

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.



NANOPARTÍCULAS COMBINADAS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENtido
PARA EL CONTROL DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA.

POR:

QBP. MAURICIO ROBERTO MORENO HERNÁNDEZ

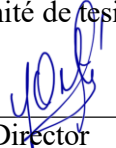
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN DE MICROBIOLOGÍA

LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE
MICROORGANISMOS.

2025

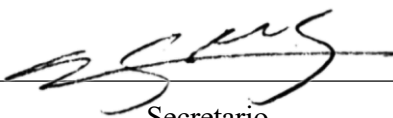
“Nanopartículas combinadas con oligonucleótidos antisentido para el control de *Escherichia coli* enteropatógena”.

Comité de tesis



Director

Dra. Yaraymi Ortiz Reyes



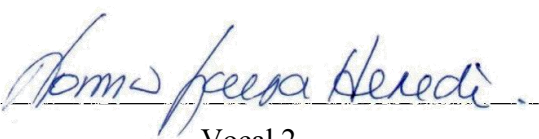
Secretario

Dr. Eduardo Franco Frías



Vocal 1

Dr. Jorge Castro Garza



Vocal 2

Dra. Norma Heredia Rojas



Vocal 3

Dr. José Santos García Alvarado



Subdirección de Posgrado

Dra. Katiushka Arévalo Niño

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

El presente trabajo fue financiado por ProACTI – 2023 - 2024, UANL.

Clave del proyecto 48 BYQ

Agradecimientos

Le agradezco muchísimo a la Dra. Norma y al Dr. Santos, al ver algo especial en mí y darme la oportunidad de trabajar en LABGEM, que desde el principio hicieron de mi estancia, algo realmente extraordinario. Por ayudarme a crecer personalmente y por darme las herramientas necesarias para a un futuro microbiólogo, gracias Doctores.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, donde cada quien aportaron su granito de arena para forjar todo mi conocimiento y habilidades.

Y, por último, agradezco infinitamente la Dra. Yara, que me faltarían hojas para agradecerle como me gustaría. Agradezco todo su apoyo brindado, todo su conocimiento heredado, por su paciencia infinita, por enseñarme de su cultura, por los buenos momentos, por ser fuente inagotable de inspiración y por siempre ver la luz al final del túnel. Sin usted, esto no existiría.... Mil millones de gracias, Dra. Yara.

Dedicatoria

Para mi querida madre, que desde que tengo memoria, apoyo mis sueños, me impulso a cumplirlos y jamás dudo por un segundo en que los conseguiría y quien, hasta la fecha, lo sigue haciendo. A quien me enseñó a ser un individuo, inspirándome siempre de ella.

Para mi hermano, quien, a su manera, está conmigo siempre.

Para mi querida Adri, quien estuvo conmigo cuando no lo conseguí, y quien estará cuando lo culminaré. Por ser un ser tan divino, tan lleno de luz, mi pilar humano, por ayudarme a descubrir mi máximo potencial, así como también ayudarme a tener los pies sobre la tierra. Porque es el ser más humano que existe y que por ella, aprendí a serlo yo también.

Para toda mi familia. Mi abuelita Rosy, que de su elocuencia aprendí. A mi abuelo Pancho, que sé que, donde quiera que este, me estará viendo. A mis padrinos, a mis primos Leo y Yaya que siempre los recuerdo con cariño. A mi abuelo Beto, que, aunque la comunicación fue nula, su inteligencia siempre fue fuente de inspiración mía. Y a todas aquellas personas que en algún momento me extendieron su mano.

A mis amigos, Ricky, Andy, Palomino, que son motor importante en mi sentir, que me ayudan a vivir, a digerir y a divertirme en esta vida. A Carito, Eli y Brendis, que, gracias a ellas, le dieron color y brillo a mi estancia en el lab, haciéndolo increíble, divertido, ameno, además de ser fuente inagotable de conocimiento, sin ellas, la tesis jamás hubiera sido tan placentera.

A todas aquellas personas que contribuyen a la ciencia, que ha lo largo de muchas vidas, sembraron en mi esa hambre de conocimiento y el saber el “Porqué” de las cosas. A todos aquellos que ponen empeño y cerebro para avanzar juntos como humanidad. A aquellas personas que inspiran a otros a adentrarse en este mundo y en especial, a aquellos que por muchas razones simplemente no lo están.

Y por último, a mi Padre...

Índice

Índice de tablas.....	7
Índice de figuras.....	7
Lista de símbolos y abreviaturas	8
1 Resumen	10
Abstract	11
2 Introducción	12
3 Antecedentes	14
3.1.-Clasificación y patogenicidad de las <i>E. coli</i> enteropatógenas.....	14
3.1.1.- <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	14
3.1.2.- <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	15
3.1.3.- <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	16
3.2.- Epidemiología actual de <i>E. coli</i>	16
3.3.- Papel de la proteína RecA en la evolución genómica de <i>E. coli</i>	17
3.3.1.- RecA como parte de la estrategia Eco-Evo	19
3.4.- Características de los ASO.....	20
3.4.1.- Estructura química	21
3.4.2.- Características del blanco o target antisentido.....	22
3.5.- Terapia génica mediante ASO.....	22
3.6.- Nanoestructuras de ZIF-8 como potenciador de efectividad de los ASO.....	23
4 Hipótesis.....	25
5 Justificación.....	25
6 Objetivos	26
6.1.- Objetivo general	26
6.2.- Objetivos Específicos.....	26
7 Materiales y métodos.....	27
7.1.-Condiciones del cultivo.....	27
7.2.- Diseño de ASO.....	27
7.3.-Nanoacarreador ZIF-8 y su interacción con ASO.....	27
7.3.1-Microscopía de fluorescencia.....	28
7.3.2-Microscopía electrónica de barrido.....	28
7.4.-Efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-recA en algunos factores de virulencia de <i>E. coli</i>	28
7.4.1- Viabilidad.....	28
7.4.2.-Movilidad tipo swarming.....	28
7.4.3.-Producción de biopelículas.....	29
7.5.- Análisis de expresión de genes	29
7.6.-Análisis Estadístico.....	30
8 Resultados	31
8.1. Nano-ensamblaje de ZIF-8/ASO/ARNm-recA.	31
8.2.- Efecto del compuesto ZIF-8/ASO/ARNm-recA en viabilidad bacteriana.....	32
8.3.- Impacto de ZIF-8/ASO/ARNm-recA en el silenciamiento del gen recA.....	33
8.4.- Movilidad tipo swarming.....	34
8.5.- Producción de biopelículas.....	35
8.6.- ZIF-8/ASO/ARNm-recA vs. expresión de genes asociados a producción de toxinas en <i>E. coli</i> ..	36
9 Discusión.....	38
Conclusiones.....	42
Perspectivas.....	42
Referencias.....	43

Índice de tablas

Tabla 1	Oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión de los genes <i>recA</i> y los relacionados a la producción de toxinas en EHEC, EAEC y ETEC	30
Tabla 2	Efecto de ZIF-8/ASO en la expresión de genes relacionados a la producción de toxinas en patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénica.....	37

Índice de figuras

Figura 1	El sistema de respuesta SOS. El estrés inducido por antibióticos conduce a la activación de RecA, que estimula la autoescisión del represor LexA y la posterior activación de los genes SOS.	18
Figura 2	Mecanismo de acción de los ASO a) ASO como obstáculo estérico que afecta la progresión de la traducción de proteínas y no es reconocido por la RNasa H b) Degradación del dúplex ASO/ARNm reconocido y degradado por la RNasa H.....	20
Figura 3	Estructura de los ASO dirigidos a las posiciones 734 y 880 del gen <i>recA</i> en <i>E. coli</i> K-12, EHEC, EAEC y ETEC.....	27
Figura 4	Nano-ensamblaje de ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> a) Microscopía de fluorescencia 100X realizada a muestras de ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> y la nanoestructura original de ZIF-8 teñidas con SYTO 9.....	31
Figura 5	Estructura identificada mediante microscopía electrónica a) ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> , b) ZIF-8.....	32
Figura 6	Efecto del compuesto ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> en la viabilidad de <i>E. coli</i>	33
Figura 7	Análisis de la expresión del gen <i>recA</i> en <i>E. coli</i> K-12, EHEC, EAEC y ETEC post-tratamiento con ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i>	34
Figura 8	Efecto de ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> en la motilidad tipo swarming de <i>E. coli</i> , a) fotografía de la motilidad tipo swarming de bacterias pre-expuestas al compuesto génico por 3 h; b) migración de los cultivos tratados (cm) a 3, 6 y 24h de pre-exposición.....	35
Figura 9	Efecto de ZIF-8/ASO/ARNm- <i>recA</i> en la producción de biopelículas de <i>E. coli</i> . La expresión del control no tratado se normalizó a 1, >1 indica sobreexpresión, <1 indica inhibición.....	36

Lista de símbolos y abreviaturas

ASO	Oligonucleótidos antisentidos
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ZIF-8	Zeolita biomineralizada con zinc
Eco/Evo	Ecología y evolución
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SOS	Respuesta SOS bacteriana
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
SUH	Síndrome urémico hemolítico
A/E	Del inglés, Attaching and effacement
LEE	Del inglés, Locus of enterocyte effacement
CFs	Del inglés, colonization factors
ST	Enterotoxina Termo estable
LT	Enterotoxina Termo lábil
FAA	Fimbria de Adherencia Agregativa
CDC	Del inglés, Centers for disease Control and Prevention
pb	Pares de bases
ATP	Adenosiltrifosfato
PCR	Del inglés, polymerase chain reaction
qPCR	Del inglés, quantitative polymerase chain reaction
FDA	Del inglés, Food and Drug Administration.
°C	Grados celsius
ICC	Caldo Infusión Cerebro Corazón
h	Hora
RNasa H	Ribonucleasa H

mL	Mililitro
ng	Nanogramo
LB	Caldo Luria Bertani
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minutos
%	Porcentaje
μL	Microlitros
mm	Milímetro
V	Voltios
ms	Metros por segundo
μg	Microgramos
μM	Micromoles
mM	Milimolar
U	Unidades internacionales
c.s.	Cantidad suficiente
s	Segundos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Cq	Ciclo
UFC	Unidades formadoras de colonias
cm	Centímetros
nM	Nanomolar
p	Del inglés, p-value
<	Menor que
>	Mayor que
IBF	Índice de formación de biopelícula
sRNAs	Cadena simple de Ácido ribonucleico pequeño
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina

1 Resumen

La plasticidad genómica identificada en *Escherichia coli* ha permitido el desarrollo de seis patotipos bacterianos asociados a diarrea, con mecanismos de patogénesis diversificados; para los cuales la terapia antibiótica es un tema controversial. Debido a esto en el presente trabajo se diseñó una terapia génica basada en oligonucleótidos antisentido (dirigidos al gen *recA*) acarreados por la nanoestructura de ZIF-8; con el objetivo de controlar factores de virulencia inherentes a este patógeno. Para esto se expusieron las cepas de *E. coli*: K-12, enterohemorrágica, enteroagregativa y enterotoxigénica a 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por 3, 6 y 24 h para determinar la viabilidad bacteriana por cuenta en placa; la motilidad tipo swarming en agar suave; la producción de biopelículas mediante el uso de cristal violeta y la expresión del gen *recA* y otros genes relacionados a la producción de toxinas. Las concentraciones más efectivas se detectaron después de pre-exponer los cultivos a 64 y 128 nM/mL del compuesto por 24 h. En la mayoría de las cepas en estudio se inhibió la expresión del gen *recA* (de 0.029 a 0.92 veces; $p < 0.05$); además, redujeron el crecimiento ($\bar{x} = 5.26 \pm 1.0$ UFC Log10/mL; control $\bar{x} = 8.4 \pm 0.2$ UFC Log10/mL; $p < 0.05$), la motilidad tipo swarming ($\bar{x} = 1.6 \pm 1.1$; control $\bar{x} = 4.0 \pm 0.3$; $p < 0.05$) y la producción de biopelículas ($\bar{x} = 0.72 \pm 0.16$ veces; control normalizado a 1; $p < 0.05$), esta última con excepción de EAEC que promovió este factor de virulencia hasta 1.78 veces. Adicionalmente, se identificó que 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 24 h, inhibió la expresión de los genes relacionados a la producción de toxinas como *stx2* (0.01 veces); *lt* (0.02 veces), y *pic* (0.04 veces), ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento del gen *recA* mediante ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* reduce la expresión de algunos factores de virulencia en al menos tres patotipos de *E. coli*. El trabajo muestra resultados prometedores para una potencial terapia de genes dirigida a *recA* para el control de patógenos relevantes en la industria de alimentos y la salud pública.

Abstract

The genomic plasticity identified in *Escherichia coli* has facilitated the development of six bacterial pathotypes linked to diarrhea, each exhibiting distinct pathogenesis mechanisms. Consequently, antibiotic therapy for these pathotypes remains a subject of ongoing debate. In this study, a gene therapy utilizing antisense oligonucleotides (targeting the *recA* gene) delivered via the ZIF-8 nanostructure was designed to effectively control certain virulence factors associated with this pathogen. *E. coli* strains: K-12, enterohemorrhagic, enteroaggregative and enterotoxigenic were pre-exposed to 16, 32, 64 and 128 nM/mL of ZIF-8/ASO/mRNA-*recA* for 3, 6 and 24 h to determine bacterial viability by plate counting; assess swarming motility on soft agar; quantify biofilm production using crystal violet; and measure the expression of the *recA* gene and other toxin-related genes. The most effective concentrations were detected after pre-exposing cultures to 64 and 128 nM/mL of ZIF-8/ASO/mRNA-*recA* for 24 h. The results showed that in most of strains studied, the expression of the *recA* gene was inhibited (0.029- to 0.92-fold; $p < 0.05$); also a reduction was observed in: growth ($\bar{x} = 5.26 \pm 1.0$ CFU Log10/mL; control $\bar{x} = 8.4 \pm 0.2$ CFU Log10/mL; $p < 0.05$), swarming motility ($\bar{x} = 1.6 \pm 1.1$; control $\bar{x} = 4.0 \pm 0.3$; $p < 0.05$) and biofilm production ($\bar{x} = 0.72 \pm 0.16$ -fold; control normalized to 1; $p < 0.05$). The only exception was with the enteroaggregative *E. coli*, which promoted biofilm production up to 1.78-fold. The addition of 128 nM/mL ZIF-8/ASO/mRNA-*recA* for 24h inhibited the expression of toxin-related genes: *stx2* (0.01 times); *lt* (0.02-fold), and *pic* (0.04-fold), ($p < 0.05$). This study demonstrated the relevance of silencing the *recA* gene by ZIF-8/ASO/mRNA-*recA* in *E. coli* pathotypes. These promising results indicate a significant efficacy of our genic compound to control pathogens relevant to the food industry and public health.

