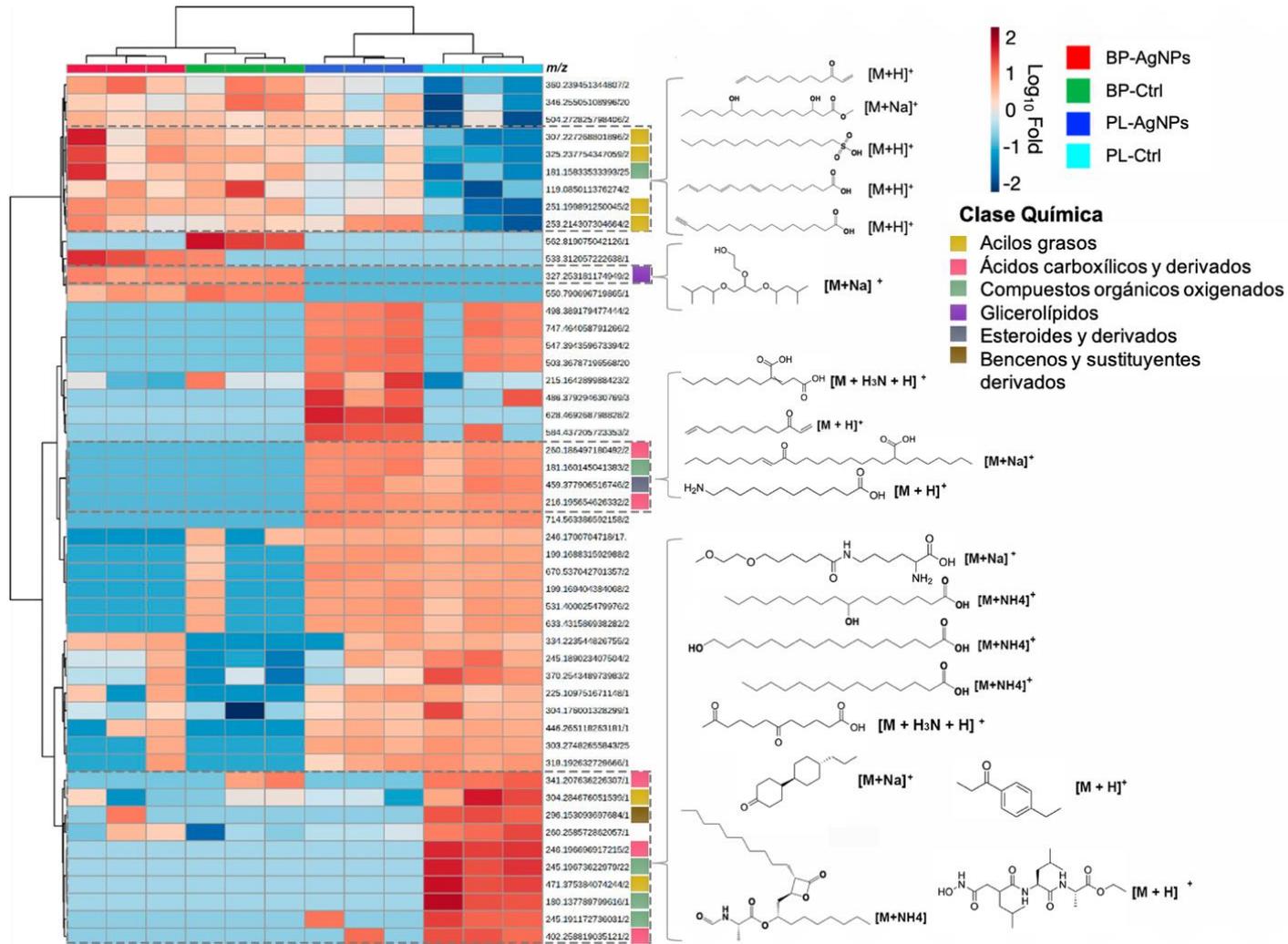


Figura 11. Visualización de mapa de calor (*Heat map*) de los 50 metabolitos principales clasificados por la prueba ANOVA de los picos alineados entre condiciones con cuantificación reproducible. Las clases químicas se muestran en diferentes colores. A la derecha del mapa de calor, se muestran los valores de *m/z* de cada metabolito. Los datos se transformaron logarítmicamente sin escalar para los análisis de mapas de calor. El método de agrupamiento utilizado fue Ward, utilizando la distancia euclidiana como medida de distancia. (BP-AgNP: biopelícula expuesta a AgNPs; BP-Ctrl: control de biopelícula no expuesta; PL-AgNP: células planctónicas expuestas a AgNPs; PL-Ctrl: control de células planctónicas no expuestas; QC: control de calidad).

A través de la técnica de visualización por *heat-map* (Figura 11), observamos un subconjunto de ácidos grasos saturados e insaturados con una abundancia relativamente menor en las células planctónicas en comparación con las biopelículas, cuyos niveles solo fueron modulados (aumentados) por las AgNPs en las células planctónicas. Del mismo modo, pero en la dirección opuesta, varios glicolípidos (ácidos grasos glicosilados), ácidos grasos (por ejemplo, hidroxilados y aminados) y derivados de aminoácidos tuvieron mayor abundancia en las células planctónicas en comparación con las biopelículas, y fueron modulados a la baja por AgNPs en las células planctónicas.

