



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**QUERCETINA COMO INHIBIDOR DE la PrkA PARA EL
CONTROL DE BIOPELÍCULAS Y VIRULENCIA DE *Listeria*
*monocytogenes***

Por:

Francisco Javier Vázquez Armenta

TESIS APROBADA POR LA

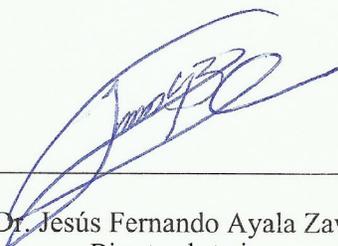
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

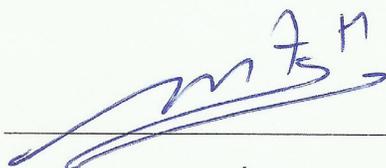
DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

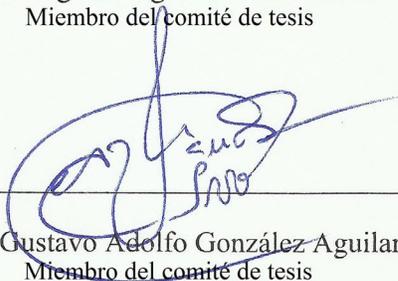
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Francisco Javier Vázquez Armenta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala
Director de tesis



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Miembro del comité de tesis



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar
Miembro del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate
Miembro del comité de tesis



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Miembro del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Quercetina como Inhibidor de la PrkA para el Control de Biopelículas y Virulencia de *Listeria monocytogenes*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Francisco Javier Vázquez Armenta, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de doctorado y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

Al proyecto CB-2013-01-222691 “Caracterización y evolución de carbohidratos y metabolitos señal en biopelículas de bacterias patógenas expuestas a antimicrobianos de origen vegetal” financiado por el fondo de ciencia básica del CONACYT.

A mi director de tesis el Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala, por su amistad, su empeño, gran apoyo y disposición para brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros de mi comité de tesis, el Dr. Alonso Alexis López Zavala, el Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate, el Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y el Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar por contribuir en la realización de esta tesis.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por brindarme el espacio necesario para el desarrollo del proyecto. Agradezco al personal y estudiantes que me facilitaron mi estancia durante estos años.

Al Laboratorio de Tecnologías Emergentes, especialmente a la M.C. Brenda Adriana Silva Espinoza, por su amistad y cariño brindado a lo largo de estos años. Al M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela, por sus consejos. A mis compañeros, Melvin Roberto, Thalía Bernal, Melissa Gutiérrez, Luis Ortega y Jesús Luna, por su amistad, los buenos momentos y apoyo brindado. Al resto de mis compañeros de laboratorio que hicieron esta etapa más amena.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal, especialmente a M.C. Emmanuel Aispuro por su asesoría técnica.

Al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de la Universidad de Sonora a cargo del Dr. Alonso Alexis López Zavala y sus miembros el Maestro César Otero, Luis Morado y Hayde Brassea por recibirme y darme un espacio en su grupo de trabajo y su gran ayuda en la última etapa de este trabajo.

Al Laboratorio de Antioxidantes y Alimentos Funcionales, especialmente a la Q.B. Mónica Villegas por su apoyo técnico.

Al Laboratorio de Patología Experimental a cargo del Dr. Humberto Astiazarán de la Coordinación de Nutrición y su asistente técnico-académico Q.B. Bertha Isabel Pacheco Moreno, por facilitarme el uso del Microscopio Láser Confocal.

A las Doctoras Filomena Nazzaro y Florinda Fratianni, por sus atenciones en la estancia que realicé en el Laboratorio de Biotecnología de los Alimentos en el Istituto di Scienze Dell'Alimentazione en Avellino, Italia.

DEDICATORIA

A Lizbeth Beltrán por brindarme su amor y apoyo, e impulsarme a lograr mis metas y a nuestro hijo Javier Emilio, ya que su llegada marco positivamente nuestras vidas.

A mis padres Lorena Alicia y Francisco Juárez y mis hermanos Humberto y Roel, porque a pesar de la distancia me han hecho sentirlos cerca.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	18
2.1 Riesgos que Representan las Biopelículas <i>Listeria monocytogenes</i> para la Salud Humana.....	18
2.2 Formación de Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> y el Papel de las Sustancias Poliméricas Extracelulares.....	22
2.3 Algunos Factores de Virulencia de <i>L. monocytogenes</i> como las Internalinas y la Proteína ActA Participan en la Formación de Biopelículas.....	24
2.4 La Señalización de la PrkA es Clave en la Regulación de la Formación de las Biopelículas y la Virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	28
2.5 Potencial de Quercetina para Inhibir PrkA y la Formación de Biopelículas y Producción de Virulencia de <i>L. monocytogenes</i>	34
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo General.....	38
4.2 Objetivos Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Etapa 1: Caracterización de la Actividad Antibacteriana y Anti-biopelícula de Quercetina contra <i>L. monocytogenes</i>	39
5.1.1 Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo	39
5.1.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) de la Quercetina contra <i>L. monocytogenes</i>	39
5.1.3 Efecto de la Quercetina sobre Biopelículas Maduras de <i>L. monocytogenes</i>	40
5.1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas de Quercetina contra <i>L. monocytogenes</i>	40
5.1.5 Efecto de la Quercetina Sobre la Permeabilidad de la Membrana y las Propiedades Físico-químicas de Células Planctónicas de <i>L. monocytogenes</i>	41
5.1.5.1 Integridad de la membrana de <i>L. monocytogenes</i> expuesta a quercetina.....	41

CONTENIDO (continuación)