2 Introducción

La dispersión en el ambiente de genes de virulencia y resistencia a antibióticos entre las bacterias patógenas, comensales y ambientales, se prevé que impactará negativamente en las opciones profilácticas y terapéuticas para humanos y animales durante los siguientes 50 años (Larsson et al., 2022). Por esta razón, necesitaremos alternativas urgentes para controlar o disminuir a estos microorganismos.

En específico, *Escherichia coli* durante su proceso de cohabitar con diferentes especies, ha evolucionado convirtiéndose algunas de sus cepas en patógenos con alta plasticidad genómica, causando daño en la salud de sus hospederos. Actualmente se conocen seis patotipos de *E. coli* enteropatógena (afecta el intestino) con factores de virulencia y perfil de resistencia a antimicrobianos diferentes entre ellos. Esto provoca manifestaciones clínicas y respuestas adaptativas muy variadas entre patotipos como agentes causales.

La diversa producción de toxinas que se han identificado en estas cepas, así como la capacidad de movilidad, adhesión a células epiteliales, producción de biopelículas y adquisición de genes de resistencia han sido elementos de interés científico durante décadas. Estas características confirieron a las *E. coli* diarreogénicas mayor persistencia, incluso en ambientes poco favorables (Farfán et al., 2016; García & Fox, 2021). Sin embargo, esos mecanismos de patogénesis e índices de resistencia a antimicrobianos tan diferentes entre patotipos, dificultan el desarrollo de blancos farmacológicos que controlen a todos de manera simultánea (Croxen et al., 2013).

En ese sentido, la proteína RecA ha sido reconocida como un blanco farmacológico al utilizar la herramienta Eco-Evo (Ecología-Evolución, Baquero et al., 2011) para el control profiláctico de la dispersión de genes de resistencia a antibióticos. Algunos autores refieren que RecA juega un papel determinante en la expresión de la virulencia de bacterias patógenas (Pavlopoulou, 2018), debido a su participación en la reparación de ADN, donde interviene de modo directo en las rutas metabólicas relacionadas a la respuesta SOS bacteriana, no reportándose moléculas que puedan inhibir a RecA en el citoplasma bacteriano (Petrova et al., 2009).

En ese sentido, a diferencia de los antibióticos tradicionales que tienen mecanismos de acción dirigidos a un proceso celular específico, los ASO (del inglés, antisense oligonucleotides) pueden tener como blanco cualquier ARNm mediante la complementación

de secuencias, ampliando la selección disponible de posibles objetivos terapéuticos. En teoría, esto permitiría no sólo matar las bacterias objetivo, sino también modificar sus funciones de virulencia, incluida la mitigación de la producción de toxinas y la interrupción de vías metabólicas, al tiempo que minimiza las alteraciones ecológicas intestinales del hospedero (Tarn et al., 2021).

Aunque se ha demostrado la efectividad del uso de ASO para la inhibición del ARNm de interés en células eucariotas (Roy et al., 2023), su aplicación para células procariotas está limitado. Los principales obstáculos han sido la restricción del paso de ASO a través de la membrana citoplasmática, así como su fácil degradación. Para dar solución a esto, estudios recientes proponen el uso de nanopartículas de zeolita (ZIF-8) biomineralizada y encapsulada con enzimas como acarreadores de moléculas (Zhang et al., 2023); así como la incorporación de fosforotioato en algunos enlaces del ASO para mejorar su estabilidad, ampliando así los fines terapéuticos.

La experiencia de nuestro laboratorio en el estudio de moléculas como blancos para el control de la virulencia de patógenos dilucidando posibles mecanismos de acción (García-Heredia et al., 2016; Ortiz et al., 2021), nos lleva a proponer el uso de nanopartículas de ZIF-8 combinado con ASO usando como blanco farmacológico el ARNm de la proteína RecA, para el control de la virulencia de tres patotipos de *E. coli* enteropatógenas. En general, la presente propuesta nos permitirá forjar las bases para el desarrollo futuro de principios activos basados en nanopartículas de ZIF-8 / ASO que ayuden en el control de la virulencia de estas bacterias.

3 Antecedentes

3.1.-Clasificación y patogenicidad de las *E. coli* enteropatógenas.

Escherichia coli es una bacteria que forma parte del microbioma intestinal en animales y humanos facilitando su transmisión por vía fecal/oral, así como eventos de recombinación genética. Aunque la mayoría de las cepas son comensales, por ende, no patógenas, algunas pueden causar severas infecciones. Cuando estas cepas causan daño al intestino se conocen como enteropatógenas o diarreogénicas y se clasifican en los patotipos de *E. coli* enteropatógeno (EPEC), enteroinvasivo (EIEC), enterotoxigénico (ETEC), de adherencia difusa (DAEC), enteroagregativo (EAEC) y enterohemorrágico (EHEC).

Los factores de virulencia que provocan manifestaciones clínicas y respuestas adaptativas en estas cepas presentan una gran diversidad (Farfán et al., 2016; García & Fox, 2021). Teniendo en cuenta el alcance del trabajo consideramos de interés describir los mecanismos de patogenicidad de los patotipos EHEC, ETEC y EAEC.

3.1.1.- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

EHEC se caracteriza por producir toxinas Shiga (Stx, clasificadas en Stx1 y Stx2) y habitar en el tracto gastrointestinal del ganado bovino, siendo su principal reservorio. Este patógeno zoonótico de gran importancia en la salud pública y veterinaria, causa dolor abdominal, diarrea sanguinolenta y fiebre en humanos, y en algunos casos puede provocar severas consecuencias como SUH (Síndrome Urémico Hemolítico; Nguyen & Sperandio, 2012).

El mecanismo de patogenicidad de EHEC inicia con la adhesión. Enseguida el sistema de secreción tipo III (del inglés, T3SS) de la bacteria ingresa la proteína Tir a la célula eucariota para que funcione como receptor de intimina. Esta última, ubicada en la membrana externa bacteriana al unirse a Tir permite la fijación inicial a los enterocitos, lo que produce lesiones A/E (del inglés, attaching and effacing), que implica extenso daño a las microvellosidades reduciendo la absorción de nutrientes (Fitzhenry et al., 2002). Los factores que participan en la formación de la lesión se codifican en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, Locus of enterocyte effacement).

Este patotipo además produce las toxinas Stx1 y/o Stx2 que son inmunológicamente diferentes y en la que Stx2 es más asociada a los casos de SUH (Friedrich et al., 2002). Ambas toxinas están compuestas por una subunidad A que tiene dos fragmentos, A1 con actividad

enzimática y A2 que se une a la subunidad B. Este último es el pentámero encargado de la unión al receptor Globotriaosilceramida 3 (Gb3) de la célula hospedera. Existen otros factores como EspP que estimulan la reorganización de actina en ausencia de receptores, permitiendo la entrada de Stx al enterocito por medio de macropinocitosis para atravesar la célula y alcanzar la circulación sanguínea. Una vez distribuida por el organismo Sxt encuentra el receptor Gb3, entra a las células y se dirige al complejo de Golgi, donde se separan las subunidades A y B. La subunidad A se dirige al ribosoma para bloquear la síntesis de proteínas y producir la muerte celular (Farfán et al., 2016).

3.1.2.- *E. coli enterotoxigénica (ETEC)*.

ETEC es agente causal de diarrea aguda en infantes, se estima que produce mil millones de casos de diarrea al año y la mortalidad atribuible en este grupo etario en 2015 fue de 23 600 (Hosangadi et al., 2019). Los síntomas pueden presentarse como diarrea leve, sin presencia de moco o sangre; o diarrea profusa causando deshidratación grave. Algunos casos presentan cefalea y vómito (Qadri et al., 2005).

Los mecanismos de patogenicidad de ETEC se enfocan en la presencia de factores de virulencia como los CFs (del inglés, colonization factors), responsables de la unión bacteriana a receptores de los enterocitos (fibronectina, glicoesfingolípidos y glicoproteínas), permitiendo su colonización. Además, produce las enterotoxinas termoestable ST (del Inglés, heat-stable enterotoxin) y termolábil LT (del inglés, heat-labile enterotoxin). La ST se une a la guanilato-ciclasa-C y aumenta el GMP cíclico causando diarrea aguda. Además, se conoce que inhibe la síntesis de ADN en líneas celulares de cáncer de colon (Sato & Shimonishi., 2004).

Por otro lado, existen dos tipos de LT (LT-I y LT-II, ambas con subunidades A-B) de las cuales LT-I está directamente asociada a aislados de origen humano. La LT se secreta en vesículas de la membrana externa que se unen al gangliósido GM1 e ingresan al citoplasma por endocitosis. La subunidad LT-A1 ribosila los nucleótidos de guanina y activa la adenilatociclasa, lo que aumenta el AMP cíclico y estimula la secreción de cloruro y electrolitos, causando diarrea acuosa (Clements et al., 2012).

3.1.3.-*E. coli* enteroagregativa (EAEC).

EAEC es causante de diarrea aguda o persistente en adultos y niños, destacando su presencia en países en vías de desarrollo se identifica con frecuencia en cuadros diarreicos de personas de países industrializados. Este patotipo se adhiere a la mucosa intestinal, la coloniza y produce un efecto citotóxico que causa diarrea de tipo acuosa con secreción de moco (Franca et al., 2013).

Puede colonizar el intestino después de adherirse a los enterocitos mediante la fimbria de adherencia agregativa (FAA/I), la cual permite formar un patrón en forma de ladrillos apilados. Ese efecto se produce por la presencia de factores de virulencia codificados en el plásmido pAA (plásmido de adherencia-agregativa) que son regulados por el activador transcripcional AggR. Entre estos factores se encuentran FAA/I, Irp2 (del inglés, yersiniabactin biosynthesis), ShET1 (enterotoxina), Fis (proteína de unión al ADN), YafK (promueve la formación de biopelículas) y el sistema de secreción tipo VI. Además, hay otras proteínas de la membrana externa como Hra-1, Hra-2 y Tia que participan en la adhesión e invasión (Nishi et al., 2003).

Las enterotoxinas, aunque no son reguladas por AggR, son un factor de virulencia importante. Aquí se incluyen la enterotoxina EAST1, (afecta el transporte de iones y el nivel de GMPc) y las proteínas SPATEs (serina proteasas auto-transportadoras). Estas últimas pueden ser citotóxicas como: Pet, EspP, Sat y SigA o no citotóxicas como: Pic y SepA, que modulan la producción de moco y la inflamación intestinal (Navarro et al., 2010).

3.2.- *Epidemiología actual de E. coli*

Las infecciones por estas cepas con frecuencia tienen su origen por la ingesta de agua y alimentos contaminados, afectando humanos y animales a nivel mundial (Croxen et al., 2013; Yang et al, 2017). En específico EHEC es el patotipo más asociado a brotes y fue identificado por primera vez en un paciente con diarrea sanguinolenta y trastorno gastrointestinal en 1982 conduciendo a una pandemia mundial (Welinder & Kaijser, 2005). Los productos asociados con esta infección son cárnicos poco cocidos, jugo de manzana no pasteurizado, leche o verduras crudas como lechuga y brotes de soja (Prado-Silva et al., 2015).

El serotipo más importantes de EHEC es O157:H7 que ha ocasionado graves problema de salud en Japón, Europa y América del Norte (Van-Hoek et al., 2019). Otro serotipo reconocido por su virulencia es el O104:H4 asociado a un brote de SUH por el consumo de alimentos en Alemania en 2011, donde se determinó era híbrido EHEC-EAEC (Kampmeier et al., 2018).

Los CDC (del inglés, Centers for Diseases Control and Prevention) estimó que *E. coli* O157:H7 transmitida por los alimentos es responsable de más de 63,000 infecciones al año llevando a más de 2,100 hospitalizaciones y muertes en los Estados Unidos. Por su lado ETEC también afecta niños menores de dos años y según los informes de la Organización Mundial de la Salud, causa anualmente más de 157,000 casos de diarrea humana que conducen a la muerte (Buuck et al., 2020). EAEC se ha considerado un patógeno emergente transmitido por los alimentos asociados principalmente con diarrea infantil persistente aguda y retraso del crecimiento (Rogawski et al., 2017).

El riesgo de consumir alimentos contaminados, la falta de acceso al agua potable y la pésima atención médica ante cualquier problema de salud, pueden ser factores principales causantes de diarrea por *E. coli* enteropatógena. Aunado a ello, las bacterias muestran mayor tolerancia hacia todas las clases de antibióticos conocidos, lo que lleva a la aparición de enfermedades infecciosas con terapia limitada (Martens & Demain, 2017). Por esa razón es importante visualizar otro enfoque contra estas infecciones destacando el uso de RecA como blanco simultáneo para las *E. coli* enteropatógenas.

3.3.- Papel de la proteína RecA en la evolución genómica de *E. coli*.

Se ha demostrado que el estrés inducido por algunos antibióticos, que desencadena la respuesta al daño del ADN bacteriano, se controla principalmente por RecA (Zgur-Bertok, 2013). Esta proteína desempeña funciones relacionadas a la recombinación homóloga y la reparación recombinacional del ADN, al catalizar la reacción de intercambio de cadenas de ADN en bacterias (Chen et al., 2008), y la proteína represora LexA (Butala et al., 2009) y por ende participa en la respuesta SOS bacteriana (Baquero et al., 2011).