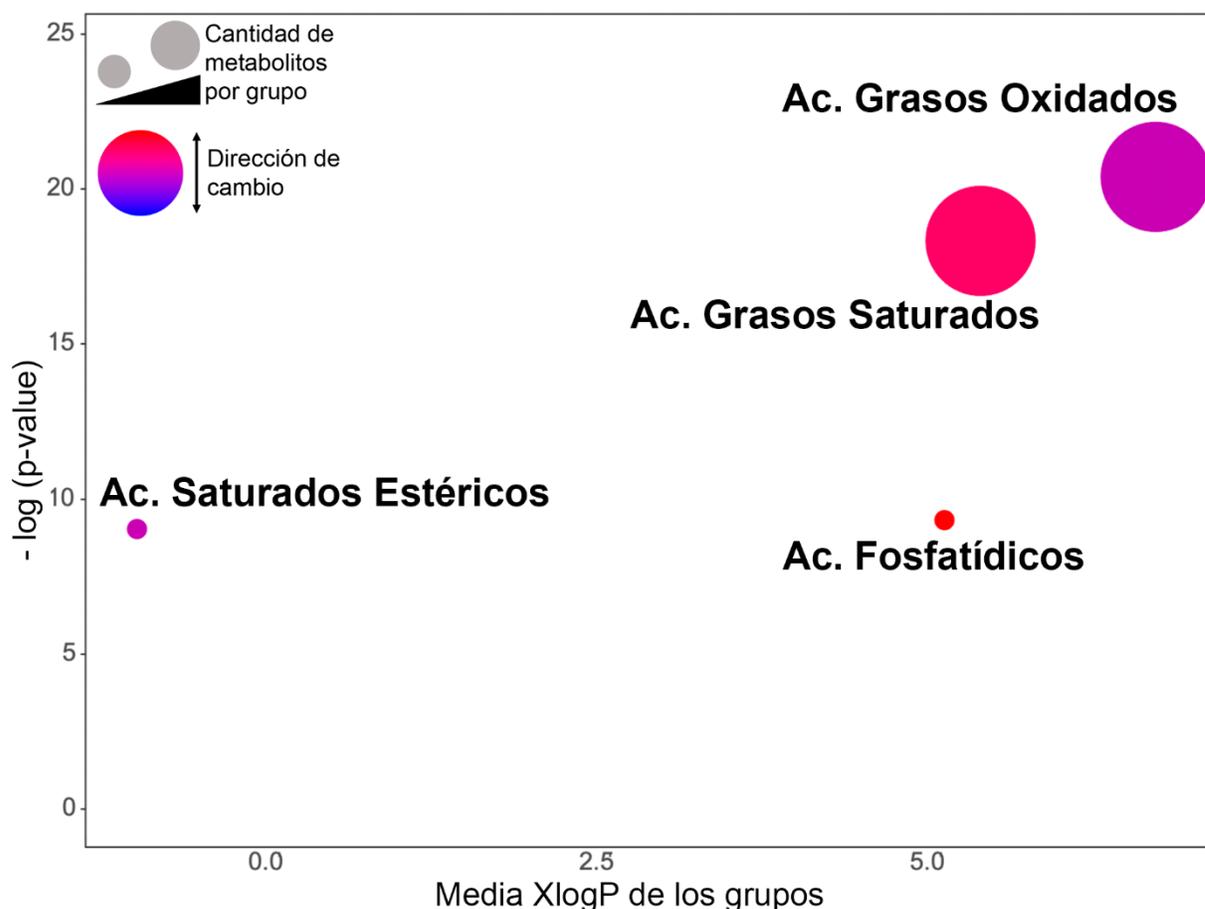


Figura 12. Análisis de enriquecimiento químico de los metabolitos desregulados en células planctónicas por AgNPs. Cada nodo representa un grupo de metabolitos significativamente perturbado. Los tamaños de los nodos reflejan el número total de compuestos que pertenecen a la clase química. La escala de color del nodo muestra la proporción de compuestos aumentados (rojo) o disminuidos (azul) para cada grupo. Diferentes tonos de púrpura reflejan la proporción de metabolitos aumentados y disminuidos. Los valores de p se calcularon mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

También se corroboraron las diferencias metabólicas entre las formas de vida, mostrando un patrón de abundancia característico para las biopelículas (tratadas y control) y lo contrario para las células planctónicas (tratadas y control). En la Figura 11 las estructuras moleculares indican el metabolito putativo

predicho por la herramienta CSI: FingerID en el software SIRIUS. Las clases químicas se muestran en diferentes colores y, a la derecha del mapa de calor, se muestran los valores de m/z (relación masa/carga) de cada metabolito. No todos los metabolitos tienen un espectro de fragmentación asociado para la anotación *in-silico*, por lo que no pudimos recuperar una estructura química de todos los metabolitos que aparecen en el *heat-map*.

Se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento basado en las similitudes químicas para proporcionar una descripción completa de los metabolitos modulados por las AgNPs. Solo encontramos grupos de metabolitos enriquecidos utilizando los metabolitos desregulados por AgNPs en las células planctónicas, incluidos los ácidos grasos oxidados (FA), los ácidos grasos saturados, los ácidos fosfatídicos y esteáricos saturados (Figura 12).

Capítulo 4. Discusión

La evolución de los microorganismos multirresistentes ha impulsado la búsqueda de nuevos y diferentes agentes antimicrobianos, como es el caso de las nanopartículas de plata (AgNPs). Las bacterias pueden existir como organismos de vida libre (células planctónicas) o formar comunidades de múltiples capas (biopelículas), donde estas últimas se asocian con tasas más altas de resistencia a los medicamentos (Mah and Toole, 2001; Olsen, 2015). Aunque algunos estudios informan sobre los efectos moleculares de las AgNPs en las bacterias, pocos han proporcionado información sobre la respuesta metabólica dependiente del fenotipo a este nanomaterial. Esto es de suma importancia para descubrir nuevos mecanismos que conduzcan a la erradicación diferencial de las células planctónicas o de las biopelículas, así como ayudar a comprender la biología de las bacterias. En este estudio, comparamos el efecto antimicrobiano de las AgNPs en células planctónicas y biopelículas de *V. cholerae* y obtuvimos información sobre la respuesta metabólica dependiente del fenotipo bacteriano al nanomaterial utilizando metabolómica no dirigida basada en espectrometría de masas y quimioinformática integral.

Las AgNPs se sintetizaron exitosamente con un tamaño promedio de 10 a 35 nm, de acuerdo con un rango de tamaño de ≤ 100 nm, y una forma esférica característica de los nanoantibióticos de plata (Chen and Schluesener, 2008; Mamun et al., 2021; Vázquez-Muñoz, Arellano-Jiménez, et al., 2019b). El efecto antimicrobiano de las AgNPs mostró una diferencia evidente en el rango de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB/CMBB) de las formas de vida planctónicas y biopelículas. Aunque el CMB de AgNPs para las células planctónicas fue de 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la CMBB para las biopelículas fue de 8.8 mg/mL . Con respecto a los antibióticos convencionales, múltiples estudios han demostrado una mayor resistencia antimicrobiana de las biopelículas que de las células planctónicas (Costerton et al., 1999; Lewis, 2001; Macia et al., 2014; Mah and Toole, 2001; Martínez-Gutierrez et al., 2013; Olsen, 2015; Sharma et al., 2019). Por lo tanto, se necesita una mayor concentración del mismo antibiótico en la BP para alcanzar la actividad antimicrobiana deseada (Davies, 2003; Stewart, 2015; Stewart and Costerton, 2001). Se han descrito múltiples mecanismos de resistencia *in-vitro*; por ejemplo, las células planctónicas pueden regular la expresión flagelar, promoviendo su supervivencia en ambientes hostiles, o regular la expresión de genes de virulencia durante la enfermedad del cólera (Silva and Benitez, 2016). Por su parte, comunidades de biopelículas tienen enzimas modificadoras de fármacos y proteínas neutralizantes de fármacos, tienen una permeabilidad celular más baja, bombas de flujo y un metabolismo bajo (Kumar et al., 2013; Magnet et al., 2001; Nikaido, 2003; Papenfort et al., 2015; Sharma et al., 2019; Slavin et al., 2017; Vázquez-Muñoz, Meza-Villezcás, et al., 2019; Walsh, 2000). Sin embargo, la evidencia también muestra que las AgNPs