5.1.5.2 Medición del potencial zeta.....	42
5.1.5.3 Determinación de la energía libre superficial.....	42
5.1.5.4 Efecto de la quercetina sobre el potencial de adhesión (ΔG_{adh}) de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable. Efecto de la quercetina sobre el potencial de adhesión (ΔG_{adh}) de <i>L. monocytogenes</i> en superficies de acero inoxidable.....	43
5.1.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	44
5.2 Etapa 2: Efecto de la Quercetina Sobre la Organización Espacio-temporal de Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> y la Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares.	44
5.2.1 Cinética de Formación de Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en Presencia de Quercetina	44
5.2.2 Extracción y Cuantificación de las Sustancias Poliméricas Extracelulares.....	45
5.2.4 Microscopía Láser Confocal de Barrido.....	46
5.2.5 Cinética de Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en Estado Planctónico Presencia de Quercetina	47
5.2.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	47
5.3 Etapa 3: Expresión de <i>prkA</i> , <i>sigB</i> , <i>prfA</i> , <i>inlA</i> , <i>inlC</i> y <i>actA</i> en <i>L. monocytogenes</i> Expuesta a la Presencia de Quercetina.....	48
5.3.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	50
5.4 Etapa 4: Efecto Inhibitorio de la Quercetina contra la PrkA.....	50
5.4.1 Construcción del Modelo de la Estructura de la PrkA.....	50
5.4.2 Sobreexpresión y Purificación del Dominio Cinasa de PrkA.....	51
5.4.3 Ensayo de Actividad Enzimática	52
5.4.4 Análisis de Acoplamiento Molecular	53
5.4.5 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	54
6.1 Etapa 1: Caracterización de la Actividad Antibacteriana y Anti-biopelícula de Quercetina contra <i>L. monocytogenes</i>	54
6.1.1 Efecto de la Quercetina sobre <i>L. monocytogenes</i> en Estado Planctónico y Biopelícula.....	54
6.1.2 Efecto de la Quercetina en la Permeabilidad de la Membrana de <i>L. monocytogenes</i> y en las Propiedades Fisicoquímicas.	58
6.1.3 Conclusiones.....	61
6.2 Etapa 2: Efecto de la Quercetina Sobre la Densidad Celular, Morfología y Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares de Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Durante su Formación.	62
6.2.1 Cinéticas de Formación de Biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en Presencia de Concentraciones No Letales de Quercetina.....	62
6.2.2 Conclusiones.....	72
6.3 Etapa 3: Expresión de Genes inducidos por la Actividad de PrkA Relacionados con la Formación de Biopelículas y Factores de Virulencia (<i>sigB</i> , <i>prfA</i> , <i>inlA</i> , <i>inlC</i> y <i>actA</i>) de <i>L. monocytogenes</i> Expuesta a Quercetina	72
6.3.1 Conclusiones.....	77

CONTENIDO (continuación)

6.4 Etapa 4: Efecto Inhibitorio de la Quercetina Sobre PrkA de <i>L. monocytogenes</i>	77
6.4.1 Modelo Tridimensional del Dominio Catalítico de la PrkA de <i>L. monocytogenes</i>	77
6.4.2 Sobreexpresión y Purificación de la PrkA Mediante Cromatografía de Afinidad	81
6.4.3 Efecto Inhibitorio de la Quercetina Sobre la Actividad Cinasa de la PrkA y Análisis de Acoplamiento Molecular	84
6.4.4 Conclusiones	92
7. CONCLUSIONES GENERALES	93
8. RECOMENDACIONES	94
9. REFERENCIAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Etapas de la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en superficies abióticas.....	23
2. Mecanismos de resistencia de las biopelículas bacterianas a antimicrobianos.....	26
3. Esquema general de la traducción de señales en bacterias.....	30
4. Diagrama de la activación de la respuesta al estrés en <i>L. monocytogenes</i> mediante el complejo proteico estresosoma.....	31
5. Organización de la región genómica que contiene el gen que codifica para la serina/treonina cinasa PrkA.....	33
6. Estructura química de la quercetina.....	36
7. Número de células viables en las biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> (24 h de formación a 37 °C) expuestas a diferentes concentraciones de quercetina durante 1 h.....	56
8. Efecto de la quercetina sobre la prevención de la adhesión (2 h) y formación de biopelículas (24 h) de <i>L. monocytogenes</i> sobre acero inoxidable a 37 °C.....	57
9. Porcentaje de absorción de cristal violeta por <i>L. monocytogenes</i> expuesta a diferentes concentraciones de quercetina como indicador de la permeabilidad de sumembrana.....	60
10. Cinética de formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> sobre acero inoxidable a 37 °C en presencia de quercetina (0.2 mM).....	65
11. Contenido de sustancias poliméricas extracelulares durante la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> sobre acero inoxidable en presencia de quercetina (0.2 mM) a 37 °C.....	66
12. Formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en presencia de quercetina a 0.2 mM a 37 °C durante 24 h.....	68
13. Microcolonias representativas de <i>L. monocytogenes</i> en el tratamiento control (A y B) y con quercetina 0.2 mM (C y D).	69
14. A) Área cubierta y B) biovolumen de las biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> formadas sobre acero inoxidable en presencia de quercetina.....	70
15. Cambios en los ratios de expresión relativa de los genes de virulencia de <i>L. monocytogenes</i> en respuesta al tratamiento con quercetina (0.2 y 0.8 mM).....	75
16. Actividad hemolítica de los sobrenadantes de <i>L. monocytogenes</i> cultivada en presencia de quercetina.....	76