En condiciones normales, el dímero LexA se une a una secuencia de ADN palindrómica de consenso de 20 pb, lo que lleva a la represión transcripcional de un regulón SOS que alberga un conjunto de más de 50 genes. Los genes de respuesta SOS se inducen de

forma temporal, donde los genes implicados en la reparación por escisión de nucleótidos (*uvrABC*) o la recombinación (*recA*) se inducen primero; mientras que los genes que codifican las ADN polimerasas propensas a errores Pol II (*polB*), Pol IV (*dinB*) y Pol V (*umuC* y *umuD*) se inducen en las últimas etapas de la reparación de la respuesta SOS. Bajo estrés antimicrobiano, RecA se activa polimerizándose alrededor del ADN monocatenario (ssDNA) expuesto para formar un filamento de nucleoproteína de una manera dependiente de ATP (Zgur-Bertok, 2013).

La actividad de la coproteasa RecA promueve la escisión autocatalítica de LexA, aliviando así la represión del regulón SOS como se describe en la Figura 1 (Butala et al., 2009). Se ha demostrado que la eliminación de *recA* en *E. coli* y *Staphylococcus aureus* resultó en una reducción significativa de la resistencia inducida por antibióticos (Singh et al., 2010). Es de destacar que el compuesto suramina inhibió eficaz y selectivamente la actividad recombinacional y coproteasa de la proteína RecA de *Mycobacterium tuberculosis*. Este compuesto también suprimió la expresión del gen *recA* inducida por antibióticos (Nautiya et al., 2014).

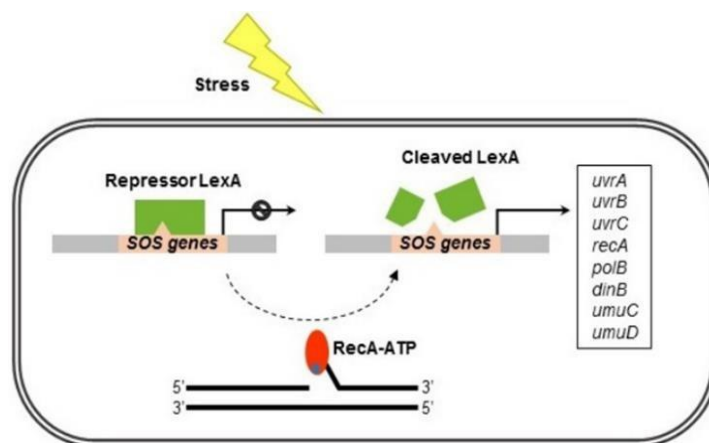


Figura 1: El sistema de respuesta SOS. El estrés inducido por antibióticos conduce a la activación de RecA, que estimula la autoescisión del represor LexA y la posterior activación de los genes SOS. Fuente de la imagen: Pavlopoulou, 2018.

Existen otros estudios de mutagénesis dirigida para revelar mutaciones de aminoácidos específicos que afectan aspectos estructurales y funcionales específicos de la proteína RecA. Adikesavan et al., (2011) demostraron que los aminoácidos E123, G165, A168, S172, R176, G212 agrupados en la interfaz extendida RecA-RecA/ADN son importantes para la formación de filamentos de nucleoproteína RecA-ADN. Las mutaciones

en estos residuos impidieron gravemente la actividad de la recombinasa RecA y la capacidad de RecA para mediar la autoproteólisis de LexA tras el daño del ADN inducido por los rayos UV (Adikesaven et al., 2011).

También se encontró que las mutaciones del aminoácido E96 (E96D), esencial en la hidrólisis del ATP durante todo el proceso de recombinación mediado por RecA, así como los residuos H97, S117, I128, N249, K250, F255, ubicados en la interfaz de la subunidad RecA, causan segregación cromosómica defectuosa y toxicidad celular en *E. coli* incluso en ausencia de inducción de respuesta SOS (Campbell & Davis., 1999). Por lo que, la supresión o atenuación del sistema de respuesta SOS mediante la inhibición preferencial de RecA se propone como una posible estrategia terapéutica para suprimir el desarrollo de multirresistencia a los antibióticos (Thi et al., 2011; Mo et al., 2016).

Sin embargo, aunque existen reportes recientes que describen a la proteína RecA como un objetivo farmacológico hipotético que potencialmente retrasa la evolución genética de la multirresistencia, aún falta profundizar en el estudio de su impacto en el control de la virulencia de los patotipos de *E. coli* (Pavlopoulou, 2018). Se conoce que algunas moléculas inhibitoras de esta proteína han limitado la captación de ADN exógeno en *E. coli*.

Además, se han propuesto como inhibidores de RecA quelatos metálicos y compuestos naftílicos polisulfatados (Wigle et al., 2009), pero no se ha podido aplicar debido a la poca permeabilidad de estas moléculas en la membrana bacteriana. Otro inhibidor estudiado es la proteína PsiB (que se une a RecA, Petrova et al., 2009), sin embargo, hay reportes de inhibición para RecA libre y no en el citoplasma bacteriano, siendo necesario encontrar nuevas alternativas para la inhibición de la síntesis de esta proteína.

3.3.1.- *RecA como parte de la estrategia Eco-Evo*

El concepto Eco-Evo es una perspectiva en la que los organismos se evalúan ampliamente a la luz de la evolución y la ecología, en lugar de limitarse a su comportamiento en el laboratorio o en la práctica clínica en relación con las infecciones humanas (Pallen & Wren, 2007). Tal perspectiva indica la necesidad de utilizar fármacos "eco- evo" que actúan no necesariamente para curar al paciente; sino para "curar" ambientes específicos de la resistencia a antibióticos y para prevenir o debilitar las posibilidades evolutivas de los elementos biológicos implicados en dicha resistencia (Baquero et al., 2011).

Las anteriores perspectivas hacen que la inhibición de la recombinación sea un blanco hipotético que debería disminuir la adquisición e integración de nuevos genes de resistencia, retrasando la evolución de las complejas estructuras genéticas implicadas en la multirresistencia. Siendo uno de sus focos de interés la proteína RecA (Baquero et al., 2011).

3.4.- Características de los ASO

El diseño racional, el costo relativamente económico y los avances en la secuenciación del genoma humano han llevado al uso de fragmentos cortos de ácido nucleico como agentes terapéuticos o herramientas para controlar la expresión de genes (Eckstein, 2014). La biotecnología ASO implica dos posibles mecanismos de acción i) la escisión (mediada por la RNasa H) del transcrito blanco, el cual se manifiesta como dúplex ARNm/ASO, y/o ii) el uso de ASO sustituido con residuos 2'-O-metilados (2'-OMe) que no es reconocido por la RNasa H y no degrada el transcrito; sin embargo, permite la inhibición de la expresión génica mediante el bloqueo estérico del ensamblaje de subunidades del ribosoma y el acceso a la unión del ARNm cerca del sitio Shine-Dalgarno y del codón de inicio (AUG, Figura 2), afectando la progresión de la traducción de proteínas (Hegarty & Stewart, 2018).

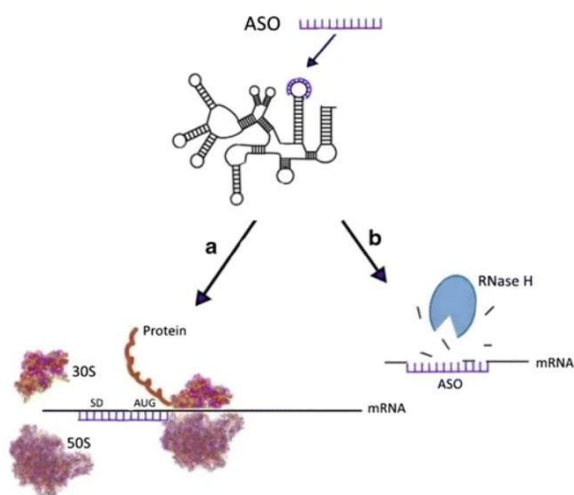


Figura 2. Mecanismo de acción de los ASO a) ASO como obstáculo estérico que afecta la progresión de la traducción de proteínas y no es reconocido por la RNasa H b) Degradación del dúplex ASO/ARNm reconocido y degradado por la RNasa H. Fuente de la imagen Hegarty & Stewart, 2018

Como consecuencia los ASO pueden atacar cualquier gen mediante la complementariedad de bases, ampliando la selección de objetivos terapéuticos. En teoría, esto permite eliminar las bacterias objetivo, o modificar sus funciones de virulencia, incluida la mitigación de la producción de toxinas, la motilidad y la producción de biopelículas. Los ASO además se ha estudiado para suprimir mecanismos bacterianos de resistencia a los antibióticos (Harth et al., 2000).

La eficacia de estas moléculas de ADN depende de la longitud del oligonucleótido, la resistencia a las nucleasas y la cinética de unión. Los obstáculos específicos que deben superarse incluyen la protección contra la degradación enzimática, el transporte a través de la barrera física de la envoltura externa bacteriana (membrana plasmática y pared celular) y las interacciones electrostáticas con la superficie celular y el ARN objetivo (Crooke, 2017).

3.4.1.- Estructura química

Los ASO tienen como media 20 nucleótidos de longitud y en su mayoría han sido optimizados con combinaciones de azúcares, y modificaciones de los extremos terminales 3' y 5' para conferir resistencia contra las nucleasas, mejorar la estabilidad del híbrido ARNm/ASO y preservar la especificidad del objetivo (Khvorova & Watts 2017). Para esto actualmente se utilizan los enlaces fosforotioato, que son ASO modificados compatibles con la escisión mediante la RNasa H. Sin embargo, en ocasiones pueden presentar una afinidad de unión reducida hacia su objetivo de ARN lo cual se puede contrarrestar mediante la incorporación de nucleótidos flanqueantes modificados con azúcar 2'-OMe. Una limitación de este último es que no permite la actividad de la RNasa H (Eckstein, 2014).

Otras modificaciones químicas de los ASO que facilitan la eficacia de las terapias incluyen:

i) Ácido nucleico peptídico, un análogo de oligonucleótidos en el que la cadena principal de azúcar del ácido nucleico se reemplaza por unidades aquirales de N-(2-aminoetil) glicina. Esto permite resistencia a proteasas y nucleasas; sin embargo, su eficacia antisentido se ve obstaculizada por una entrega intracelular deficiente (Hansen et al., 2016).

ii) Oligómeros de fosforodiamidato morfolino que están compuestos de bases de ADN estándar en las que el azúcar ribosa se reemplaza con anillos de morfolina obteniéndose una cinética de unión mejorada. Son completamente resistentes a la digestión con nucleasas y pueden soportar el tratamiento en autoclave sin degradación (Sully & Geller, 2016).

iii) Ácidos nucleicos bloqueados, son ribonucleótidos que contienen un puente de metileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' para “bloquear” los oligonucleótidos en estructuras conformacionales restringidas resultando en una mayor estabilidad y afinidades de unión (Kurreck et al., 2002).

3.4.2.- Características del blanco o target antisentido.

Un objetivo destacado en el diseño de ASO es lograr una alta especificidad con efectos mínimos adicionales. Para predecir la eficacia se seleccionan los genes de interés para el organismo objetivo y se revisa la estructura secundaria del ARNm blanco (Sully & Geller, 2016). Alterar una estructura secundaria objetivo para lograr la hibridación ARNm/ASO genera un costo termodinámico durante la unión, por lo cual es más recomendable apuntar a regiones monocatenarias abiertas y no estructuradas. Una región blanco de éxito es cerca de la región de iniciación de la traducción (codón de inicio y secuencias de Shine-Dalgarno), ya que esta área es accesible para el ensamblaje de ribosomas y sensible a la inhibición estérica (Crooke, 2017).

Además, se debe predecir aquellos efectos que puedan ocurrir fuera del objetivo. La hibridación ASO fuera del objetivo dentro de una célula generalmente ocurre solo en sitios no estructurados altamente accesibles en el ARNm. Se conoce que estas interacciones están inhibidas por estructuras de orden superior y proteínas de unión a ARN. La especificidad de ASO se puede evaluar utilizando métodos de medición cuantitativa como qPCR de genes no objetivo predichos o transcriptómica celular (Hagedorn et al., 2017).

3.5.- Terapia génica mediante ASO

El desarrollo de tecnologías de ASO como agentes terapéuticos ha llevado a la aprobación por la FDA (del inglés, Food and Drug Administration) para la comercialización el primer ASO llamado Vitravene como fármaco para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus. Su mecanismo de acción como inhibidor de los transcritos blancos puede ser bastante eficiente, alcanzando una regulación negativa de hasta el 95% de la expresión de la proteína a combatir (Egli, & Manoharan., 2023).

Referido a su uso en la terapia contra infecciones bacterianas, Harth et al. (2000) demostraron que los ASO podían producir una disminución de la expresión de genes de glutamina sintetasa y como consecuencia reducir el crecimiento de *Mycobacterium*

tuberculosis. En ese sentido, Tilley et al. (2006) reportaron regulación negativa en la expresión de un gen de proteína portadora de acilo (*acpP*) en una cepa de *E. coli*; mientras que el mismo ASO en aislados clínicos de *Burkholderia cepacia* resultó en una reducción de la viabilidad >4 Log (Greenberg et al., 2010). Doyle et al. (2001) reportaron mayor eficacia cuando el blanco se dirigía a la 5'-UTR de un gen, con longitudes de nucleótidos de 15 a 18 bases.