ejercen una actividad antimicrobiana multimodal. Estos mecanismos incluyen (i) alteraciones de la pared celular y de la membrana, provocando cambios morfológicos como cambios en la permeabilidad y pérdida de estabilidad; (ii) cambios químicos en la membrana, especialmente en las composiciones de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos; (iii) interferencia en la cadena respiratoria por su interacción con proteínas de membrana; e (iv) interrupción de la transcripción, traducción y síntesis de proteínas, lo que lleva a la necrosis y la muerte celular (Slavin et al., 2017; Tang and Zheng, 2018; Vázquez-Muñoz et al., 2019). Sin embargo, la exposición de microorganismos a antimicrobianos en concentraciones subletales o por períodos cortos nos permite evaluar los cambios en las células expuestas a nivel de expresión genética, proteica y metabólica para evaluar su supervivencia y probablemente la selección de rasgos resistentes. En ese sentido, nos interesó describir las respuestas metabólicas de las células planctónicas y de biopelículas de *Vibrio cholerae* para superar la toxicidad de las AgNPs.

En función de la actividad antimicrobiana de las AgNPs sobre células planctónicas y biopelículas de *V. cholerae*, se seleccionó una concentración equivalente a la mitad de la CMI como dosis subletal (275 µg/mL para células planctónicas y 2,2 mg/mL para biopelículas). Después de 24 h de exposición a la dosis subletal, hubo una gran cantidad de biomasa viable (Figura 9 a – b) y las células por el ensayo MTT mantuvieron la actividad metabólica (respiración celular) (Figura 9 e – f). Esto nos permitió obtener y evaluar la expresión de los metabolitos de las células viables de *V. cholerae* expuestas a AgNPs.

Se aplicó un enfoque de análisis metabolómico no dirigido basado en espectrometría de masas para evaluar los cambios metabólicos desencadenados por una concentración subletal de AgNPs en las dos formas de vida. Para proporcionar una perspectiva global de los metabolomas en cada condición, realizamos un análisis PCA (Debik et al., 2022). Tanto el grupo control de células planctónicas como el de biopelículas divergieron, lo que indica diferencias en su metaboloma basal (Figuras 9 a, Figura 11).

Estos resultados concuerdan con la literatura, en la cual se han descrito diferencias significativas en las composiciones de la comunidad, las estructuras y la actividad metabólica de las células planctónicas y las biopelículas (Clark et al., 2012; Meza-Villezcás et al., 2019; Smith et al., 2018). Nuestros resultados mostraron que (i) la biopelícula expuesta a AgNPs y el grupo de control de la biopelícula se agruparon, mostrando una clara distinción de los grupos planctónicos (Figura 9 a); (ii) se encontró un mayor número de metabolitos desregulados en las células planctónicas tratadas con AgNPs que en las células formadoras de biopelícula tratadas con AgNPs (Figura 9 b – d); y (iii) solo 3 de los 105 metabolitos perturbados se compartieron entre los metabolomas de las células planctónicas y las biopelículas (Figura 9 c). Estos

resultados respaldan la idea de que las AgNPs afectan el metaboloma del microorganismo según el fenotipo microbiano (Figuras 9 y 11).

Las células de biopelículas expuestas a AgNPs y el control de biopelícula se agruparon en el PCA (Figura 9 a) y presenta metabolitos desregulados (10 disminución, 23 aumento) (Figura 9 b). Podemos atribuir esto a los fenómenos de resistencia de las biopelículas a los agentes antimicrobianos o a las duras condiciones ambientales descritas anteriormente, donde, dadas las condiciones, la baja tasa de crecimiento de las biopelículas (células latentes) y la heterogeneidad metabólica pueden promover la tolerancia (Olsen, 2015). Se ha reportado que, en las biopelículas, debido a la composición de la matriz de exopolisacáridos (EPS) que tiene carga negativa, hay una difusión lenta de aquellos compuestos con carga negativa, la cual limita su internalización (Olsen, 2015).

Además, debido a la carga superficial de las AgNP, aquellas AgNPs con carga negativa y neutra pueden quedar atrapadas en los exopolisacáridos de membrana o adherirse a las membranas celulares, internalizándose en pequeñas cantidades, mientras que las AgNPs cargadas positivamente exhiben una internalización a través de la membrana celular de manera más eficiente (Xu et al., 2020). A pesar de la baja respuesta metabólica de las biopelículas, podemos concluir que las células dentro de la biopelícula sí responden al estímulo negativo de las AgNPs, respaldándonos en que sí hubo algunos cambios en la abundancia de metabolitos en las biopelículas tratadas respecto a su control, representados en el *heat-map* (Figura 11).

Por otro lado, las células planctónicas expuestas a AgNPs difieren del control en el diagrama PCA (Figura 9 a), exhibiendo más metabolitos desregulados (35 arriba-36 abajo) (Figura 9 d) y mostraron un patrón de abundancia específico entre algunos metabolitos (Figura 11). Estos resultados pueden estar asociados con su mayor tasa metabólica, velocidad de crecimiento y contacto directo con AgNPs en contraste con las biopelículas (Olsen, 2015; Ramalingam et al., 2016; Tang and Zheng, 2018).

Se ha informado ampliamente que las bacterias planctónicas son susceptibles al efecto tóxico de las AgNPs. Los principales mecanismos tóxicos reportados son: (i) las alteraciones de la pared celular y la membrana (permeabilidad, brechas y fugas de contenido celular), (ii) los compuestos oxidantes intracelulares y (iii) la interacción con estructuras subcelulares y biomoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos (Jung and Jik, 2011; Olsen, 2015; Park et al., 2013; Ramalingam et al., 2016; Tang and Zheng, 2018).

En este sentido, las células planctónicas, al encontrarse más expuestas, deberían responder con un mecanismo celular más robusto para sobrevivir a los efectos tóxicos de las AgNPs.

Usando la coincidencia espectral automática de la base de datos de GNPS, no pudimos identificar o anotar los metabolitos significativamente desregulados por AgNPs. Por lo tanto, utilizamos un *pipe-line* de análisis de datos (Moreno-Ulloa et al., 2022) que consta de varias herramientas avanzadas de anotación *in-silico* que nos permitieron asignar a los metabolitos una estructura molecular (Cao et al., 2021; Dührkop et al., 2015) y los niveles de clase química (Dührkop et al., 2021). Se perturbaron varias clases químicas de compuestos, y la abundancia y diversidad de los compuestos se anotaron de manera significativamente mayor para las células planctónicas que en las biopelículas (Figuras 10 - 11).