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
17. Gráfica de Ramachandran del modelo de la PrkA de <i>L. monocytogenes</i>	80
18. Modelo teórico de la PrkA de <i>L. monocytogenes</i> que muestra el plegamiento característico de las serina treonina cinasas con la presencia de dos lóbulos (N y C terminal) con el sitio de unión del ATP entre ambos (círculo rojo).....	81
19. Superposición del modelo de la PrkA de <i>L. monocytogenes</i> (azul) y la estructura de PknB (PDB: 4EQM) de <i>S. aureus</i> (dorado) con el análogo del ATP.....	82
20. Cinética de sobreexpresión de la PrkA recombinante.....	83
21. Purificación de la PrkA por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).....	84
22. Ensayo de actividad enzimática de PrkA. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm error estándar.....	86
23. Efecto de la quercetina sobre la actividad residual de la PrkA. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm error estándar.....	87
24. Curva dosis-respuesta de quercetina y la actividad serina/treonina cinasa de PrkA..	88
25. Superposición de las poses de ambos ligandos determinadas por el análisis de acoplamiento molecular en el sitio de unión del ATP de la PrkA.....	90
26. Interacciones del ATP (A) y la quercetina (B) con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión del ATP de la PrkA.....	91

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Número de casos, hospitalizaciones y muertes ocasionadas por listeriosis en Estados Unidos debido al consumo de alimentos contaminados de 2011 a 2019....	20
2.	Lista de cebadores utilizados en este estudio.....	49
3.	Efecto de la quercetina sobre los parámetros de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en estado planctónico.....	64

RESUMEN

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena capaz de formar biopelículas en superficies en contacto con los alimentos, representando un riesgo para la inocuidad alimentaria. El desarrollo de las biopelículas es un proceso complejo que involucra sistemas de señalización como la proteína PrkA, una serina/treonina cinasa que regula la expresión de factores de virulencia que favorecen la adhesión célula-célula y célula-superficie. El uso de flavonoides se ha listado dentro de las estrategias para el control de la virulencia bacteriana y en particular para la inhibición de cinasas. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue demostrar que la inhibición de la PrkA mediante el flavonoide quercetina puede afectar la virulencia y formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. Nuestros resultados muestran que este compuesto fue capaz de inhibir por completo la formación de biopelículas en superficies de acero inoxidable a concentraciones de 0.8 mM. Mientras que a una concentración sub-inhibitoria (0.2 mM) redujo el contenido de proteínas de la matriz extracelular (41% respecto al testigo), afectando la organización espacio-temporal y maduración de las biopelículas. Mientras que el análisis de RT-qPCR reveló que el tratamiento con la quercetina reprimió la expresión de genes que modulan la respuesta al estrés (*sigB*) y virulencia (*prfA*, *inlA*, *inlC* y *actA*), los cuales además participan en la formación y resistencia de biopelículas en este patógeno. Estos genes se inducen por la señalización de la PrkA, por lo que esta proteína fue sobre expresada, purificada y su actividad fue inhibida en presencia de quercetina, mostrando valores de $IC_{50} = 76.04 \pm 0.39 \mu M$. El análisis de acoplamiento molecular sugirió que este compuesto puede interactuar con los residuos de aminoácidos del sitio de unión del ATP (Ala38, His90, Leu141 y Gln138) que participan en la transferencia del grupo fosfato, actuando como un posible inhibidor competitivo. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la quercetina inhibe la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable y su virulencia; efecto que se le atribuye a su capacidad de interferir con el sistema de señalización mediado por la serina/treonina cinasa PrkA.

Palabras Clave: Señalización bacteriana, Serina/treonina cinasas, virulencia, compuestos naturales.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium capable to form biofilms on food contact surfaces, representing a risk for food safety. Biofilms development is a complex process that involves signaling systems such as the mediated by PrkA protein, a serine/threonine kinase that regulates the expression of virulence factors that favor cell-cell and cell-surface adhesion. The use of flavonoids has been listed within the strategies for the control of bacterial virulence and in particular for the inhibition of kinases. Therefore, the objective of the present work was to demonstrate that the inhibition of PrkA by the flavonoid quercetin can affect the virulence and biofilm formation of *L. monocytogenes*. Our results show that this compound was able to completely inhibit the formation of biofilms on stainless steel surfaces at concentrations of 0.8 mM. While at a sub-inhibitory concentration (0.2 mM) it reduced the protein content of the extracellular matrix (41% compared to the control), affecting the spatiotemporal organization and maturation of the biofilms. While RT-qPCR analysis revealed that quercetin treatment repressed the expression of genes that modulate the stress response (*sigB*) and virulence (*prfA*, *inlA*, *inlC* and *actA*), which also participate in the formation and resistance of biofilms in this pathogen. These genes are induced by PrkA signaling, so this protein was over expressed, purified and its activity was inhibited in the presence of quercetin, showing values of $IC_{50} = 76.04 \pm 0.39 \mu M$. Molecular docking analysis suggested that this compound can interact with the amino acid residues of the ATP binding site (Ala38, His90, Leu141 and Gln138) involved in the transfer of the phosphate group, acting as a possible competitive inhibitor. These results show that quercetin inhibits the formation of biofilms of *L. monocytogenes* on stainless steel surfaces and their virulence; this effect is attributed to its ability to interfere with the signaling system mediated by the serine/threonine kinase PrkA.

Keywords: Bacterial signaling, Serine/threonine kinases, virulence, natural compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena en humanos que se transmite a través de los alimentos contaminados, cuya contaminación ocurre principalmente durante la producción y/o procesamiento de los mismos (Orsi et al., 2011). La infección provocada por esta bacteria se conoce como listeriosis y se puede manifestar como una típica infección gastrointestinal o de manera invasiva, que es su forma más severa (Vera et al., 2013). El tratamiento de la listeriosis invasiva es prolongado y aumenta considerablemente los costos de hospitalización, y además presenta una tasa de mortalidad de entre el 20 y 30% (Hoffman et al., 2015). Por lo que el control de este patógeno es un reto actual que enfrenta la industria alimentaria y el sector salud.