Otras terapias dirigidas contra la subunidad A de la ADN girasa redujeron la viabilidad de *Staphylococcus aureus* en un modelo murino de infección de herida cutánea, mejorando el tiempo de curación (Sawyer et al. 2013). De forma similar el tratamiento de *E. coli* resistente al cloranfenicol con una combinación de dos secuencias ASO redujo la supervivencia bacteriana en un 99.9 % en presencia del antibiótico (Wesolowski et al. 2011). Además, se descubrió que el uso del gen de división celular *ftsZ* de *S. aureus* como objetivo en un modelo de sepsis en ratón causó una reducción en la carga bacteriana del tejido (Meng et al., 2015). Es de destacar que algunos ASO parecen ser activos frente a múltiples patógenos Gram negativos incluso en el contexto de resistencia a los antibióticos tradicionales.

3.6.- Nanoestructuras de ZIF-8 como potenciador de efectividad de los ASO.

En la práctica, lamentablemente resulta complejo que los ASO puedan hibridarse con éxito con un ARNm específico, sugiriendo como principal limitante la accesibilidad a la célula objetivo, en especial en bacterias. Sin embargo, el ensamblaje de nanopartículas mediado por un compuesto con estructura de imidazolato zeolítico poroso (ZIF-8) se visualiza como una buena opción para funcionar como acarreador, pues se ha demostrado que permite unir a su superficie moléculas de interés como los ASO, proteínas y péptidos y de este modo llevarlo hasta el citoplasma de células eucariotas y procariotas (Zhang et al., 2023; Roy et al., 2023). La nanoestructura de ZIF-8 además, puede ser biomineralizada mediante la encapsulación con enzimas (He et al., 2023) y hasta el momento no han revelado efectos tóxicos en las células del hospedero. Esto la hace prometedora como la próxima generación a usarse para la administración de agentes terapéuticos basados en genes (Abdelhamid, 2020).

También llamado nanoportador debido a la baja toxicidad del ion zinc, ZIF-8 se ha utilizado para administrar medicamentos contra el cáncer como curcumina, doxorrubicina y

oligodesoxinucleótidos (Abdelhamid et al., 2020). Zhang et al. (2022) reportaron el uso de ZIF-8/ASO para controlar el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina a través del gen *ftsZ*, demostrando efecto bactericida y la reducción de hasta un 88% en la producción de biopelículas, sugiriendo su uso como terapia alternativa. Huang et al (2022) describieron sistemas para la liberación de ASO como alternativa no-viral, siendo que la viral ha sido favorecida debido a que usualmente no conlleva el uso de acarreadores.

Durante los últimos 3 años, la tecnología de oligonucleótidos antisentido se ha convertido en un enfoque válido para modular selectivamente la expresión genética. En la actualidad se están desarrollando numerosos ensayos terapéuticos, algunos de los cuales parecen preliminarmente alentadores (Huang et al., 2022; Zhang et al., 2022). A pesar de esto el enfoque sigue siendo dirigido en mayor medida hacia células eucariotas, con poca literatura que refiera resultados positivos para control de bacterias, pues en su mayoría no se han administrado utilizando nano-acarreadores.

En nuestro laboratorio tenemos antecedentes de trabajo y experiencia determinando la respuesta virulenta de microorganismos en presencia de concentraciones subletales de antibióticos y antimicrobianos naturales para dilucidar posibles blancos farmacológicos con sus correspondientes mecanismos de acción (García-Heredia et al., 2016; Ortiz et al., 2021). Por esa razón proponemos en el presente proyecto utilizar ASO combinados con nanopartículas de ZIF-8 (biomineralizada y encapsulada con enzimas), con blanco en el ARNm-de la proteína RecA (ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*) para el control de factores de virulencia en *E. coli* enteropatógena. Ante esto, hemos visto la oportunidad de contribuir a la ciencia aplicada a partir del estudio de ASO para caracterizar nuevos objetivos farmacológicos y compuestos terapéuticos potenciales.

4 Hipótesis

El uso de ASO dirigidos al ARNm del gen *recA* acarreados por nanoestructuras de ZIF-8 (ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*) inhibe los factores de virulencia de diversos patotipos de *E. coli* diarreogénica.

5 Justificación

Si bien la mayoría de los síntomas producidos por los patotipos de *E. coli* están relacionados con diarrea, con o sin presencia de sangre o moco, las cepas productoras de toxina Shiga pueden producir secuelas importantes como el síndrome urémico hemolítico (SUH; Gomes et al., 2016). Por otra parte, la EAEC ha sido asociada con el alza en casos de síndrome del intestino irritable. Esto último es causado por el daño en el epitelio intestinal que genera inflamación crónica y reducción de la capacidad de absorción de nutrientes (Croxen et al., 2013). En el caso de las *E. coli* patógenas, el uso de antibióticos en los cuadros diarreicos causados es controversial. Esto debido a la respuesta inductora en la producción de toxinas y a la resistencia a antibióticos reportada en la última década;

La transferencia horizontal de genes, ha conllevado a la aparición de serotipos híbridos multirresistentes como O104:H4, que generó múltiples casos de infección y para el cual estuvo muy limitada la terapia (Muniesa et al., 2012).

Estas condiciones dificultan la terapia para las cepas de *E. coli* diarreogénicas. Además, son limitadas las investigaciones basadas en la determinación de blancos farmacológicos “múltiples” para eliminar o reducir virulencia con efecto en más de un patotipo. En ese sentido la mayoría de los reportes están enfocados al control de cepas EHEC (importante en la industria de alimentos de origen animal) o blancos como la toxina Stx. Esta última se ha logrado inhibir mediante terapias alternativas con fagos, bacteriocinas, probióticos, análogos y bloqueadores del receptor de Stx (Muniesa et al., 2012; Chung et al., 2017). Sin embargo, el enfoque en el control de múltiples patotipos está muy limitado. Por esas razones proponemos estudiar una terapia alternativa no tradicional con blanco en común para los diversos patotipos de *E. coli* diarreogénica.

6 Objetivos

6.1.- Objetivo general

Determinar la influencia del compuesto ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en el control de los factores de virulencia de diversos patotipos de *E. coli* diarreogénicas.

6.2.- Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en la expresión del gen *recA* y el crecimiento de *E. coli* K-12, EHEC, ETEC y EAEC.
2. Definir el impacto de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en la motilidad tipo swarming y la producción de biopelículas de *E. coli* K-12, EHEC, ETEC y EAEC.
3. Cuantificar la expresión de genes relacionados a la producción de toxinas en EHEC, ETEC y EAEC tratadas con ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*.

7 Materiales y métodos

7.1.-Condiciones del cultivo

Se utilizaron las cepas de *E. coli* K-12 MG1655, EAEC serotipo 042 *pic*⁺; EHEC serotipo O157:H7 ATCC 43894 *stxI*⁺ y *stx2*⁺ y ETEC ATCC 35401 *lt*⁺ y *stII*⁺. Todas las cepas se mantuvieron en nuestro laboratorio a -80°C en caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) con 20% de glicerol. Fueron activadas en caldo ICC, incubadas a 37°C por 24h y posteriormente transferidas a tubos conteniendo 16 mL de agar ICC para almacenar a 4°C por período no mayor 8 semanas.

7.2.- Diseño de ASO

Por la complejidad estructural del ARNm del gen *recA* identificada en la herramienta RNA fold, se utilizaron dos ASO de tipo Gapmer 5-metilcitosina diseñados en el presente trabajo (Integrated DNA Technologies IDTE, Coralville, IA, USA Figura 3). Estos son RNasa dependientes (la RNasa detecta y escinde los heterodúplex formados entre el ASO y el ARNm). La dilución del producto liofilizado se realizó con solución TE pH 7.5 (IDTE) para elaborar una solución stock de 400 mM, de la cual se realizaron alícuotas de trabajo asegurando que el producto sólo fuese descongelado para realizar los experimentos. La conservación de los ASO se realizó a -80°C.

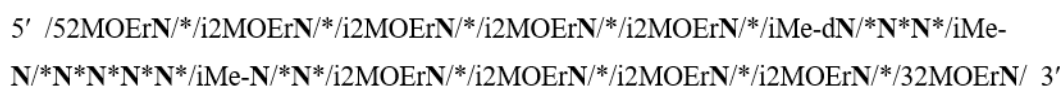


Figura 3: Estructura de los ASO dirigidos a las posiciones 734 y 880 del gen *recA* en *E. coli* K-12, EHEC, EAEC y ETEC. * = enlaces de fosforotioato; /52MOEr_, /i2MOEr_, /32MOEr_ = 2'MOE (2'-O-Methoxyethyl base); /iMe-dC/ = 5-Methylcytosine (5-methyl-dC).

7.3.-Nanoacarreador ZIF-8 y su interacción con ASO

La nanopartícula ZIF-8 (2-metilimidazol zinc), fue obtenida de Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, USA). Se disolvió en 1 mL agua ultrapura (IDTE) 25 mg de ZIF-8 y se combinó con 0.05 mM de cada ASO previamente descritos y 1 mM de glucosa. El producto se agitó a 250 rpm, a temperatura ambiente por 30 min para favorecer la unión de los ASO a la nanoestructura. Después el precipitado se colectó por centrifugación (14000 rpm / 5 min) y se resuspendió con 1 mL agua libre de nucleasas siguiendo la metodología de Zhang et al.

(2022). Una alícuota de 10 μ L del producto, fue inoculada en 5 mL de caldo ICC, se incubó a 37°C por 24h para prueba de esterilidad.

7.3.1-Microscopía de fluorescencia

El compuesto génico ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* y en su forma por separado como ZIF-8 fueron observados mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioskop 40, Oberkochen, Baden-Württemberg, Germany). Para esto se tiñó una muestra de 10 μ L con 0.05 mM de SYTO 9 Green Fluorescent (Invitrogen, Waltham, MA, USA), se incubó por 10 min y se observó directamente al microscopio utilizando el filtro de 430nm.

7.3.2-Microscopía electrónica de barrido.

De forma similar, al compuesto elaborado y su componente ZIF-8 se les determinó la morfología de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). La muestra se secó al vacío durante la noche, se colocó sobre una platina conductora y se recubrió con una capa fina de oro. Las imágenes se obtuvieron a un voltaje de aceleración de 5 kV. Estas muestras además se observaron mediante microscopía de luz.

*7.4.-Efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en algunos factores de virulencia de E. coli.*

7.4.1- Viabilidad

Para determinar el efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en la viabilidad bacteriana los cultivos crecidos durante la noche en caldo Luria Bertani (LB; Merck, Readington, NJ, USA) se ajustaron a 10^8 UFC/mL ($A_{600nm} = 0.132$) resuspendiendo en caldo LB. Para pre-exponer las bacterias se prepararon matraces conteniendo 5mL caldo LB 2X, 1mL inóculo 4mL, compuesto génico disuelto en agua para obtener concentración final de 16, 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* y 0.01U de RNasa H. El producto se agitó a 150 rpm / 37°C / 24h. Las muestras se analizaron cada 2h durante 8 h y a la hora 24h, para esto se tomó 200 μ L de cultivo para realizar diluciones seriadas y la correspondiente siembra en agar LB (Merk; Ortiz et al., 2021) para determinar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC). La nanoestructura de ZIF-8, los ASOs y la RNasaH se analizaron de manera individual.

7.4.2.-Movilidad tipo swarming

Una alícuota (10 μ L) del inóculo bacteriano tratado con 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por 3, 6 y 24 h ajustado a $A_{600nm} = 0.132$ en caldo LB se depositó en

el centro de placas de LB con agar suave (0.35 %) y se incubó a 37°C / 24 h. La zona de migración del movimiento swarming se midió como diámetro en centímetros (cm; García-Heredia et al., 2016).

7.4.3.-Producción de biopelículas.

La producción de biopelículas se realizó en placas de 96 pozos. Se agregó por pocillo 100 µL caldo LB 2X, 20 µL de inóculo bacteriano tratado con 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por 3, 6 y 24 h ajustado ($A_{600nm} = 0.132$), y 80 µL de agua se incubó durante 37°C / 24 h. Después se midió a A_{630nm} en un espectrofotómetro, se lavó la monocapa y se aplicó 200 µL de cristal violeta y se incubó a 37°C / 15 min. Posterior a cinco lavados con agua estéril, el cristal violeta se liberó con etanol absoluto y la solución se midió a 570 nm. El índice de formación de biopelícula se determinó mediante la fórmula: $BFI = (AB - CW) / G$; donde BFI, Índice de formación de biopelícula; AB, Densidad óptica de la matriz y células teñidas (570nm); CW, Densidad óptica del medio sin inóculo (control) teñido (570nm); G, Densidad óptica de las células en suspensión (630nm; García-Heredia et al., 2016). El resultado se normalizó a 1.

7.5.- Análisis de expresión de genes

La expresión de los genes *recA* presentes en todas las cepas en estudio, *stx2* de EHEC, *lt* y *stII* de ETEC y *pic* de EAEC se analizaron a 3, 6 y 24 h de exposición a 32, 64, 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* (Tabla1). Para esto se obtuvo el ARNm de las cepas tratadas y control utilizando el método descrito por los fabricantes del TRIzol (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Después se sintetizó el ADNc siguiendo el protocolo del kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). La expresión génica se cuantificó mediante qPCR utilizando el kit Maxima SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific). Se calculó el cambio en la expresión relativa (gen constitutivo *16S rRNA*), normalizándose a 1 mediante el método de umbral del ciclo $\Delta\Delta Cq$ reportado por Horizon (2010). Por lo tanto, los resultados fueron la expresión relativa en número de veces, comparando las bacterias control y las tratadas con ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para determinar la expresión de los genes *recA* y los relacionados a la producción de toxinas en EHEC, EAEC y ETEC.