Dado que la diversidad del metaboloma es específica para cada forma de vida y presenta una abundancia de clases químicas particular, podemos concluir que las respuestas metabólicas dependientes del fenotipo de *V. cholerae* se deben al modo de acción de las AgNPs. Según nuestro informe previo (Vázquez-Muñoz et al., 2019), estos resultados respaldan la idea de que las AgNPs provocan cambios en la integridad de la membrana celular de *V. cholerae* tal y como sucede en *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Así mismo, concentraciones subletales de AgNPs despolarizan la membrana celular, promoviendo un aumento de la permeabilidad y haciéndola más susceptible a las bacterias frente a los agentes antimicrobianos (Vázquez-Muñoz et al., 2019).

Por tanto, este cambio en la composición química de la membrana detectado por LC-MS2 sugiere un posible mecanismo de supervivencia ante una concentración subletal de AgNPs. El enriquecimiento de esta clase química de compuestos relacionados con la formación o integridad de la membrana celular en células planctónicas (Figura 12) y no en células de biopelículas puede explicarse por la formación de matriz protectora de las biopelículas, lo que retrasa y disminuye el acceso de las AgNPs a las células que conforman las biopelículas.

Por el contrario, las células planctónicas están directamente expuestas a las AgNPs y se puede atribuir a este contacto directo una mayor susceptibilidad al efecto tóxico de las AgNPs y una respuesta aumentando la producción de componentes de membrana celular (Figura 13) (Lewis, 2001; Mah and Toole, 2001; Romeo and Cooper, 2008; Spoering and Lewis, 2001).

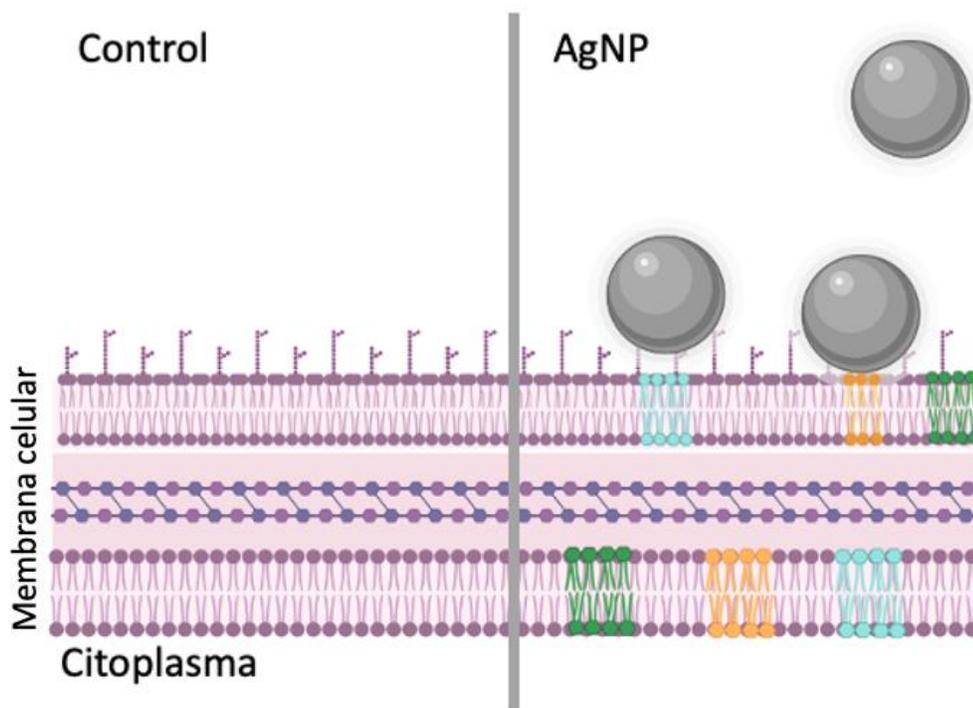


Figura 13. Modelo de recomposición de membrana en células planctónicas de *V. cholerae* tratadas con dosis subletal de AgNPs. Se muestra la composición de la membrana celular control (fosfolípidos uniformes en color morado) y la propuesta del cambio de composición (fosfolípidos en colores distintos señalando los posibles cambios) tras el efecto dosis subletales de las AgNPs (Esferas plateadas).

Capítulo 5. Conclusiones

En conclusión, este estudio muestra los perfiles metabolómicos de las células planctónicas y las biopelículas de *V. cholerae* expuestas a concentraciones subletales de AgNPs, demostrando que hay más alteraciones metabólicas en la forma de vida planctónica que en la forma de vida de biopelícula. En las células planctónicas, los ácidos carboxílicos y ácidos grasos fueron principalmente perturbados donde, después de un análisis de enriquecimiento químico, se encontró una abundancia estadísticamente significativa de ácidos grasos (saturados e insaturados), ácido fosfatídico y ácido esteárico saturado, lo que sugiere una recomposición de membrana cuando se exponen a concentraciones subletales de AgNPs. Además, la metabolómica no dirigida confirma las diferencias en las composiciones y abundancias de los metabolitos específicos en cada forma de vida de *V. cholerae*. Este trabajo aporta una perspectiva metabolómica para explorar posibles vías de resistencia a las AgNPs por parte de *V. cholerae*.