En México se ha confirmado la presencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos, pechugas de pollo y productos lácteos (Castañeda-Ruelas et al., 2013; Torres-Vitela et al., 2012) así como en superficies en contacto con los alimentos de plantas productoras de queso fresco (Moreno-Enriquez et al., 2007). Su prevalencia en áreas de procesamiento de alimentos se relaciona con su extraordinaria capacidad de resistencia a condiciones ambientales adversas y de multiplicación a pH entre 4.6 – 9.5, baja actividad de agua y temperaturas cercanas a 0 °C (Carpentier y Cerf, 2011). Además, su capacidad de adherirse y formar biopelículas en superficies abióticas le ayuda a persistir y sobrevivir a los ciclos de limpieza y desinfección en la industria alimentaria (Colagiorgi et al., 2016).

Las biopelículas son comunidades bacterianas asociadas a una superficie, que se caracterizan por la producción de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), las cuales son usadas para su protección de condiciones ambientales adversas (da Silva Meira et al., 2012; Flemming y Wingender, 2010). Las SPE presentes en las biopelículas de *L. monocytogenes* incluyen en mayor medida proteínas, y en una menor proporción ADN extracelular y polisacáridos (Colagiorgi et al., 2016; Combrouse et al., 2013). De las proteínas que se ha identificado en la matriz extracelular de biopelículas de *L. monocytogenes* se encuentran factores de virulencia como la proteína ActA y las internalinas (InlA e InlC), las cuales participan en la unión célula-célula y célula superficie, respectivamente, dándole estabilidad a las biopelículas (Travier et al., 2013). Cada uno de estos componentes cumple una función distinta, pero la interacción entre ellos forma una red compleja que le ayuda a retener agua y nutrientes actuando como un hidrogel (Koo y Yamada, 2016). La

matriz de SPE también actúa como una barrera protectora contra amenazas a la comunidad, como la acción de antimicrobianos, esta matriz inactiva o restringe la llegada de antibióticos a las células embebidas.

Otra característica de las biopelículas es que las bacterias que la conforman presentan un estado metabólico diferente al de las bacterias planctónicas o libres, ya que la asociación de las bacterias a la superficie induce en ellas cambios en los patrones de expresión genética que le permite adaptarse a ese estilo de vida (Toyofuku et al., 2016). Esto también provoca que algunos antimicrobianos que son efectivos contra bacterias planctónicas, no lo sean contra bacterias en biopelícula. Por lo que, una vez formadas las biopelículas, su erradicación se vuelve más complicada y ocasiona incrementos en los gastos de desinfección al tener que aumentar la frecuencia de los ciclos de desinfección/limpieza durante el saneamiento de rutina de las instalaciones de procesamiento (Borges et al., 2013; Ibusquiza et al., 2011). Por tal motivo, actualmente existe la búsqueda constante de estrategias para prevenir la formación de estas comunidades en superficies abióticas de interés alimentario.

Para poder implementar estrategias efectivas para el control de biopelículas es necesario comprender los mecanismos moleculares que regulan su formación. En este contexto, se sabe que condiciones de estrés como cambios de pH, osmolaridad, estrés oxidativo y daños a la pared celular, desencadenan la formación de biopelículas, lo que hace evidente la participación de sistemas específicos de señalización. En *L. monocytogenes*, la señalización mediante fosforilación en residuos de serina y/o treonina mediada por la proteína cinasa PrkA juega un papel importante en procesos fisiológicos como su división celular, modificación de la pared, secreción de proteínas, respuesta al estrés, virulencia y patogenicidad (Lima et al., 2011; Pensinger et al., 2016). El hecho de que la respuesta al estrés desencadene la expresión de factores de virulencia que se involucran en la formación de biopelículas, y que la PrkA participe en ambos procesos, nos permite considerar a la PrkA como una posible diana para inhibición y por lo tanto en el control de biopelículas y virulencia de *L. monocytogenes*. A este tipo de estrategia se le conoce como “anti-virulencia” ya que se busca interferir específicamente en los procesos que regulan la virulencia de los patógenos sin generar presión evolutiva que pudiera provocar desarrollo de resistencia, que comúnmente se asocia a los compuestos con actividad biocida (Rasko y Sperandio, 2010).

En otros campos de la ciencia como la medicina, las serina/treonina cinasas de células eucariotas son consideradas dianas para el tratamiento de diferentes patologías como el cáncer y algunas

enfermedades crónico degenerativas y los estudios en esta área se han enfocado en la búsqueda de compuestos inhibidores (Taunton et al., 2014). Los inhibidores de cinasas se clasifican en cuatro tipos, de acuerdo a su mecanismo de inhibición (Wu et al., 2015). Los tipo I y II son inhibidores que compiten por el sitio de unión del ATP y mientras que los tipo III y IV son inhibidores alostéricos no competitivos (Wu et al., 2015). De estos los inhibidores que compiten por el sitio de unión del ATP se consideran de amplio espectro, ya que este sitio de unión se encuentra altamente conservado entre las serina/treonina cinasas (Endicott et al., 2012). De esta búsqueda, destaca la efectividad de compuestos naturales como los flavonoides, que son metabolitos secundarios de plantas con propiedades bioactivas como capacidad antioxidante, antimicrobiana y antiproliferativa (Wang et al., 2018). De estos compuestos, la quercetina ha sido de los más efectivos al presentar valores de $IC_{50} = 2.7 - 27.5 \mu M$ contra serina/treonina cinasas eucariotas como las caseína cinasas CK1, CK2 y G-CK de humanos (Lolli et al., 2012; Nehmé et al., 2013). La estructura de la quercetina está formada por dos anillos bencénicos A y B, y un anillo heterocíclico C con sustituciones de grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 7, 3'y 4'. Adicionalmente este flavonoide es reconocido por su capacidad de inhibir diferentes enzimas bacterianas que hidrolizan ATP, mediante competencia por el sitio de unión de este sustrato (Plaper et al., 2003; Wu et al., 2008; Wu et al., 2013), ya que los anillos A y C de la quercetina mimetizan el anillo de adenina del ATP (Plaper et al., 2003). Por lo anterior, en la presente tesis se plantea el uso de quercetina como inhibidor de la actividad de la PrkA para atenuar la virulencia y formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Riesgos que Representan las Biopelículas *Listeria monocytogenes* para la Salud Humana