Cepas	Genes analizados	Proceso fisiológico involucrado	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Temp °C	Referencias
EHEC	<i>recA</i>	Proteína RecA	F_ ATATCGACGCCAGTTTACG R_ GTTCATGGATGTGGAAACC	235	56	Shilpakala et al., 2009
EAEC	<i>16S-rRNA</i>	16S ribosomal RNA (Housekeeping gene)	F_ CGATGCAACGCGAAG	178	55	Safadi et al., 2012
ETEC			R_ CCGCACCGCTGGCAA			
EHEC	<i>stx1</i>	Toxina Shiga 1 (Stx1)	F_ CTGGATTTAATGTCGCATAGTG R_ AGAACGCCCACTGAGATCATC	150	58	Abbasi et al., 2014
	<i>stx2</i>	Toxina Shiga 2 (Stx2)	F_ GAAGATGTTTATGGCGGT R_ CACTGTAAATGTGTCATC	115	55	Safadi et al., 2012
EAEC	<i>pic</i>	Toxina Pic	F_ CCTGACAGAGGACACGTTCA R_ TCAACCCCTGTTCTTCCAAC	147		
ETEC	<i>lt</i>	Toxina termolábil (LT)	F_ GCACACGGAGCTCCTCAGTC R_ TCCTTCATCCTTTCAATGGCTTT	218	60	Vidal et al., 2005
	<i>st</i>	Toxina termoestable (ST)	F_ TTTCCCCTCTTTAGTCAGTCAA R_ GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG	159	58	Abbasi et al., 2016

7.6.-Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA Dunnett y Duncan test, comparando el comportamiento fenotípico y de expresión de genes de las bacterias tratada con ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* con el control no tratado. Todos los experimentos se realizaron con tres réplicas biológicas, derivando de cada una tres repeticiones técnicas.

8 Resultados

8.1. Nano-ensamblaje de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*.

El uso de SYTO 9 -colorante verde fluorescente que se une específicamente a ácidos nucleicos- permitió determinar la presencia de los ASO en la superficie de las nanopartículas (Figura 4). La microscopía de fluorescencia mostró señal fluorescente en las muestras de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*, mientras que ZIF-8 no emitió señal indicando que los ASO se encuentran expuestos y disponibles en la superficie de las nanopartículas en una cantidad suficiente para ser reconocidos mediante la tinción. Utilizando microscopía de luz se observó la unión entre las nanoestructuras de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*.

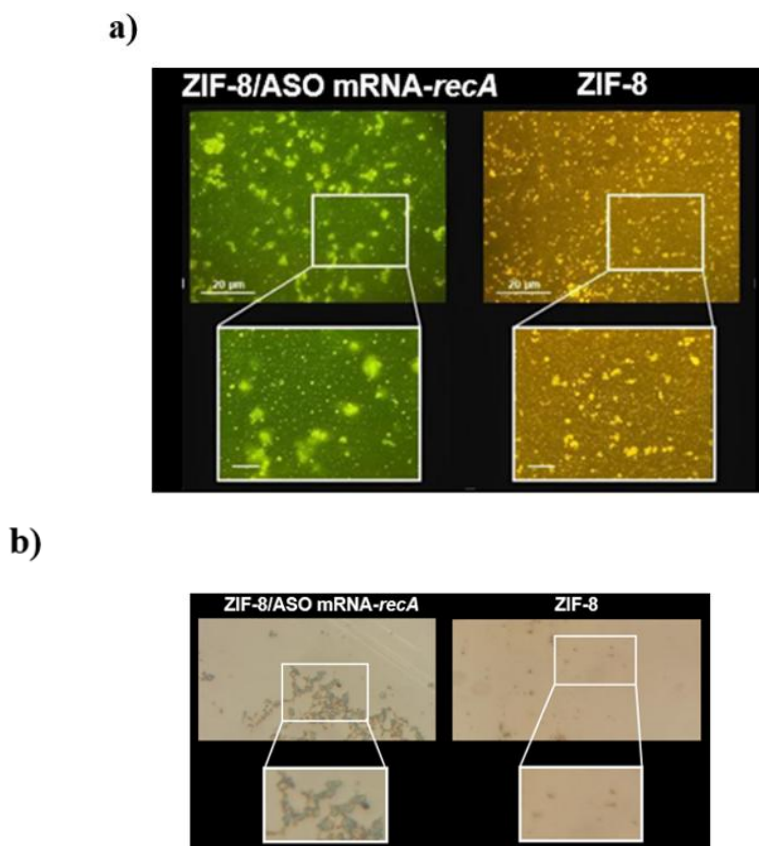


Figura 4. Nano-ensamblaje de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* a) Microscopía de fluorescencia 100X realizada a muestras de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* y la nanoestructura original de ZIF-8 teñidas con SYTO 9; b) Microscopía de luz realizada a muestras de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* y ZIF-8 cubierta de oro.

Además, mediante microscopía electrónica de barrido se observó que ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* y ZIF-8 presentan una estructura tridimensional cúbica-hexagonal de distintas proporciones (de entre 50 y 100 nm), asegurando que se mantiene la integridad de la nanoestructuras de ZIF-8 posterior al tratamiento de ensamblaje (Figura 5).

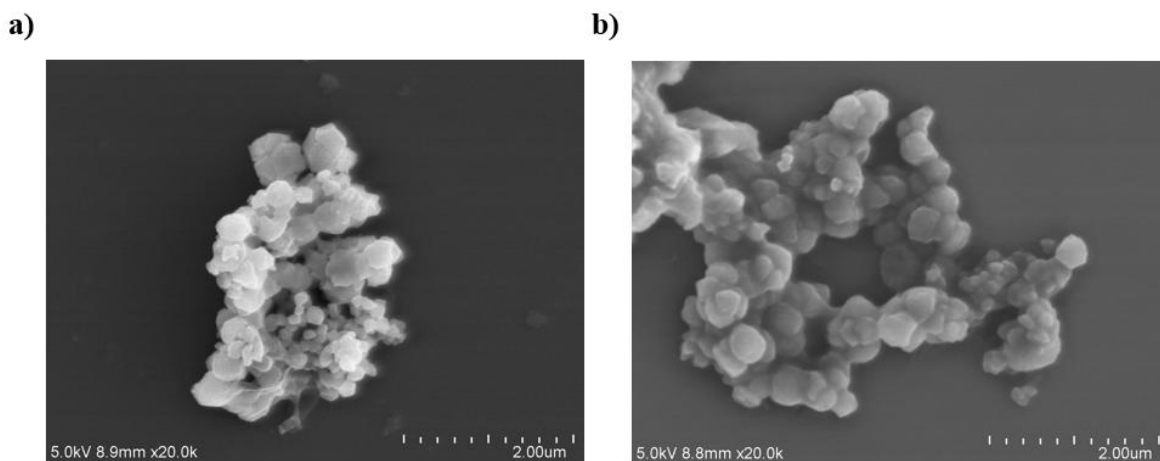


Figura 5. Estructura identificada mediante microscopía electrónica a) ZIF-8/ASO/ARNm-*recA*, b) ZIF-8.

8.2.- Efecto del compuesto ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en viabilidad bacteriana.

Las cepas de *E. coli* K-12, EHEC, EAEC, ETEC fueron pre-expuestas a 16, 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 24h para determinar su efecto en la viabilidad bacteriana. Cuando los cultivos se pre-expusieron a 16 nM/mL del compuesto, se identificó una ligera inhibición de la viabilidad de las cepas en estudio, sin embargo, no representó un cambio significativo en comparación con el control no tratado. Aunque, el aumento de concentración a 32 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 24h, tampoco mostró cambios relevantes en el crecimiento de los patotipos de EHEC y EAEC, sí redujo la viabilidad de *E. coli* K-12 y ETEC conforme aumentaba el tiempo de exposición al compuesto; siendo más evidente después de 24h donde sólo creció en promedio 5.7 ± 0.11 UFC Log₁₀/mL ($p \leq 0.05$) comparado con los controles de ambas cepas no tratadas ($\bar{x} = 8.52 \pm 0.04$ UFC Log₁₀/mL; Figura 6).

Cuando las bacterias se pre-expusieron a 64 y 128 nM/mL el compuesto mostró mayor efectividad reduciendo la viabilidad de todas las cepas en estudio. En general, entre la hora 2 y 24 la presencia del compuesto sólo mantuvo bacterias viables en un promedio de 6.5 ± 0.14 y 5.8 ± 0.47 UFC Log₁₀/mL ($p \leq 0.05$) respectivamente, comparado con el control no tratado ($\bar{x}_{2h} = 8.0 \pm 0.03$ y $\bar{x}_{24h} = 8.4 \pm 0.03$ = UFC Log₁₀/mL). En específico, EHEC fue el patotipo más afectado. En presencia de 128 nM/mL se observó sólo el 3.7 ± 0.03 UFC Log₁₀/mL de células viables (control = 8.52 ± 0.04 UFC Log₁₀/mL).

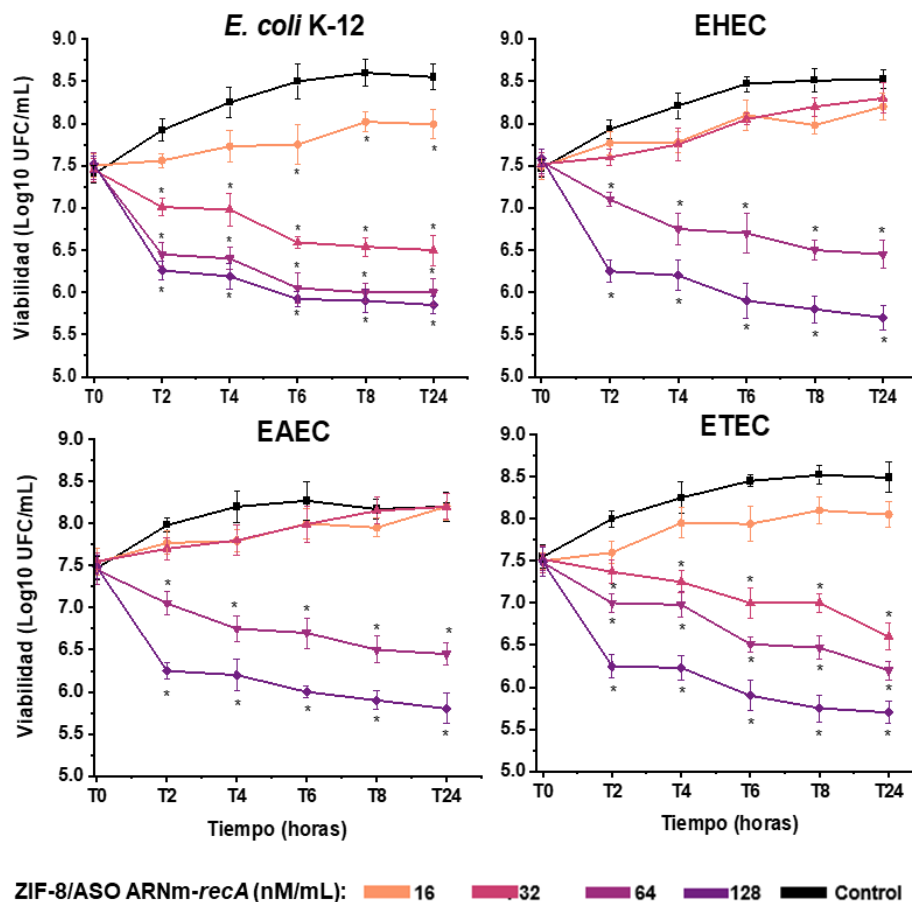


Figura 6. Efecto del compuesto ZIF-8/ASO/ARNm-recA en la viabilidad de *E. coli*.

El estudio por separado de ZIF-8, ASO, y RNasa H realizado no mostró cambios significativos respecto al control no tratado (ASO $\bar{x} = 8.44 \pm 0.10$ UFCLog10/mL; ZIF-8 $\bar{x} = 7.97 \pm 0.23$ UFCLog10/mL; RNasa H $\bar{x} = 8.41 \pm 0.12$ UFCLog10/mL). Debido a que la concentración de 16 nM/mL no mostró cambios relevantes, se descartó su uso en el resto de los ensayos.

8.3.- Impacto de ZIF-8/ASO/ARNm-recA en el silenciamiento del gen *recA*.

Se determinó el efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-recA en el silenciamiento del gen *recA* de *E. coli*. Para ello, los cultivos se expusieron a 32, 64 y 128 nM/mL del compuesto por 3, 6 y 24 h, después se cuantificó la expresión relativa del ARNm-*recA* mediante qPCR (Figura 7). Cuando las cepas de *E. coli* en estudio se pre-expusieron a 32 nM/mL se observó inhibición en la expresión del gen *recA* a las horas 3 y 6 de pre-exposición ($\bar{x} = 0.34 \pm 0.31$

veces), comparado con el control no tratado normalizado a 1. Sin embargo, al aumentar el tiempo a 24 h aunque provocó sobre-expresión de este gen en EHEC y EAEC ($\bar{x} = 2.9 \pm 0.52$ veces), en *E. coli* K-12 y ETEC se mostró inhibición en la expresión de *recA* ($\bar{x} = 0.17 \pm 0.14$ veces).

De modo similar, cuando se aplicó 64 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 3, 6 y 24 h se redujo en todas las bacterias tratadas la expresión del gen *recA* en un rango de 0.001 a 0.79 veces; excepto EHEC y ETEC que sobre-expresaron este gen después de 6 h ($\bar{x} = 2.83 \pm 0.24$ veces) y 24 h ($\bar{x} = 2.31 \pm 0.38$ veces) respectivamente. El aumento de la concentración hasta 128 nM/mL del compuesto génico redujo la expresión del gen *recA* ($\bar{x} = 0.09 \pm 0.07$) en todas las cepas evaluadas a las horas 3, 6 y 24.