Literatura citada

- Alam, M., Sultana, M., Nair, G. B., Sack, R. B., Sack, D. a, Siddique, a K., Ali, A., Huq, A., and Colwell, R. R. (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4). doi: 10.1128/AEM.72.4.2849-2855.2006
- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., and Taylor, R. K. (2015). Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLOS Pathogens*, 11(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1004787
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L. F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J. M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hoof, J. J. J., Ernst, M., Kang, K. bin, Aceves, C. M., Caraballo-Rodríguez, A. M., Koester, I., Weldon, K. C., Bertrand, S., Roullier, C., Sun, K., Tehan, R. M., Boya P, C. A., Christian, M. H., Gutiérrez, M., Ulloa, A. M., Tejada Mora, J. A., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia, J., Vásquez-Chaves, V., Zhang, Y., Calderón, A. I., Tayler, N., Keyzers, R. A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A. A., Jarmusch, A. K., Schmid, R., Truman, A. W., Bandeira, N., Wang, M., and Dorrestein, P. C. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols. Nature Research*, 15(6). doi: 10.1038/s41596-020-0317-5
- Barupal, D. K. and Fiehn, O. (2017). Chemical Similarity Enrichment Analysis (ChemRICH) as alternative to biochemical pathway mapping for metabolomic datasets. *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-15231-w
- Bertini, I., Hu, X., and Luchinat, C. (2014). Global metabolomics characterization of bacteria: pre-analytical treatments and profiling. *Metabolomics*, 10(2). doi: 10.1007/s11306-013-0571-4
- Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Apmis*, 121(136). doi: 10.1111/apm.12099
- Booth, S. C., Workentine, M. L., Wen, J., Shaykhutdinov, R., Vogel, H. J., Ceri, H., Turner, R. J., and Weljie, A. M. (2011). Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *Journal of Proteome Research*, 10(7). doi: 10.1021/pr2002353
- Cao, L., Guler, M., Tagirdzhanov, A., Lee, Y. Y., Gurevich, A., and Mohimani, H. (2021). MolDiscovery: learning mass spectrometry fragmentation of small molecules. *Nature Communications. Nature Research*, 12(1). doi: 10.1038/s41467-021-23986-0
- Cheeseman, S., Christofferson, A. J., Kariuki, R., Cozzolino, D., Daeneke, T., Crawford, R. J., Truong, V. K., Chapman, J., and Elbourne, A. (2020). Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. In *Advanced Science* (Vol. 7, Issue 10). John Wiley and Sons Inc. doi: 10.1002/advs.201902913
- Chen, X. and Schluesener, H. J. (2008). *Nanosilver : A nanoproduct in medical application*. 176. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004
- Clark, M. E., He, Z., Redding, A. M., Joachimiak, M. P., Keasling, J. D., Zhou, J. Z., Arkin, A. P., Mukhopadhyay, A., and Fields, M. W. (2012). Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: Carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state. *BMC Genomics*, 13(1). doi: 10.1186/1471-2164-13-138

- Clemens, J. D., Nair, G. B., Ahmed, T., Qadri, F., and Holmgren, J. (2017). Cholera. *The Lancet*, 390(10101). doi: 10.1016/S0140-6736(17)30559-7
- Conway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinformatics*. Oxford University Press, 33(18). doi: 10.1093/bioinformatics/btx364
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. *Science*, 284(5418). <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Das, B., Verma, J., Kumar, P., Ghosh, A., and Ramamurthy, T. (2020). Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. Elsevier Ltd, 38. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2). doi: 10.1038/nrd1008
- Dayalan, S., Xia, J., Spicer, R. A., Salek, R., and Roessner, U. (2018). Metabolome analysis. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics (Vols. 1–3)*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20251-3
- Debik, J., Sangermani, M., Wang, F., Madssen, T. S., and Giskeødegård, G. F. (2022). Multivariate analysis of NMR-based metabolomic data. In *NMR in Biomedicine (Vol. 35, Issue 2)*. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/nbm.4638
- Djoumbou Feunang, Y., Eisner, R., Knox, C., Chepelev, L., Hastings, J., Owen, G., Fahy, E., Steinbeck, C., Subramanian, S., Bolton, E., Greiner, R., and Wishart, D. S. (2016). ClassyFire: automated chemical classification with a comprehensive, computable taxonomy. *Journal of Cheminformatics*. BioMed Central Ltd., 8(1). doi: 10.1186/s13321-016-0174-y
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. v., Meusel, M., Dorrestein, P. C., Rousu, J., and Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 16(4). doi: 10.1038/s41592-019-0344-8
- Dührkop, K., Nothias, L. F., Fleischauer, M., Reher, R., Ludwig, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Gerwick, W. H., Rousu, J., Dorrestein, P. C., and Böcker, S. (2021). Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. *Nature Biotechnology*. *Nature Research*, 39(4). doi: 10.1038/s41587-020-0740-8
- Dührkop, K., Shen, H., Meusel, M., Rousu, J., and Böcker, S. (2015). Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(41). doi: 10.1073/pnas.1509788112
- Fanous, M. and King, K. C. (2021). *Cholerae*. StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470232/?report=reader>

- Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., and Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16). doi: 10.1073/pnas.0601277103
- Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., and Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16). doi: 10.1073/pnas.0601277103
- Flores-Núñez, V., Camarena-Pozos, D., Chávez-González, D., Hernández-Melgar, A., Moreno-Ulloa, A., and Partida-Martínez, L. (2022). Microbiome-inspired phyllospheric synthetic communities increase microbial diversity and productivity of eld-grown plants of *Agave tequilana*. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1782141/v1>
- Fong, J. C. N., Syed, K. a., Klose, K. E., and Yildiz, F. H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*, 156(9). doi: 10.1099/mic.0.040196-0
- Gahlawat, G., Shikha, S., Chaddha, B. S., Chaudhuri, S. R., Mayilraj, S., and Choudhury, A. R. (2016). Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents against cholera. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central, 15(1). doi: 10.1186/s12934-016-0422-x
- Gallego-Hernández, A. L., DePas, W. H., Park, J. H., Teschler, J. K., Hartmann, R., Jeckel, H., Drescher, K., Beyhan, S., Newman, D. K., and Yildiz, F. H. (2020). Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(20). doi: 10.1073/pnas.1916571117
- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., and Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *The Lancet*, 379(9835). doi: 10.1016/S0140-6736(12)60436-X
- Holman, J. D., Tabb, D. L., and Mallick, P. (2014). Employing ProteoWizard to convert raw mass spectrometry data. *Current Protocols in Bioinformatics*, SUPPL.46. doi: 10.1002/0471250953.bi1324s46
- Huq, A., Sack, R. B., Nizam, A., Longini, I. M., Nair, G. B., Ali, A., Morris, J. G., Khan, M. N. H., Siddique, a K., Yunus, M., Albert, M. J., Sack, D. a, and Colwell, R. R. (2005). Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8). doi: 10.1128/AEM.71.8.4645-4654.2005
- Jaime-Acuña, O. E., Meza-Villezcás, A., Vasquez-Peña, M., Raymond-Herrera, O., Villavicencio-García, H., Petranovskii, V., Vazquez-Duhalt, R., and Huerta-Saquero, A. (2016). Synthesis and Complete Antimicrobial Characterization of CEOBACTER, an Ag-Based Nanocomposite. *PLOS ONE*, 11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0166205

- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Ulloa, A., Pérez-Llano, Y., Moreno-Perlín, T., Silva-Jiménez, H., Barreto-Curiel, F., Sánchez-Carbente, M. del R., Folch-Mallol, J. L., Gunde-Cimerman, N., Lago-Lestón, A., and Batista-García, R. A. (2022). Surviving in the Brine: A Multi-Omics Approach for Understanding the Physiology of the Halophile Fungus *Aspergillus sydowii* at Saturated NaCl Concentration. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.840408
- Jung, A. and Jik, Y. (2011). “Nanoantibiotics ” : A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.002
- Kailasa, S. K., Park, T. J., Rohit, J. v., and Koduru, J. R. (2019). Antimicrobial activity of silver nanoparticles. In *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-816504-1.00009-0
- Kumar, B., Sharma, D., Sharma, P., Katoch, V. M., Venkatesan, K., and Bisht, D. (2013). Proteomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin and amikacin. *Journal of Proteomics*, 94. doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.025
- Lee Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis Part 1: Causes and Threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Lewis, K. I. M. (2001). MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance. 45(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Li, L., Su, Y. bin, Peng, B., Peng, X. xian, and Li, H. (2020). Metabolic mechanism of colistin resistance and its reverting in *Vibrio alginolyticus*. *Environmental Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd, 22(10). doi: 10.1111/1462-2920.15021
- Lowe, H. J. (1994). Understanding and Using the Medical Subject Headings (MeSH) Vocabulary to Perform Literature Searches. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 271(14), 1103. <https://doi.org/10.1001/jama.1994.03510380059038>
- Ludwig, M., Nothias, L. F., Dührkop, K., Koester, I., Fleischauer, M., Hoffmann, M. A., Petras, D., Vargas, F., Morsy, M., Aluwihare, L., Dorrestein, P. C., and Böcker, S. (2020). Database-independent molecular formula annotation using Gibbs sampling through ZODIAC. *Nature Machine Intelligence*. *Nature Research*, 2(10). doi: 10.1038/s42256-020-00234-6
- Macia, M. D., Rojo-Molinero, E., and Oliver, A. (2014). Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 20(10). doi: 10.1111/1469-0691.12651
- Magnet, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12). doi: 10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001
- Mah, T. C. and Toole, G. A. O. (2001). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>

- Mamun, M. M., Sorinolu, A. J., Munir, M., and Vejerano, E. P. (2021). Nanoantibiotics: Functions and Properties at the Nanoscale to Combat Antibiotic Resistance. *Frontiers in Chemistry*, 9(May). doi: 10.3389/fchem.2021.687660
- Martinez-Gutierrez, F., Boegli, L., Agostinho, A., Sánchez, E. M., Bach, H., Ruiz, F., and James, G. (2013). Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*, 29(6). doi: 10.1080/08927014.2013.794225
- Meza-Villezcás, A., Carballo-Castañeda, R. A., Moreno-Ulloa, A., and Huerta-Saquero, A. (2022). Metabolomic Profiling of the Responses of Planktonic and Biofilm *Vibrio cholerae* to Silver Nanoparticles. *Antibiotics*, 11(11). doi: 10.3390/antibiotics11111534
- Meza-Villezcás, A., Gallego-Hernández, A. L., Yildiz, F. H., Jaime-Acuña, O. E., Raymond-Herrera, O., and Huerta-Saquero, A. (2019). Effect of antimicrobial nanocomposites on *Vibrio cholerae* lifestyles: Pellicle biofilm, planktonic and surface-attached biofilm. *PLOS ONE*, 14(6). doi: 10.1371/journal.pone.0217869
- Michał Krassowski, M. A. & C. Lagger. (2021). krassowski/complex-upset: v1.3.3 (v1.3.3).
- Mlynarcik, P. and Kolar, M. (2019). Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of mcr genes. *Biomedical Papers. PALACKY UNIV*, 163(1). doi: 10.5507/bp.2018.070
- Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A., and Schultz, S. (2002). Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics*, 116(15). doi: 10.1063/1.1462610
- Moreno-Ulloa, A., Delgado-De la Herrán, H. C., Álvarez-Delgado, C., Mendoza-Porras, O., Carballo-Castañeda, R. A., Donis-Maturano, L., and Villarreal, F. (2022). Multi-omics study identifies novel signatures of DNA/RNA, amino acid, peptide, and lipid metabolism by simulated diabetes on coronary endothelial cells. *Scientific Reports*, 12(1). doi: 10.1038/s41598-022-16300-5
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ram, J. T., and Yacaman, M. J. n.d. The bactericidal effect of silver nanoparticles (2005). doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 67(4). doi: 10.1128/mubr.67.4.593-656.2003
- Olivon, F., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., and Touboul, D. (2017). MZmine 2 Data-Preprocessing to Enhance Molecular Networking Reliability. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 89(15). doi: 10.1021/acs.analchem.7b01563
- Olsen, I. (2015). *Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance*. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., Gauthier, C., Jacques, P. É., Li, S., and Xia, J. (2021). MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 49(W1). doi: 10.1093/nar/gkab382

- Papenfort, K., Förstner, K. U., Cong, J. P., Sharma, C. M., and Bassler, B. L. (2015). Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 112(7). doi: 10.1073/pnas.1500203112
- Park, H.-J., Park, S., Roh, J., Kim, S., Choi, K., Yi, J., Kim, Y., and Yoon, J. (2013). Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 19(2). doi: 10.1016/j.jiec.2012.09.013
- Ramalingam, B., Parandhaman, T., and Das, S. K. (2016). Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Applied Materials and Interfaces*. American Chemical Society, 8(7). doi: 10.1021/acsami.6b00161
- Romeo, T. and Cooper, M. D. (2008). *Bacterial Biofilms*. T. Romeo, Ed.; Vol. 322. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3
- Ruben, J., Morones-ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S., and Collins, J. J. (2013). *Silver Enhances Antibiotic Activity Against Gram-Negative Bacteria*. 81. doi: 10.1126/scitranslmed.3006276
- Salem, W., Leitner, D. R., Zingl, F. G., Schratte, G., Prassl, R., Goessler, W., Reidl, J., and Schild, S. (2015). Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 305(1). doi: 10.1016/j.ijmm.2014.11.005
- Sarwar, S., Chakraborti, S., Bera, S., Sheikh, I. A., Hoque, K. M., and Chakrabarti, P. (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). doi: 10.1016/j.nano.2016.02.006
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., and Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 48, Issue 4). doi: 10.1021/es5002105
- Sharma, D., Misba, L., and Khan, A. U. (2019). *Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities*. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 3.
- Silva, A. J. and Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2). doi: 10.1371/journal.pntd.0004330
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O., and Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z
- Smith, H. J., Zelaya, A. J., de León, K. B., Chakraborty, R., Elias, D. A., Hazen, T. C., Arkin, A. P., Cunningham, A. B., and Fields, M. W. (2018). Impact of hydrologic boundaries on microbial planktonic and biofilm communities in shallow terrestrial subsurface environments. In *FEMS Microbiology Ecology* (Vol. 94, Issue 11). Oxford University Press. doi: 10.1093/FEMSEC/FIY171