El género *Listeria* está constituido por 19 especies, siendo *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* las más representativas (Leclercq et al., 2019). Las especies de *Listeria* son bacilos Gram-positivos, anaerobios y no producen esporas. De estas *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son patógenas para mamíferos, pero esta última es la especie más comúnmente asociada con enfermedades tanto en animales como en humanos (Orsi et al., 2011). En humanos, *L. monocytogenes* es el agente etiológico de la listeriosis, una enfermedad transmitida por alimentos con una alta tasa de mortalidad (20-30%) que se puede presentar de forma gastrointestinal o invasiva (Vera et al., 2013). La listeriosis gastrointestinal se manifiesta como una típica infección febril con cuadros de diarrea y en algunos casos se presenta dolor muscular y dolor de cabeza (Sim et al., 2002). Mientras que la listeriosis invasiva se caracteriza por la adhesión e invasión de la bacteria a células epiteliales con una subsecuente translocación a distintos órganos, teniendo como consecuencia una infección sistémica en el hospedero (Vera et al., 2013). Esta última incluye padecimientos severos como la meningitis, septicemias y abortos, afectando principalmente a personas inmunodeficientes, o inmunocomprometidas como embarazadas, ancianos y niños (Castañeda-Ruelas et al., 2014).

De acuerdo al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) el tratamiento de la listeriosis representa una carga económica anual de alrededor 2.8 billones de dólares, esto debido a que el periodo de hospitalización es de 3 y 7 días, con una recuperación post-hospitalización de 21 días (Hoffman et al., 2015). En algunos casos, donde se presenta sepsis y/o meningitis (principalmente en adultos de la tercera edad) los pacientes requieren cuidados intensivos, aumentando el costo de los tratamientos. A su vez, la USDA posiciona a *L. monocytogenes* en el tercer lugar de la lista de patógenos que representan mayor carga económica anual (Hoffman et al., 2015). Por otra parte, en Canadá se estimó que un brote de listeriosis ocurrido en 2008, asociado a productos cárnicos donde se presentaron 57 casos confirmados y 24 muertes; causó un costo aproximado de 242 millones de dólares canadienses debido a los gastos médicos, así como los de

la planta productora implicada y de las agencias federales que respondieron al brote (Kate et al., 2015). Mientras que en Sudáfrica, el brote de listeriosis ocurrido entre diciembre de 2017 y marzo de 2018 causó un gasto aproximado de 260 millones de dólares debido a las muertes presentadas, 10.4 millones de dólares debido a hospitalización y de alrededor de 15 millones de dólares por disminución de exportaciones (Olanya et al., 2019). Estos datos reflejan la magnitud del problema que representa *L. monocytogenes* para la salud pública y la economía mundial, obligando a las agencias de sanidad a promover políticas para disminuir la prevalencia y propagación de esta enfermedad.

La transmisión de este patógeno ocurre a través del consumo de alimentos contaminados. Desafortunadamente en México, no se cuenta con un registro adecuado de listeriosis transmitida por alimentos contaminados (Castañeda-Ruelas et al., 2018). Sin embargo, esto no significa que no represente un riesgo para la salud pública, ya que su presencia en México se ha confirmado en alimentos como pechuga de pollo cruda, salchichas de pavo, carne molida y quesos frescos (Castañeda-Ruelas et al., 2013; Torres-Vitela et al., 2012), así como en superficies en contacto con alimentos en plantas productoras de queso fresco (Moreno-Enriquez et al., 2007). Además, en México, Castañeda-Ruelas et al. (2018) encontraron relación genética entre cepas aisladas de casos clínicos y las aisladas de alimentos, lo que sugiere la participación de los alimentos contaminados en la transmisión de este patógeno.

Por otra parte, en Estados Unidos de América, el Centro de Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) mantiene activo un programa de vigilancia epidemiológica donde se registran los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, incluyendo la listeriosis. En el Cuadro 1 se enlistan los brotes de listeriosis reportados del 2011 al 2018; se puede observar el alto número de casos que requirieron hospitalización y la alta proporción de decesos (21 %). Sin embargo, pueden existir subestimaciones considerando que el diagnóstico de *L. monocytogenes* es complicado debido a su ciclo de vida intracelular y a que sus infecciones no siempre se manifiestan clínicamente con una respuesta inmune típica de una infección bacteriana (Blum-Menezes et al., 2013). Por otra parte, es importante hacer énfasis en la participación en estos brotes a los alimentos de origen vegetal y los alimentos listos para su consumo, ya que estos son los que representan mayor riesgo para el consumidor al no ser sometidos a algún tratamiento posterior a su compra. Además, al tratarse de alimentos industrializados se resalta la problemática del control de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria.

Cuadro 1. Número de casos, hospitalizaciones y muertes ocasionadas por listeriosis en Estados Unidos debido al consumo de alimentos contaminados de 2011 a 2019.

Año	Producto	Número de casos	Hospitalizaciones/muertes
2019	Carnes frías y quesos cortados en tiendas o secciones deli	8	8/1
2018	Jamón ahumado	4	4/1
	Carne de puerco lista para su consumo	4	4/0
2017	Quesos	8	8/2
2016	Vegetales congelados	9	9/3
	Leche cruda	2	2/1
	Ensalada lista para su consumo	19	19/1
2015	Productos de heladería	10	10/3
2014	Manzanas caramelizadas	35	34/7
	Germinados de soya	5	5/2
	Quesos	5	4/1
	Queso fresco	8	7/1
2013	Quesos	6	6/1
2012	Queso ricota	22	20/4
2011	Melón	147	142/33

Fuente: Center of Disease Control.