Además, se analizaron los componentes de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por separado mostrando los siguientes resultados: ASO $\bar{x} = 1.36 \pm 0.28$ veces; ZIF-8 $\bar{x} = 1.58 \pm 0.38$ veces; RNAsa H $\bar{x} = 1.21 \pm 0.28$ veces)

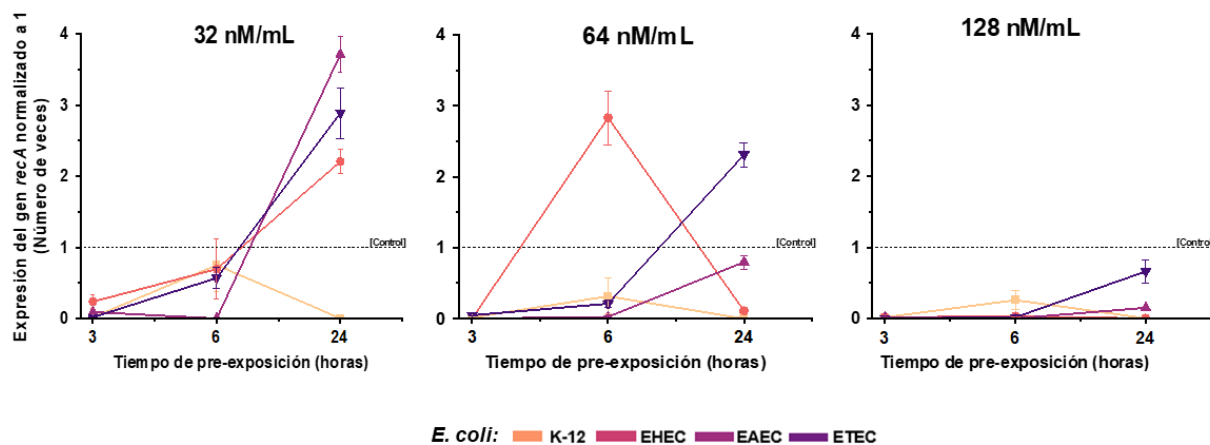


Figura 7: Análisis de la expresión del gen *recA* en *E. coli* K-12, EHEC, EAEC y ETEC pre-expuestas a ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 3, 6 y 24 horas.

8.4.- Movilidad tipo swarming

El uso de 32, 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 3h (Figura 8) redujo la motilidad tipo swarming obteniéndose en *E. coli* K-12 $\bar{x} = 2.3 \pm 0.15$ cm; en EHEC $\bar{x} = 4.6 \pm 0.11$ cm; en EAEC $\bar{x} = 3.1 \pm 0.17$ cm y en ETEC $\bar{x} = 1.1 \pm 0.10$ cm comparado con el control no tratado (*E. coli* K-12 = 6.9 cm; EHEC = 5.9 cm; EAEC = 5.4 cm; ETEC = 5.5 cm; Figura 8).

De forma similar, pre-exponer los cultivos bacterianos por 6 y 24h afectó la migración de las bacterias en presencia de todas las concentraciones del compuesto génico utilizadas. Los rangos de desplazamiento bacterianos fueron para *E. coli* K-12 desde 1.7 a 4.1 cm ($p \leq 0.05$; $\bar{x}$ control = 4.2 ± 0.3); EHEC desde 3.1 a 4.0 cm ($p \leq 0.05$; $\bar{x}$ control = 5.2 ± 0.9); EAEC de 2.1 a 3.8 cm ($p \leq 0.05$; $\bar{x}$ control = 4.0 ± 0.2) y ETEC de 1.0 a 3.4 cm ($p \leq 0.05$; $\bar{x}$ control = 3.7 ± 0.3).

El estudio de los controles de ZIF-8, ASO, y RNasa H realizado después de 24h de exposición no mostró cambios significativos en la motilidad de las bacterias en relación al control no tratado (ASO $\bar{x} = 4.17 \pm 0.13$; ZIF-8 $\bar{x} = 3.67 \pm 0.52$; RNasa H $\bar{x} = 4.15 \pm 0.22$)

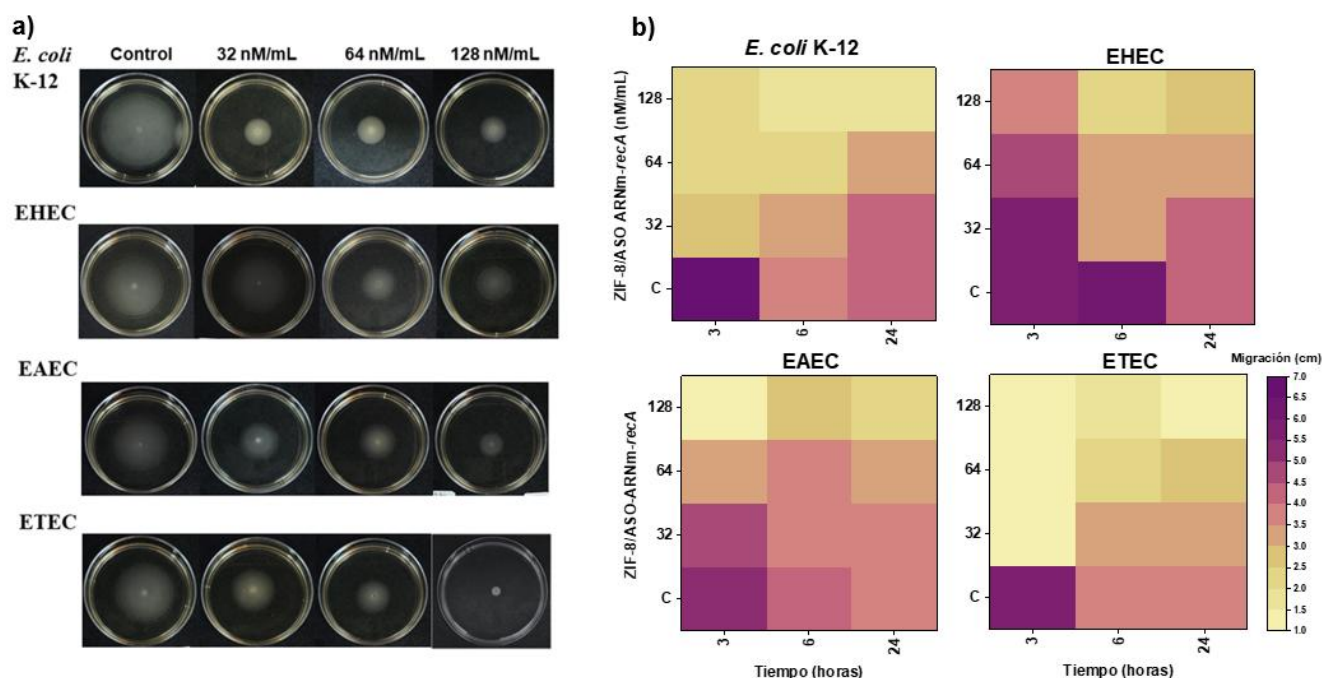


Figura 8. Efecto de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* en la motilidad tipo swarming de *E. coli*, a) fotografía de la motilidad tipo swarming de bacterias pre-expuestas al compuesto génico por 3 h; b) migración de los cultivos tratados (cm) a 3, 6 y 24h de pre-exposición.

8.5.- Producción de biopelículas

El uso de 32 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 3, 6 y 24h de pre-exposición no mostró cambios significativos en la producción de biopelículas de las cuatro cepas en estudio, con excepción de EHEC tratada por 6h que redujo la producción de biopelículas hasta 0.68 veces ($p \leq 0.05$) y ETEC tratada por 24h que promovió este factor de virulencia hasta 1.72 veces ($p \leq 0.05$; control normalizado a 1; Figura 9).

Cuando se usó 64 nM/mL del compuesto génico *E. coli* K-12 inhibió la producción de biopelículas ($\bar{x} = 0.50 \pm 0.14$ veces; $p \leq 0.05$) en todos los tiempos evaluados. El compuesto además redujo este factor en EHEC tratada por 6 h (0.57 veces; $p \leq 0.05$), mientras que con 3 y 24 h de tratamiento los cultivos no mostraron alteraciones. En contraste, EAEC promovió la producción de biopelículas desde 1.41 hasta 1.78 veces ($p \leq 0.05$) en todos los tiempos evaluados, mientras que ETEC no mostró alteraciones.

En general, el uso de 128 nM/mL, inhibió la producción de biopelículas de *E. coli* K-12, EHEC y ETEC tratadas durante 6 y 24 h ($\bar{x} = 0.64 \pm 0.17$ veces); mientras promovió la producción de biopelículas en EAEC (de 1.34 hasta 1.89 veces; $p \leq 0.05$).

El estudio por separado de ZIF-8, ASO, y RNasa H mostró el siguiente resultado en relación al control no tratado (ASO $\bar{x} = 1.11 \pm 0.2$; ZIF-8 $\bar{x} = 1.37 \pm 0.1$; RNasa H $\bar{x} = 1.03 \pm 0.1$).

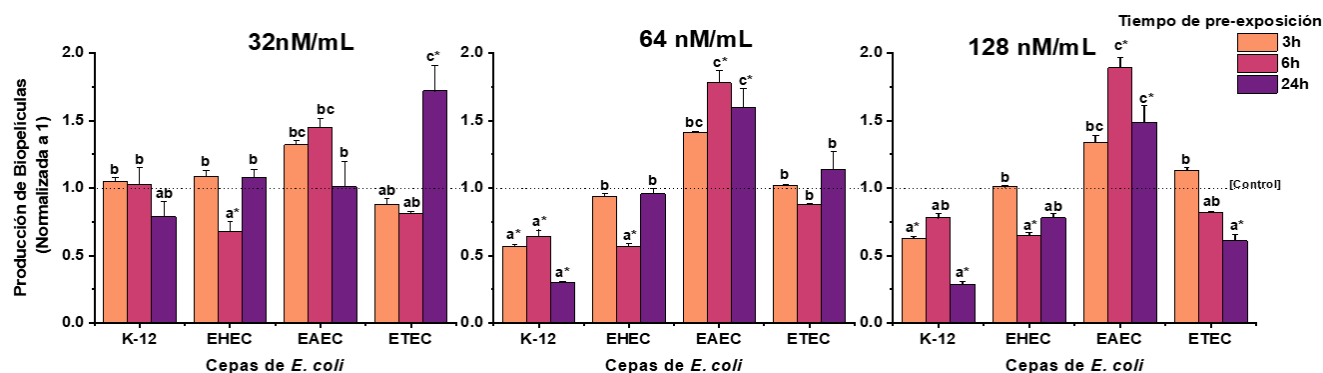


Figura 9. Efecto de ZIF-8/ASO/RNm-*recA* en la producción de biopelículas de *E. coli*. La expresión del control no tratado se normalizó a 1, >1 indica sobreexpresión, <1 indica inhibición.

8.6.- ZIF-8/ASO/RNm-*recA* vs. expresión de genes asociados a producción de toxinas en *E. coli*

Cuando las bacterias fueron tratadas con 32 nM/mL por 3 h los genes *stx2* de EHEC, *pic* de EAEC y *stII* de ETEC se sobre-expresaron en promedio de 42.9 ± 29 veces ($p \leq 0.05$; Tabla 2); mientras el gen *lt* de ETEC se inhibió a 0.18 veces ($p \leq 0.05$) en comparación al control normalizado a 1. Cuando aumentó el tiempo de exposición a 6 h se observó inhibición en la expresión del *stx2*, *pic* y *stII* (0.13 ± 0.1 veces; $p \leq 0.05$), sin embargo, *lt* no mostró cambios. Inesperadamente, pre-exponer durante 24h aumentó la expresión de los genes *stx2* y *stII* ($\bar{x} = 9.3 \pm 3.1$ veces; $p \leq 0.05$) y redujo la expresión de *pic* y *lt* ($\bar{x} = 0.23 \pm 0.1$ veces; $p \leq 0.05$).

Cuando se utilizó 64 nM/mL por 3, 6 y 24 h la expresión de todos los genes se inhibió a un promedio de 0.22 ± 0.2 veces ($p \leq 0.05$), excepto algunos genes que de forma puntual aumentaron su expresión como es el caso de: *stx2* (7.13 veces; $p \leq 0.05$) de EHEC expuesta por 3 h; *stII* (2.16 veces; $p \leq 0.05$) de ETEC expuesta por 6 h y *lt* (2.51 veces; $p \leq 0.05$) de ETEC expuesta por 24h.

Pre-exponer las bacterias a 128 nM/mL durante 3h inhibió la expresión de los genes de ETEC (*stII* y *lt*) hasta 0.10 ± 0.03 veces ($p \leq 0.05$), aumentó la expresión del gen *pic* de EAEC hasta 2.67 veces ($p \leq 0.05$), mientras el gen *stx2* de EHEC no mostró cambios. En contraste, aumentar del tiempo de exposición a 6 y 24h provocó que todos los genes en estudio manifestaran una inhibición promedio en su expresión de 0.15 ± 0.09 veces ($p \leq 0.05$).

Tabla 2: Efecto de ZIF-8/ASO en la expresión de genes relacionados a la producción de toxinas en patotipos de *E. coli* diarreogénica.

Tiempo de exposición (h)	ZIF-8/ASO (nM/mL)	Genes asociados a la producción de toxinas en <i>E. coli</i>			
		EHEC	EAEC	ETEC	
		<i>stx2</i>	<i>pic</i>	<i>lt</i>	<i>stII</i>
3	32	16.0±7.4d*	38.9±6.7d*	0.18±0.1a*	73.7±8.97f*
	64	0.70±0.0b	17.2±2.07d*	0.02±0.0a*	0.22±0.2a*
	128	1.30±0.6b	2.67±0.3c*	0.07±0.0a*	0.12±0.0a*
6	32	0.31±0.2a*	0.00±0.0a*	1.11±0.4b	0.09±0.0a*
	64	0.24±0.1a*	0.05±0.0a*	0.03±0.0a*	2.16±0.6c*
	128	0.00±0.0a*	0.03±0.0a*	0.06±0.0a*	0.00±0.0a*
24	32	7.13±2.3c*	0.02±0.0a*	0.44±0.1a*	11.6±1.4d*
	64	0.14±0.0a*	0.02±0.0a*	2.51±0.8c*	0.58±0.1 a*
	128	0.00±0.0a*	0.52±0.2a*	0.02±0.0a*	0.00±0.0a*

Las diferentes letras indican los subconjuntos poblacionales formados mediante el ANOVA / pruebas de Duncan y Dunnett, equivalente a significancia estadística bilateral, (*) significa $p \leq 0.05$. El grupo control representado con la letra b se normalizó a 1. Los datos <1 indican aumento; mientras >1 indican reducción en la expresión de genes. La desviación estándar 0.0 significa ≤ 0.04 .