- Spoering, A. M. Y. L. and Lewis, K. I. M. (2001). *Biofilms and Planktonic Cells of Pseudomonas aeruginosa Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials*. 183(23). doi: 10.1128/JB.183.23.6746
- Stewart, P. S. (2015). Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbial Biofilms*, 2nd Edition, 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014
- Stewart, P. S. and Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. 358. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1
- Tang, S. and Zheng, J. (2018). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*. Wiley-VCH Verlag, 7(13). doi: 10.1002/adhm.201701503
- Taubes, G. (2008). The Bacteria Fight Back. *Science*, 321(5887). doi: 10.1126/science.321.5887.356
- Taylor, P. W., Stapleton, P. D., and Paul Luzio, J. (2002). New ways to treat bacterial infections. *Drug Discovery Today*, 7(21). doi: 10.1016/S1359-6446(02)02498-4
- Teschler, J. K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J. A., Wong, G. C. L., Linington, R. G., and Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 13(5). doi: 10.1038/nrmicro3433
- Vazquez-Muñoz, R., Arellano-Jimenez, M. J., Lopez, F. D., and Lopez-Ribot, J. L. (2019). Protocol optimization for a fast, simple and economical chemical reduction synthesis of antimicrobial silver nanoparticles in non-specialized facilities. *BMC Research Notes*. BioMed Central, 12(1). doi: 10.1186/s13104-019-4813-z
- Vazquez-Muñoz, R., Arellano-Jimenez, M. J., Lopez, F. D., and Lopez-Ribot, J. L. (2019). Protocol optimization for a fast, simple and economical chemical reduction synthesis of antimicrobial silver nanoparticles in non-specialized facilities. *BMC Research Notes*. BioMed Central Ltd., 12(1). doi: 10.1186/s13104-019-4813-z
- Vázquez-Muñóz, R., Meza-Villezcás, A., Fournier, P. G. J., Soria-Castro, E., Juárez-Moreno, K., Gallego-Hernández, A. L., Bogdanchikova, N., Vázquez-Duhalt, R., and Huerta-Saquero, A. (2019). Enhancement of antibiotics antimicrobial activity due to the silver nanoparticles impact on the cell membrane. *PLOS ONE*, 14(11). doi: 10.1371/journal.pone.0224904
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797). doi: 10.1038/35021219
- Wang, L., Ling, Y., Jiang, H., Qiu, Y., Qiu, J., Chen, H., Yang, R., and Zhou, D. (2013). AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.004>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. v, Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kaponó, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. v, Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Kersten, R. D., Pace, L. A., Quinn, R. A., Duncan, K. R., Hsu, C.-C., Floros, D. J., Gavilan, R. G., Kleigrewé, K., Northen, T., Dutton, R. J., Parrot, D., Carlson, E. E., Aigle, B., Michelsen, C. F., Jelsbak, L., Sohlenkamp, C., Pevzner, P., Edlund, A., McLean, J., Piel, J., Murphy, B. T., Gerwick, L., Liaw, C.-C., Yang, Y.-L., Humpf, H.-U., Maansson, M., Keyzers, R. A., Sims, A. C., Johnson, A. R.,

Sidebottom, A. M., Sedio, B. E., Klitgaard, A., Larson, C. B., Boya P, C. A., Torres-Mendoza, D., Gonzalez, D. J., Silva, D. B., Marques, L. M., Demarque, D. P., Pociute, E., O'Neill, E. C., Briand, E., Helfrich, E. J. N., Granatosky, E. A., Glukhov, E., Ryffel, F., Houson, H., Mohimani, H., Kharbush, J. J., Zeng, Y., Vorholt, J. A., Kurita, K. L., Charusanti, P., McPhail, K. L., Nielsen, K. F., Vuong, L., Elfeki, M., Traxler, M. F., Engene, N., Koyama, N., Vining, O. B., Baric, R., Silva, R. R., Mascuch, S. J., Tomasi, S., Jenkins, S., Macherla, V., Hoffman, T., Agarwal, V., Williams, P. G., Dai, J., Neupane, R., Gurr, J., Rodríguez, A. M. C., Lamsa, A., Zhang, C., Dorrestein, K., Duggan, B. M., Almaliti, J., Allard, P.-M., Phapale, P., Nothias, L.-F., Alexandrov, T., Litaudon, M., Wolfender, J.-L., Kyle, J. E., Metz, T. O., Peryea, T., Nguyen, D.-T., VanLeer, D., Shinn, P., Jadhav, A., Müller, R., Waters, K. M., Shi, W., Liu, X., Zhang, L., Knight, R., Jensen, P. R., Palsson, B. Ø., Pogliano, K., Lington, R. G., Gutiérrez, M., Lopes, N. P., Gerwick, W. H., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., and Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 34(8). doi: 10.1038/nbt.3597

World Health Organization. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. In WHO. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.009

Willforss, J., Chawade, A., and Levander, F. (2019). NormalizerDE: Online Tool for Improved Normalization of Omics Expression Data and High-Sensitivity Differential Expression Analysis. *Journal of Proteome Research*. American Chemical Society, 18(2). doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00523

Workentine, M. L., Harrison, J. J., Weljie, A. M., Tran, V. A., Stenroos, P. U., Tremaroli, V., Vogel, H. J., Ceri, H., and Turner, R. J. (2010). Phenotypic and metabolic profiling of colony morphology variants evolved from *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Environmental Microbiology*, 12(6). doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02185.x

World Health Organization. (2022), March 30. Cholera. Retrieved June 29, 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cholera>

Xia, J. and Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, 6(6). doi: 10.1038/nprot.2011.319

Xu, L., Wang, Y. Y., Huang, J., Chen, C. Y., Wang, Z. X., and Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. In *Theranostics* (Vol. 10, Issue 20). Ivyspring International Publisher. doi: 10.7150/thno.45413

Yildiz, F. H. and Visick, K. L. (2010). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(3). doi: 10.1016/j.tim.2008.12.004

Anexos

Anexo A

Protocolo: Parámetros de procesamiento detallados usados en todos los *pipelines*.

Como primer acercamiento, los archivos raw.d patentados se convirtieron al formato .mzXML de código abierto con MSConvert versión 3.0 (Holman et al., 2014) y luego se importaron a MZmine 2.53 (Olivon et al., 2017) para la selección de picos. Se realizó la detección de masas, construcción y desconvolución de cromatogramas (algoritmo ADAP), agrupación de isótopos, alineación de los picos y *gap-filing* (para detectar picos y espectros perdidos durante la alineación inicial) para generar una lista de metabolitos o picos potenciales. Descartamos picos de la lista si: a) se detectaron en la fase móvil y; b) estaban presentes en menos de dos muestras. La lista final de picos filtrados o la tabla de cuantificación (áreas de pico alineadas entre grupos) se exportó como un archivo .csv para un análisis estadístico adicional y patrones de fragmentación (MS2) en formato .mgf para la anotación de compuestos y clases químicas.