La persistencia de este patógeno en las plantas de procesamiento de alimentos se relaciona en parte con su notable capacidad para soportar una amplia gama de condiciones ambientales estresantes, ya que puede proliferar a temperaturas cercanas a 0 °C, valores de pH que van de 4.6 a 9.5, así como en una actividad de 0.92 (Carpentier y Cerf, 2011). Además, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de adherirse a las superficies abióticas dentro de las plantas procesadoras, multiplicarse y, posteriormente, formar biopelículas (Colagiorgi et al., 2016). Por definición, las biopelículas son comunidades microbianas asociadas a superficies y embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de producción propia (da Silva Meira et al., 2012; Flemming y Wingender, 2010). Las biopelículas son especialmente problemáticas para los procesadores de alimentos, ya que las SPE brindan protección contra los agentes antimicrobianos y a los procesos de desinfección/limpieza empleados durante el saneamiento de rutina de las instalaciones de procesamiento (Borges et al., 2013; Ibusquiza et al., 2011).

A pesar del hecho de que las biopelículas son difíciles de eliminar, sus capas externas pueden transferirse a otras superficies o alimentos por contacto debido a fuerzas de cizallamiento o compresión que provocan el desprendimiento de cúmulos de bacterias (Gusnaniar et al., 2017). Este fenómeno se denomina transmisión bacteriana y está considerado como una de las principales causas de contaminación cruzada o recontaminación y podría ser el factor principal que contribuye a las enfermedades esporádicas y epidémicas transmitidas por los alimentos (Pérez-Rodríguez et al., 2008). Por lo tanto, la presencia de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies en contacto con alimentos representa un riesgo de inocuidad debido a la posibilidad de contaminar los alimentos durante su procesamiento. En este sentido, comprender el mecanismo específico de la adhesión de *L. monocytogenes* y de la formación de biopelículas es necesario para establecer estrategias efectivas para prevenir la contaminación o recontaminación causada por este patógeno durante el procesamiento de alimentos y asegurar así su inocuidad.

2.2 Formación de Biopelículas de *L. monocytogenes* y el Papel de las Sustancias Poliméricas Extracelulares

En general, la formación de biopelículas bacterianas se lleva a cabo en cinco pasos consecutivos (Figura 1). El primer contacto entre las bacterias y la superficie se llama unión reversible (i) porque está mediada por interacciones fisicoquímicas inespecíficas de baja afinidad (puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones ácido-base) entre las macromoléculas de la superficie bacteriana y los componentes del sustrato. Una subpoblación de estas bacterias se une irreversiblemente (ii) a la superficie como resultado de la secreción de SPE que fortalecen la adhesión de la bacteria a la superficie. Las células adheridas comienzan a replicarse y formar microcolonias (iii) que tienden a expandirse y de formar una biopelícula madura con una estructura tridimensional definida (iv). Por último, estas comunidades pueden dispersarse (v) para colonizar nuevos nichos (Srey et al., 2013). La duración de cada etapa depende de múltiples factores como las condiciones ambientales, disponibilidad de nutrientes y del tipo de bacteria; sin embargo, la formación de microcolonias y su maduración son las etapas relativamente más lentas en comparación con las etapas de adhesión que puede ocurrir en cuestión de minutos (Kalmokoff et al., 2001).

Por otra parte, la maduración de las biopelículas se caracteriza por el incremento en la síntesis y acumulación de las SPE. El componente mayoritario de la matriz extracelular de *L. monocytogenes* son proteínas, seguido de ADN extracelular y en menor proporción polisacáridos (Colagiorgi et al., 2016; Combrouse et al., 2013). Esto difiere de la composición de biopelículas de otras bacterias patógenas como *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* donde los polisacáridos son el componente mayoritario (Foreman et al., 2013; Hung et al., 2013; Schlisselberg et al., 2015; Yang et al., 2011). Las SPE forman una red compleja que ayuda a mantener a las bacterias unidas entre sí y permite el desarrollo de estructuras tridimensionales para la retención de agua, acumulación de nutrientes, formación de gradientes de pH, O₂, difusión de moléculas señal y otros solutos (Koo y Yamada, 2016). Esto permite que las bacterias dentro de la biopelícula se diferencien y puedan llevar a cabo funciones distintas (Vlamakis y Kolter, 2015). Aunque la arquitectura de las biopelículas de *L. monocytogenes* se ha estudiado ampliamente (Cherifi et al., 2017; Guilbaud et al., 2015; Reis-Teixeira et al., 2017); cuestiones como el tiempo

en el que se desarrolla una biopelícula madura, la relación existente entre la composición química de la matriz extracelular con las características estructurales de la biopelícula y los factores que determinan la resistencia de una biopelícula madura de *L. monocytogenes* aún continúan sin esclarecerse.