9 Discusión

Generalmente las infecciones causadas por *E. coli* provocan cuadros clínicos diarreicos, que en algunos casos pueden evolucionar a SUH y/o síndrome de mala absorción (Gomes et al., 2016). A pesar de esto, el uso de algunos antibióticos para controlar esta infección ha sido muy controversial debido a que promueve la producción de toxinas y la transferencia de genes de virulencia y resistencia identificado en algunos patotipos (Muniesa et al., 2012). Esta variabilidad genómica ha provocado complejidad en el diagnóstico y la terapia para las cepas de *E. coli* diarreogénicas.

Actualmente, es limitada la información basada en la determinación de blancos farmacológicos que puedan reducir la virulencia en más de un patotipo de *E. coli*, utilizando terapias alternativas a los antibióticos. El ritmo acelerado de esta problemática nos llevó a desarrollar el presente trabajo basado en el diseño de una terapia génica para el control de factores de virulencia en *E. coli* diarreogénica. En nuestro caso se utilizó como blanco el gen *recA*, el cual fue silenciado en EHEC, EAEC, ETEC y *E. coli* K-12 mediante el uso de ZIF-8 como nanoacarreador de ASO/ARNm-*recA*, como potencial alternativa terapéutica a los antibióticos convencionales.

En este estudio, se utilizó SYTO 9, un colorante verde fluorescente que se une específicamente a ácidos nucleicos, para evaluar la presencia de los ASO en las nanopartículas. Las muestras de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* mostraron fluorescencia, mientras que las ZIF-8 carecieron de señal fluorescente; indicando que los ASO se encuentran expuestos y disponibles en la superficie de las nanopartículas en una cantidad suficiente para ser reconocidos por el tinte.

Aunque SYTO 9 se emplea principalmente para teñir ácidos nucleicos en células vivas, puede además marcar material genético libre si este es accesible. Cuando los ASO están encapsulados, los complejos nanopartículas/ASO pueden llegar a requerir un fluoróforo específico o técnicas alternativas de contraste para su visualización por microscopía de fluorescencia (McGoverin et al., 2020; Wang, 2018). Por tanto, la fluorescencia observada en nuestras muestras sugiere que el ASO se encuentra expuesto en la superficie de ZIF-8, permitiendo su interacción con SYTO 9.

Es importante destacar que la capacidad de un microscopio para detectar una nanopartícula individual depende más de su visibilidad óptica que de su resolución. Si la

partícula está suficientemente separada y presenta intensidad de fluorescencia adecuada, puede ser localizada y rastreada. Sin embargo, esto no garantiza que la imagen refleje su tamaño o morfología real (Wang, 2018), como fue el caso con las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia con SYTO 9. En nuestro estudio los ASO parecen haber sido adsorbidos sobre la superficie de ZIF-8 mediante interacciones electrostáticas, lo cual es consistente con la naturaleza cargada negativamente de los ácidos nucleicos y la superficie cargada positivamente de las ZIF-8.

Los nanomateriales como ZIF-8, suelen presentar heterogeneidad estructural entre partículas individuales. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica proporcionan una visión estática que permite caracterizar su morfología y organización superficial (Wang, 2018). Khan et al. (2018) describieron la morfología de ZIF-8 como una estructura tridimensional cúbica-hexagonal analizada desde imágenes de microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM); mientras que Abdelhamid et al. (2020) reportaron nanopartículas ZIF-8 de entre 25 y 100 nm.

Además, las ZIF-8 presentan sensibilidad al pH, debido a que los enlaces entre el ion Zn^{2+} y el 2-metilimidazol se hidrolizan fácilmente en condiciones ácidas. Esta característica las hace atractivas para la entrega intracelular de moléculas terapéuticas, ya que pueden liberar su carga en ambientes endosomales o lisosomales (Zhang et al., 2020a).

Por otro lado, está demostrado que la proteína RecA junto con el sistema UvrABC, forma parte del sistema de respuesta SOS en bacterias (Baquero et al., 2011). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que el uso del complejo ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* ejerce su efecto bloqueando la respuesta SOS bacteriana mediante la inhibición de la actividad de RecA.

Debido a la complejidad estructural del ARNm de *recA* se diseñaron dos ASO Gapmers para uso combinado con blanco en el ARNm-*recA*, considerado conservado en *E. coli*. La selección de genes diana en bacterias debe centrarse tanto en funciones esenciales para el crecimiento, como la biosíntesis de ácidos grasos, la división celular y la transcripción por ARN polimerasas cuyas interrupciones comprometen la viabilidad microbiana (Rasmussen et al., 2007; Ji et al., 2013). Además, deben de contemplarse mecanismos de virulencia y resistencia incluyendo la formación de biopelículas, producción de toxinas, así como dirigirse a proteínas multifuncionales que permiten bloquear simultáneamente múltiples rutas (Oh et al., 2014)

Además del diseño de estos ASO, se optó por implementar en el tratamiento la nanoestructura de ZIF-8 como un “acarreador”. Esto debido a la baja absorción de los ASO por las bacterias basado en factores como la carga electrostática o la barrera de tamaño impuesta por la envoltura celular (Hegarty & Stewart., 2018). El uso de ZIF-8 ayuda con la absorción bacteriana de los ASO, fundamentado en estudios previos donde se aplicó contra *S. aureus* resistente a meticilina mejorando ampliamente su absorción en ensayos *in vivo* e *in vitro* (Zhang et al., 2022).

En general, en este trabajo el uso de las concentraciones de 32, 64 y 128 nM del complejo ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* sobre las cepas *E. coli* K-12, EHEC, EAEC y ETEC produjo una regulación negativa en los transcritos del gen *recA*. Sharma et al. (2013) también implementaron sRNAs artificiales para reducir la expresión del gen *recA* en *E. coli* logrando reducir hasta un 86% su expresión. La represión del gen *recA*, redujo la manifestación de la mayoría de los factores de virulencia analizados en el presente trabajo. En particular concentraciones de 64 y 128 nM/mL del complejo ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* redujeron significativamente la viabilidad y la motilidad tipo swarming de las cepas en estudio.

Zhang et al. (2022) aplicaron ZIF-8/ASO dirigido al gen *ftsZ* (relacionado a la división celular), obteniendo una notable reducción de la viabilidad de *S. aureus* en heridas infectadas. Además, Zhang et al. (2020b) evaluaron la capacidad de un sistema de entrega para introducir ASO dirigidos a genes claves implicados en la síntesis de exopolisacáridos (*gtfBCD*, *gfpB* y *ftf*) en *Streptococcus mutans*. La inhibición de la producción de biopelículas fue del 93.7%, lo cual correlacionaron con una disminución significativa en la síntesis de EPS y con un menor grosor de la capa formada. Debido a la inconsistencia en los resultados de biopelículas obtenidas en nuestro estudio sugerimos realizar el ensayo por la técnica de autoinoculación para comparar lo obtenido; así como describir las características de EAEC que la hicieron menos sensible al compuesto.

Van-Nederveen et al. (2025) describen que las cepas típicas de EAEC codifican y producen fimbrias de adherencia agregativa (AAF) necesarias para desarrollar la adherencia agregativa a las células epiteliales. Además, probaron su implicación en la producción de biopelícula mediante bacterias mutantes, las cuales mostraron bajo índice de colonización. En general, EAEC es una bacteria con múltiples factores de virulencia y mecanismos adhesivos como curli, pilis o adhesinas adicionales que le han permitido adaptarse e incluso

formar cepas híbridas.

Por otro lado, la producción de genes relacionados a toxinas asociados con los diversos patotipos de *E. coli* como, *stx2a* en EHEC, *stII* e *it* en ETEC, y *pic* en EAEC; también fue inhibida su expresión por efecto de nuestro compuesto, siendo la variante de 128 nM/mL durante 24h la más efectiva debido a que redujo la expresión de todas las toxinas en estudio.

Aunque los estudios que relacionan la expresión de genes asociados a toxinas con ASO son escasos, Dyer et al., (2015) utilizaron una versión “desarmada” de la toxina del ántrax como vehículo de entrega de sus oligonucleótidos antisentido y siRNA ofreciendo un control preciso en la regulación de la expresión de proteínas asociadas a la toxicidad. Sus resultados mostraron en células HeLa una reducción en la producción del gen *Syntaxin5* hasta 5.4%. Otras células (THP-1 y Vero) mostraron reducciones del 35.2% y 22.9% respectivamente, demostrando que el sistema es versátil.

Cabe mencionar que el estudio de los compuestos por separado ZIF-8, ASO y RNasa H no mostró cambios relevantes en el comportamiento bacteriano por lo que consideramos que ZIF-8 se comportó como un nanoportador de baja toxicidad. A pesar de las limitaciones descritas para estudios con procariotas, las investigaciones sobre terapia génica se han incrementado en los últimos tres años debido al aumento de la resistencia a antimicrobianos y a la complejidad genómica de algunas especies de patógenos como es el caso de *E. coli*.

Aunque en el presente estudio los ensayos de biopelículas mostraron resultados no consistentes, otros factores de virulencia como el crecimiento, la motilidad tipo swarming y la expresión de las toxinas se inhibieron por efecto del compuesto génico en *E. coli* K-12, EHEC, EAEC y ETEC. Esto confirma que el gen *recA* es un objetivo farmacológico que interfiere con rutas metabólicas asociadas a factores de virulencia. Esta investigación propone un nuevo enfoque de terapia genética que resulta prometedor para el control de patógenos transmitidos por los alimentos.

Conclusiones

1. Se logró el nano-ensamblaje entre ZIF-8 y ASO/ARNm-*recA* mediante microscopía de fluorescencia; así como la integridad de la nanopartícula mediante microscopía electrónica de barrido.
2. Todos los cultivos bacterianos tratados con 64 y 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* durante 24h, mostraron reducción en la viabilidad de ≈ 5.0 UFC/Log10/mL; además de inhibición en la expresión del gen *recA* ($\bar{x} = 0.09 \pm 0.07$).
3. La mayoría de las concentraciones de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* redujeron la motilidad tipo swarming de manera significativa en cultivos pre-expuestos durante 3, 6 y 24h.
4. La producción de biopelículas fue inhibida ($\bar{x} = 0.64 \pm 0.17$) en todas las bacterias tratadas con 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por 6 y 24h; excepto EAEC que promovió hasta 1.78-veces este factor de virulencia.
5. La expresión de genes relacionados a toxinas (*stx2*, *pic*, *lt* y *stII*) fue inhibida ($\bar{x} = 0.15 \pm 0.09$) en los cultivos tratados con 128 nM/mL de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* por 6 y 24h.
6. Los resultados obtenidos demuestran que ZIF-8 es un acarreador eficiente de ASO/ARNm-*recA*, siendo un potencial modulador de algunos factores de virulencia de los patotipos de *E. coli* enterohemorrágico, enteroagregativo y enterotoxigénico.

Perspectivas

La continuidad del desarrollo tecnológico de ZIF-8/ASO/ARNm-*recA* deberá escalar a modelos en líneas celulares y murino, así como desarrollar estudios de estabilidad para el compuesto. La investigación muestra potencial para la solicitud a futuro de una patente.

Referencias

- Adikesavan, A. K., Katsonis, P., Marciano, D. C., Lua, R., Herman, C., & Lichtarge, O. (2011). Separation of recombination and SOS response in *Escherichia coli* RecA suggests LexA interaction sites. *PLoS genetics*, 7(9), e1002244. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002244>.
- Abbasi, P., Kargar, M., Doosti, A., Mardaneh, J., Ghorbani-Dalini, S., & Dehyadegari, M. A. (2014). Characterization of Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) using multiplex Real-Time PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(3), 169–174.
- Abbasi, P., Kargar, M., Doosti, A., Mardaneh, J., Dehyadegari, M. A., & Ghorbani-Dalini, S. (2016). Multiplex real-time PCR assay for the detection of LT, STIa and STIb genes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Enteric Pathogens*, 2(1), 3–16431. <https://doi.org/10.17795/ijep.16431>.
- Abdelhamid, H. N., Dowaidar, M., Hällbrink, M., & Langel, Ü. (2020). Gene delivery using cell penetrating peptides-zeolitic imidazolate frameworks. *Microporous and Mesoporous Materials*, 300, 110173. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110173>.
- Baquero, F., Coque, T. M., & De La Cruz, F. (2011). Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3649–3660. <https://doi.org/10.1128/aac.00013-11>.
- Butala, M., Žgur-Bertok, D., & Busby, S. J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 82–93. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8378-6>.
- Buuck, S., Smith, K., Fowler, R. C., Cebelinski, E., Lappi, V., Boxrud, D., & Medus, C. (2020). Epidemiology of Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Minnesota, 2016–2017. *Epidemiology & Infection*, 148, e206. <https://doi.org/10.1017/S0950268820001934>.
- Campbell, M. J., & Davis, R. W. (1999). Toxic mutations in the *recA* gene of *E. coli* prevent proper chromosome segregation. *Journal of Molecular Biology*, 286(2), 417–435. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2456>.
- Chen, Z., Yang, H., & Pavletich, N. P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the RecA–ssDNA/dsDNA structures. *Nature*, 453(7194), 489–494. <https://doi.org/10.1038/nature06971>.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2), 71–87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>.
- Crooke, S. T. (2017). Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(2), 70–77. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0656>.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13>.
- Doyle, D. F., Braasch, D. A., Simmons, C. G., Janowski, B. A., & Corey, D. R. (2001). Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry*, 40(1), 53–64. <https://doi.org/10.1021/bi0020630>.
- Dyer, P. D., Shepherd, T. R., Gollings, A. S., Shorter, S. A., Gorringer-Patrick, M. A., Tang, C. K., & Richardson, S. C. (2015). Disarmed anthrax toxin delivers antisense oligonucleotides and siRNA with high efficiency and low toxicity. *Journal of Controlled Release*, 220, 316–328. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.054>.
- Eckstein, F. (2014). Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutic*, 24(6), 374–387. <https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506>.

- Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 51(6), 2529–2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>.
- Fitzhenry, R. J., Pickard, D. J., Hartland, E. L., Reece, S., Dougan, G., Phillips, A. D., & Frankel, G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonization by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Gut*, 50(2), 180–185. <https://doi.org/10.1136/gut.50.2.180>.
- Franca, F. L., Wells, T. J., Browning, D. F., Nogueira, R. T., Sarges, F. S., Pereira, A. C., & De Luna, M. D. G. (2013). Genotypic and phenotypic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*, 8(7), e69971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069971>
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., & Karch, H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1), 74–84. <https://doi.org/10.1086/338115>.
- García, A., & Fox, J. G. (2021). A one health perspective for defining and deciphering *Escherichia coli* pathogenic potential in multiple hosts. *Comparative Medicine*, 71(1), 3–45. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-20-000054>.
- García-Heredia, A., Orue, N., Heredia, N., & García, S. (2016). Efficacy of citrus-based disinfectants to inhibit growth, swarming, and biofilm formation of *Salmonella* and decontaminate parsley. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 11(2), 1295–1299.
- Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- Greenberg, D. E., Marshall, K. R., Brinster, L. R., Zarembek, K. A., Shaw, P. A., Mellbye, B. L., Iversen, P. L., Holland, S. M., & Geller, B. L. (2010). Antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers targeted to an essential gene inhibit *Burkholderia cepacia* complex. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(12), 1822–1830. <https://doi.org/10.1086/652807>
- Hagedorn, P. H., Hansen, B. R., Koch, T., & Lindow, M. (2017). Managing the sequence-specificity of antisense oligonucleotides in drug discovery. *Nucleic Acids Research*, 45(5), 2262–2282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx056>.
- Horizon. 2010. Demonstration of a $\Delta\Delta C_q$ calculation method to compute relative gene expression from qPCR data. <https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Technical-manuals/delta-cq-solaris-technote.pdf>. [Accessed 10 September 2024].
- Hansen, A. M., Bonke, G., Larsen, C. J., Yavari, N., Nielsen, P. E., & Franzyk, H. (2016). Antibacterial peptide nucleic acid-antimicrobial peptide (PNA-AMP) conjugates: antisense targeting of fatty acid biosynthesis. *Bioconjugate Chemistry*, 27(4), 863–867. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00013>
- Harth, G., Zamecnik, P. C., Tang, J. Y., Tabatadze, D., & Horwitz, M. A. (2000). Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 418–423. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.418>.

- He, W., Gan, Y., Qi, X., Wang, H., Song, H., Su, P., & Yang, Y. (2023). Enhancing enzyme activity using hydrophilic hollow layered double hydroxides as encapsulation carriers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(29), 34513–34526. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c05237>.
- Hegarty, J. P., & Stewart, D. B. (2018). Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 1055–1065. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8671-0>.
- Hosangadi, D., Smith, P. G., Kaslow, D. C., & Giersing, B. K. (2019). WHO consultation on ETEC and *Shigella* burden of disease, Geneva, 6–7th April 2017: Meeting report. *Vaccine*, 37(50), 7381–7390. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.011>.
- Ji, Y., & Lei, T. (2013). Antisense RNA regulation and application in the development of novel antibiotics to combat multidrug resistant bacteria. *Science Progress*, 96(1), 4–60. <https://doi.org/10.3184/003685013X13617194309028>
- Huang, S., Hao, X. Y., Li, Y. J., Wu, J. Y., Xiang, D. X., & Luo, S. (2022). Nonviral delivery systems for antisense oligonucleotide therapeutics. *Biomaterials Research*, 26(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00292-4>.
- Kampmeier, S., Berger, M., Mellmann, A., Karch, H., & Berger, P. (2018). The 2011 German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak-the danger is still out there. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 416, 117–148. https://doi.org/10.1007/82_2018_107.
- Khan, I. U., Othman, M. H. D., Jilani, A., Ismail, A., Hashim, H., Jaafar, J., Rahman, M. A., & Rehman, G. U. (2018). Economical, environmental friendly synthesis, characterization for the production of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8) nanoparticles with enhanced CO₂ adsorption. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(7), 1072–1083. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.07.012>.
- Khvorova, A., & Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, 35(3), 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>.
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., & Erdmann, V. A. (2002). Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 1911–1918. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.1911>.
- Larsson, D. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.
- Martens, E., & Demain, A. L. (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *Journal of Antibiotics*, 70(5), 520–526. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.30>.
- McGoverin, C., Robertson, J., Jonmohamadi, Y., Swift, S., & Vanholsbeeck, F. (2020). Species dependence of SYTO 9 staining of bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.545419>
- Meng, J., Da, F., Ma, X., Wang, N., Wang, Y., Zhang, H., Li, M., Zhou, Y., Xue, X., Hou, Z., Jia, M., & Luo, X. (2015). Antisense growth inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by locked nucleic acid conjugated with cell-penetrating peptide as a novel FtsZ inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 914–922. <https://doi.org/10.1128/AAC.03781-14>
- Mo, C. Y., Manning, S. A., Roggiani, M., Culyba, M. J., Samuels, A. N., Sniegowski, P. D., & Kohli, R. M. (2016). Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics. *MSphere*, 1(4), 10–1128. <https://doi.org/10.1128/msphere.00163-16>.
- Muniesa, M., Hammerl, J. A., Hertwig, S., Appel, B., & Brüssow, H. (2012). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4065–4073. <https://doi.org/10.1128/AEM.00217-12>.
- Nautiyal, A., Patil, K. N., & Muniyappa, K. J. J. A. C. (2014). Suramin is a potent and selective inhibitor of

- Mycobacterium tuberculosis* RecA protein and the SOS response: RecA as a potential target for antibacterial drug discovery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(7), 1834–1843. <https://doi.org/10.1093/jac/dku080>.
- Navarro-Garcia, F., Gutierrez-Jimenez, J., Garcia-Tovar, C., Castro, L. A., Salazar- Gonzalez, H., & Cordova, V. (2010). Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infection and Immunity*, 78(10), 4101–4109. <https://doi.org/10.1128/iai.00523-10>.
- Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 90. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>.
- Nishi, J., Sheikh, J., Mizuguchi, K., Luisi, B., Burland, V., Boutin, A., & Nataro, J. P. (2003). The export of coat protein from enteroaggregative *Escherichia coli* by a specific ATP- binding cassette transporter system. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45680–45689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306413200>.
- Oh, E., Zhang, Q., & Jeon, B. (2014). Target optimization for peptide nucleic acid (PNA)- mediated antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 375–380. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt381>.
- Ortiz, Y., García-Heredia, A., Merino-Mascorro, A., García, S., Solís-Soto, L., & Heredia, N. (2021). Natural and synthetic antimicrobials reduce adherence of enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *PLoS One*, 16(5), e0251096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251096>.
- Pallen, M. J., & Wren, B. W. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), 835–842. <https://doi.org/10.1038/nature06248>.
- Pavlopoulou, A. (2018). RecA: a universal drug target in pathogenic bacteria. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 23(1), 36–42.
- Petrova, V., Chitteni-Pattu, S., Drees, J. C., Inman, R. B., & Cox, M. M. (2009). An SOS inhibitor that binds to free RecA protein: the PsiB protein. *Molecular Cell*, 36(1), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.026>
- Prado-Silva, L., Cadavez, V., Gonzales-Barron, U., Rezende, A. C. B., & Sant'Ana, A. S. (2015). Meta-analysis of the effects of sanitizing treatments on *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* inactivation in fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8008–8021. <https://doi.org/10.1128/AEM.02216-15>.
- Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. G., & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 465–483. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.3.465-483.2005>.
- Rasmussen, L. C. V., Sperling-Petersen, H. U., & Mortensen, K. K. (2007). Hitting bacteria at the heart of the central dogma: sequence-specific inhibition. *Microbial Cell Factories*, 6, 1–26. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-24>.
- Rogawski, E. T., Guerrant, R. L., Havt, A., Lima, I. F., Medeiros, P. H., Seidman, J. C., & Mal-Ed Network Investigators. (2017). Epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* infections and associated outcomes in the MAL-ED birth cohort. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005798. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005798>.
- Roy, S., Hasan, I., & Guo, B. (2023). Recent advances in nanoparticle-mediated antibacterial applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 482, 215075. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215075>.

- Safadi, R. A., Abu-Ali, G. S., Sloup, R. E., Rudrik, J. T., Waters, C. M., Eaton, K. A., & Manning, S. D. (2012). Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104: H4. *PloS one*, 7(7), e41628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041628>.
- Sato, T., & Shimonishi, Y. (2004). Structural features of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin that activates membrane-associated guanylyl cyclase. *The Journal of Peptide Research*, 63(3), 200–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00125.x>.
- Sawyer, A. J., Wesolowski, D., Gandotra, N., Stojadinovic, A., Izadjoo, M., Altman, S., & Kyriakides, T. R. (2013). A peptide-morpholino oligomer conjugate targeting *Staphylococcus aureus* *gyrA* mRNA improves healing in an infected mouse cutaneous wound model. *International Journal of Pharmaceutics*, 453(2), 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.041>
- Sharma, V., Sakai, Y., Smythe, K. A., & Yokobayashi, Y. (2013). Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 256–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.141>.
- Shilpakala, S. R., & Raghunathan, M. (2009). Impact of DNA gyrase inhibition by antisense ribozymes on *recA* in *E. coli*. *Molecular Biology Reports*, 36(7), 1937–1942. <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9402-5>.
- Singh, R., Ledesma, K. R., Chang, K. T., & Tam, V. H. (2010). Impact of *recA* on levofloxacin exposure-related resistance development. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10), 4262–4268. <https://doi.org/10.1128/aac.00168-10>.
- Sully, E. K., & Geller, B. L. (2016). Antisense antimicrobial therapeutics. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.017>
- Tarn, W. Y., Cheng, Y., Ko, S. H., & Huang, L. M. (2021). Antisense oligonucleotide-based therapy of viral infections. *Pharmaceutics*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122015>.
- Thi, T. D., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J. R., & Blázquez, J. (2011). Effect of *recA* inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(3), 531–538. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq496>.
- Tilley, L. D., Hine, O. S., Kellogg, J. A., Hassinger, J. N., Weller, D. D., Iversen, P. L., & Geller, B. L. (2006). Gene-specific effects of antisense phosphorodiamidate morpholino oligomer-peptide conjugates on *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in pure culture and in tissue culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(8), 2789–2796. <https://doi.org/10.1128/AAC.01286-05>
- Van-Hoek, A. H., van Veldhuizen, J. N., Friesema, I., Coipan, C., Rossen, J. W., Bergval, I. L., & Franz, E. (2019). Comparative genomics reveals a lack of evidence for pigeons as a main source of *stx2f*-carrying *Escherichia coli* causing disease in humans and the common existence of hybrid Shiga toxin-producing and enteropathogenic *E. coli* pathotypes. *BMC Genomics*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5635-z>.
- Van-Nederveen, V., Johnson, Y. S., Ortega, E., Smith, M. A., & Melton-Celsa, A. R. (2025). Role of aggregative adherence fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* isolates in biofilm and colonization. *Microbial Pathogenesis*, 203, 107444. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107444>.
- Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Lagos, R., Levine, M., Prado, V. & Vidal, R. (2005). Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5362–5365. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.10.5362-5365.2005>.

- Wang, W. (2018). Imaging the chemical activity of single nanoparticles with optical microscopy. *Chemical Society Reviews*, 47(7), 2485–2508. <https://doi.org/10.1039/c7cs00451f>
- Welinder-Olsson, C., & Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37(6-7), 405–416. <https://doi.org/10.1080/00365540510038523>.
- Wesolowski, D., Tae, H. S., Gandotra, N., Llopis, P., Shen, N., & Altman, S. (2011). Basic peptide-morpholino oligomer conjugate that is very effective in killing bacteria by gene-specific and nonspecific modes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(40), 16582–16587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112561108>.
- Wigle, T. J., Sexton, J. Z., Gromova, A. V., Hadimani, M. B., Hughes, M. A., Smith, G. R., & Singleton, S. F. (2009). Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in *Escherichia coli*. *SLAS Discovery*, 14(9), 1092–1101. <https://doi.org/10.1177/1087057109342126>.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Aljuffali, I. A., & Fang, J. Y. (2017). Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of Microbiology*, 199(6), 811–825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>.
- Zgur-Bertok, D. (2013). DNA damage repair and bacterial pathogens. *PLoS Pathogens*, 9(11), e1003711. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003711>.
- Zhang, J., He, M., Nie, C., He, M., Pan, Q., Liu, C., Hu, Y., Chen, T., & Chu, X. (2020a). Biomaterialized metal–organic framework nanoparticles enable a primer exchange reaction-based DNA machine to work in living cells for imaging and gene therapy. *Chemical Science*, 11(27), 7092–7101. <https://doi.org/10.1039/d0sc00339e>
- Zhang, Y., Xie, X., Ma, W., Zhan, Y., Mao, C., Shao, X., & Lin, Y. (2020b). Multi-targeted antisense oligonucleotide delivery by a framework nucleic acid for inhibiting biofilm formation and virulence. *Nano-micro Letters*, 12, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-0409-3>.
- Zhang, Y., Lai, L., Liu, Y., Chen, B., Yao, J., Zheng, P., & Zhu, W. (2022). Biomaterialized cascade enzyme-encapsulated ZIF-8 nanoparticles combined with antisense oligonucleotides for drug-resistant bacteria treatment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(5), 6453–6464. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c23808>.
- Zhang, C., Shu, Z., Sun, H., Yan, L., Peng, C., Dai, Z., & Chu, Y. (2023). Cu (II)@ ZIF-8 nanoparticles with dual enzyme-like activity bound to bacteria specifically for efficient and durable bacterial inhibition. *Applied Surface Science*, 611, 155599. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.155599>.