A continuación, la tabla de cuantificaciones se envió a NormalyzerDE 1.5.4 (Willforss et al., 2019) con fines de normalización (es decir, eliminar las fuentes de variabilidad específicas de la plataforma entre las muestras). Elegimos el algoritmo de normalización CyclLoess porque redujo de mejor manera la variación entre grupos e intragrupos en comparación con los otros algoritmos disponibles. Luego, exportamos la lista de abundancias de los picos normalizadas a Metaboanalyst 5.0 (Pang et al., 2021) para realizar un análisis estadístico multivariado (PCA, y visualización de *Heat-map*). Filtramos los picos con una desviación estándar relativa (RSD) >25 % en muestras de control de calidad para retener datos altamente reproducibles. Para la visualización de PCA y *Heatmap*, los datos se transformaron en Log 2. El análisis estadístico univariante se realizó con NormalyzerDE 1.5.4 para determinar los metabolitos significativamente perturbados por el tratamiento con AgNP, utilizando como valores de corte; a $p < 0,05$ (prueba t del paquete de Limma) y *fold-change* log₂ de $\pm 0,58$. El patrón de superposición de los metabolitos desregulados se determinó mediante el gráfico *Up-Set* utilizando el paquete R alterado (Conway et al., 2017).

Finalmente, los archivos .mzXML se cargaron en la plataforma GNPS para realizar la creación de redes moleculares clásicas (Aron et al., 2020) y la anotación estructural automatizada (contra las bibliotecas espectrales públicas de GNPS) (clasificación MSI, nivel 2) (Schymanski et al., 2014). Para ampliar la

anotación putativa de metabolitos (clasificación MSI, nivel 3) que no se logró mediante la coincidencia espectral, empleamos las herramientas de anotación *in-silico* en MolDiscovery (Cao et al., 2021) y SIRIUS (Dührkop et al., 2019) a través de la plataforma de GNPS y SIRIUS GUI versión 4.9.12, respectivamente. Para MolDiscovery, se analizó el archivo .mgf agrupado recuperado de *Classical Molecular Networking*. Los parámetros fueron los siguientes: tolerancia de masa de iones precursores y fragmentos, 0,02 Da; carga máxima, 2; DB predefinido, AllDB (720K compuestos). Para SIRIUS, usamos el archivo .mgf de MZmine. Primero, determinamos la composición elemental de los picos usando SIRIUS y los volvimos a clasificar con el algoritmo ZODIAC (Ludwig et al., 2020). Luego, para la anotación de estructuras *in-silico*, usamos CSI:FingerID (Dührkop et al., 2015). La composición elemental y la anotación estructural se realizaron utilizando información de bases de datos biológicas y estableciendo posibles aductos; pérdida de protones, sodio, potasio, amonio y agua. La asignación de clases químicas se realizó a través de CANOPUS (Dührkop et al., 2021), con base en la ontología química de ClassyFire (Djoumbou Feunang et al., 2016). Para acelerar los tiempos de ejecución, seleccionamos solo compuestos <850 Da. Se eliminaron del análisis los contaminantes comunes (por ejemplo, plastificantes, silanos), que contienen boro y las anotaciones de baja precisión de masa >10 ppm. Las estructuras moleculares se dibujaron utilizando ChemDraw Professional versión 16.0.1.4. Realizamos un análisis de enriquecimiento químico por ChemRICH (Barupal and Fiehn, 2017) usando los metabolitos perturbados anotados para traducir el metaboloma alterado a procesos bioquímicos. Este análisis utiliza la ontología MeSH (Lowe and Octo Barnett, n.d.) para la anotación de clase química enriquecida. Para observar si las AgNP indujeron los mismos cambios bioquímicos en ambas formas de vida de *Vibrio*, comparamos los perfiles de clase química de los picos perturbadas por tratamiento en ambas formas de vida, utilizando el gráfico *UpSet* con el paquete *complexUpset* en R (Michał Krassowski, 2021).

Anexo B

Tabla 1. Descripción de los softwares y páginas web

SOFTWARE	DESCRIPCIÓN
Mzmine versión 2.53	Software de código abierto para procesar datos crudos de MS para la selección de picos, lo que significa asignar información cuantitativa a los metabolitos utilizando el área bajo la curva de los picos, en función de la información extraída del cromatograma.
Normalyzerde	Herramienta en línea basada en un programa escrito en R para la selección de métodos de normalización y análisis estadístico de datos multivariados.
Metaboanalyst 4.0	Plataforma de un programa escrito en R para análisis estadístico multivariado y univariado de datos cuantitativos multivariados.
Global natural products social molecular networking web platform	Base de datos de metabolómica basada en espectrometría de masas constantemente enriquecida y seleccionada por los usuarios, en donde se pueden depositar datos sin procesar de proyectos, agregar metadatos para reanálisis y anotar compuestos en diferentes niveles de confianza.
Moldiscovery	Herramienta de anotación que utiliza un algoritmo de fragmentación <i>in-silico</i> basado en gráficos para asignar subestructuras moleculares en MS2.
Csi: fingerid	Herramienta de anotación basada en la construcción y alineación de huellas dactilares moleculares mediante la predicción de subestructuras en árboles de fragmentación.
Canopus	Algoritmo entrenado en machine-learning para asignar una clasificación química a un MS2 basado en huellas dactilares moleculares construidas con CSI:FingerID.
Sirius	Algoritmo de reclasificación basado en el muestreo de Gibbs y estadísticas bayesianas para la anotación de fórmulas moleculares.
Chemrich	Herramienta en línea para el análisis de enriquecimiento químico, una prueba estadística que muestra las clases químicas representadas en un conjunto de metabolitos diferencialmente abundantes.

Anexo C

Tabla 2. Descripción del análisis estadístico

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	DESCRIPCIÓN
<p>QC desviación estándar relativa > 25% filtro</p>	<p>Paso de filtrado basado en la variación de la abundancia de los picos en el grupo de control de calidad. Si la desviación estándar relativa es mayor que un valor límite (por ejemplo, 25 % de la media), la característica se elimina de la matriz.</p>
<p>Fold change ≥ 1.5 or $\leq 1/1.5$</p>	<p>Es la proporción de la abundancia de un pico relativa a un grupo de referencia. Por ejemplo, el metabolito X tiene una abundancia de 100 unidades en un grupo de control, en contraste con una abundancia de 200 unidades del mismo metabolito en el grupo experimental.</p> <p>Calculamos:</p> <p>fold change = $200/100 = 2$</p> <p>Esto significa que hay un cambio de 2 veces en la abundancia del metabolito X en el grupo experimental en comparación con el grupo de control.</p>
<p>P-value < 0.05 limma test</p>	<p>La probabilidad de obtener el mismo valor medido basado en la premisa de una hipótesis nula correcta.</p>