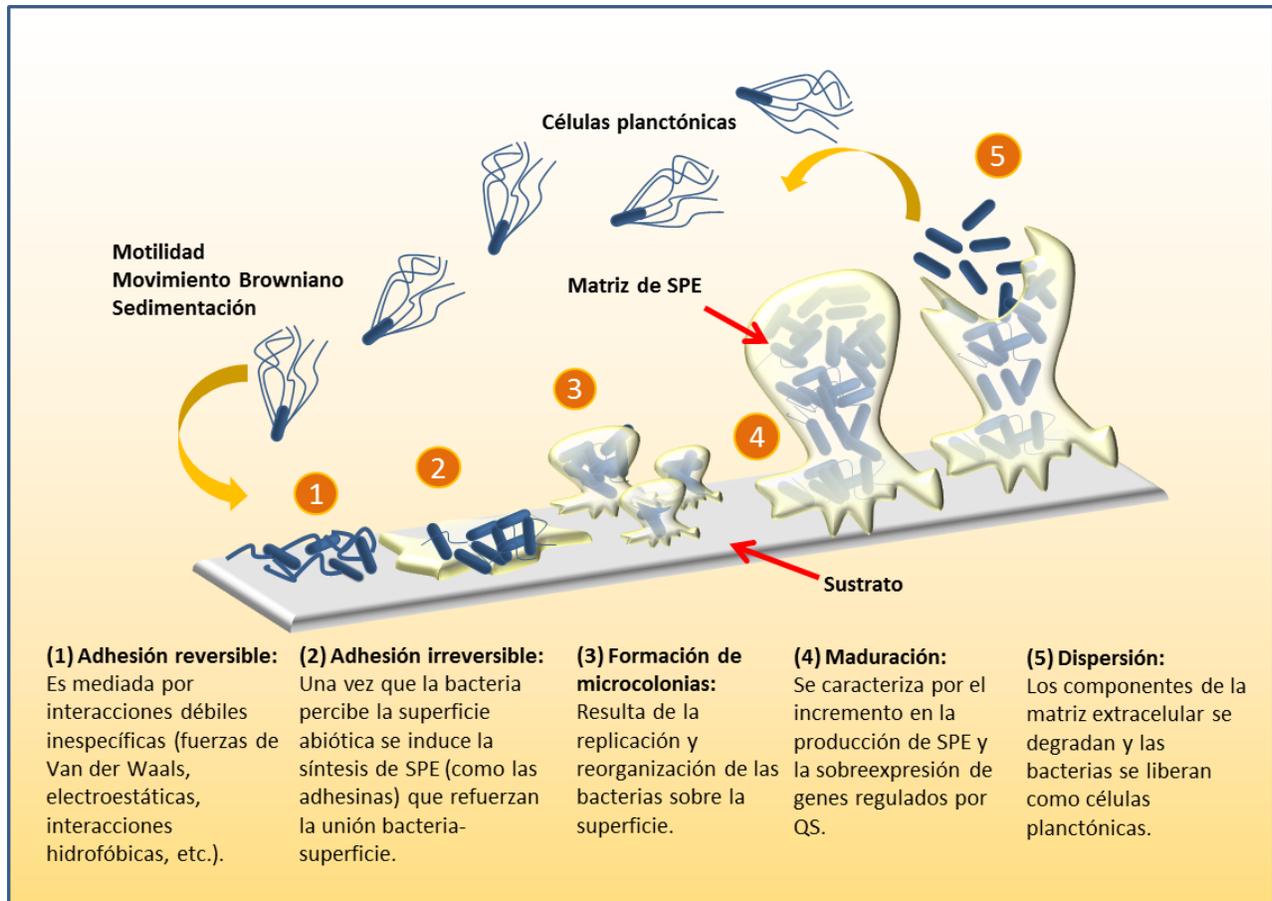


Figura 1. Etapas de la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies abióticas.

Otra de las funciones de la matriz extracelular es actuar como barrera protectora, por lo que las bacterias en biopelícula son menos susceptibles a la acción de agentes antimicrobianos. Se han propuesto algunos mecanismos de resistencia de las biopelículas en general, los cuales se ilustran en la Figura 2 e incluyen: (i) poca difusión de los antimicrobianos, (ii) inactivación de los antimicrobianos por los componentes de la matriz extracelular, (iii) un estado metabólico alterado,

(iv) adaptaciones genéticas y (v) la resistencia inducida por el propio agente antimicrobiano (Borges et al., 2013).

En *L. monocytogenes* se reporta que la eficacia del cloruro de benzalconio y nisina disminuye conforme las biopelículas maduran (Ibusquiza et al., 2011). Además encontraron que cepas que desarrollan una estructura tridimensional más compleja en su biopelícula presentan mayor tolerancia a estos tratamientos (Ibusquiza et al., 2011). De igual manera, Papaioannou et al. (2018) demostraron que las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas durante 7 días son menos susceptibles a la acción de desinfectantes a base de cloro y compuestos de amonio cuaternario, en comparación a las biopelículas formadas durante 3 días. Mientras que Pan et al. (2006) observaron que las biopelículas expuestas repetidamente a peróxido de hidrógeno desarrollaron resistencia a este compuesto y a otros desinfectantes como compuestos de amonio cuaternario y cloro. Sin embargo, al desprender las células de las biopelículas control y las tratadas con peróxido, estas ya no mostraron la resistencia a los desinfectantes. Estos datos llevaron a los autores a concluir que la resistencia de las bacterias en biopelícula puede deberse a los atributos de las sustancias poliméricas extracelulares (Pan et al., 2006).

Los mecanismos exactos de tolerancia que adquieren las biopelículas maduras de *L. monocytogenes* y que componentes de la matriz extracelular contribuyen a esta tolerancia aún se desconocen. Por lo que, estudios con cepas mutantes deficientes en la producción de uno o más componentes de la matriz extracelular de *L. monocytogenes* ayudarían a elucidar estos mecanismos, al igual que se ha hecho en otras bacterias como *P. aeruginosa* (Xue et al., 2013) o *E. coli* O157:H7 (Ryu y Beuchat, 2005). Por lo que la generación de conocimiento sobre los mecanismos de producción de SPE durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* y su organización estructural podría servir para el diseño de estrategias para el control de este patógeno.

2.3 Algunos Factores de Virulencia de *L. monocytogenes* como las Internalinas y la Proteína ActA Participan en la Formación de Biopelículas

L. monocytogenes es un patógeno intracelular y su proceso de infección requiere la coordinación de la expresión de sus factores de virulencia que permiten a la bacteria invadir, replicarse y diseminarse en el hospedero, así como a eludir sus defensas (Cross, 2008). Los factores de virulencia son cualquier producto o estrategia de la bacteria que contribuya a su habilidad de causar la enfermedad, por ejemplo la motilidad bacteriana, la producción de toxinas, la síntesis de proteínas extracelulares que ayudan a la adhesión e invasión de las células del hospedero, los carbohidratos asociados a la superficie que protegen a la bacteria, y enzimas hidrolíticas que contribuyen a la patogenicidad (Camejo et al., 2011). En *L. monocytogenes* los genes que codifican para sus factores de virulencia se encuentran organizados en la isla de patogenicidad 1 (LIPI-1) que está conformada por *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpL*, *prfA*, el operón *inlAB*, *inlC* y *hpt* (de las Heras et al., 2011).

La mayoría de los genes que codifican a los factores de virulencia son regulados coordinadamente por el factor de transcripción PrfA, un miembro de la familia Crp/Fnr de reguladores de la transcripción que se unen a sitios específicos del ADN (Artola y Herrejón, 2010; Lobel et al., 2015). A su vez, la regulación del gen *prfA* es muy compleja, y se transcribe desde tres promotores distintos; P1 y P2 que se localizan corriente arriba del codón de inicio de la traducción y P3, un promotor distal localizado corriente arriba del gen *plcA*, lo que resulta en la expresión bicistónica del transcrito *plcA-prfA* (Rauch et al., 2005). A su vez, la transcripción desde los promotores P1 y P2 requiere de los factores sigma alternativos SigA y SigA o SigB, respectivamente (Lobel et al., 2015; Scotti et al., 2007). Además, *prfA* es negativamente regulado por ARN de interferencia y a nivel postraduccional mediante glutatión (Scotti et al., 2007). Después de la ingestión, la bacteria es capaz de atravesar el epitelio intestinal y diseminarse a través de la linfa y el torrente sanguíneo a los tejidos más profundos (Stavru et al., 2011).

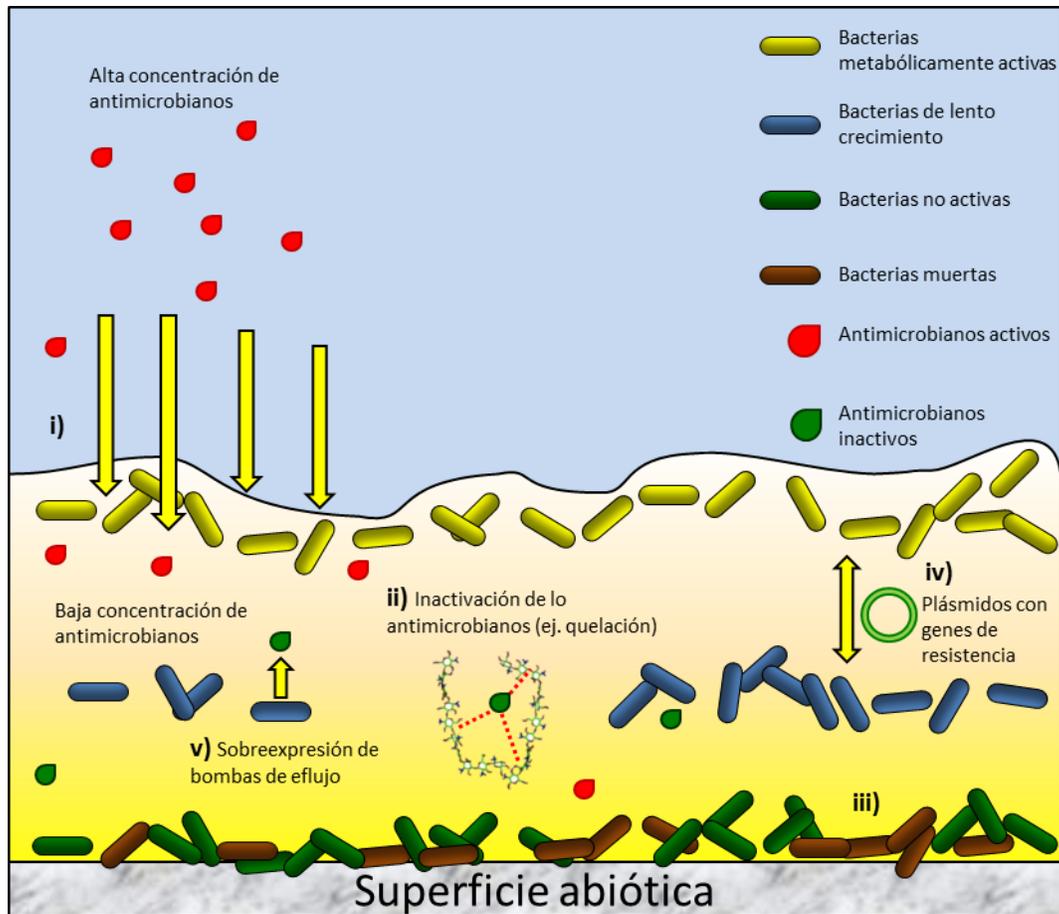


Figura 2. Mecanismos de resistencia de las biopelículas bacterianas a antimicrobianos. i) Baja difusión de los antimicrobianos dentro de la biopelícula; ii) interacción con los componentes de la matriz de SPE; iii) estado metabólico de la bacteria alterado; iv) adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal y v) sobreexpresión de bombas de eflujo (Borges et al., 2013).

El primer paso en la infección de *L. monocytogenes* es la adhesión e invasión de bacterias a las células epiteliales en el intestino y está mediada por al menos dos proteínas superficiales llamadas Internalinas A y B (InlA y InlB) (Chen et al., 2011). La InlA se une a la cadherina de las células huésped, mientras que la InlB al receptor tirosina cinasa Met, facilitando su entrada por fagocitosis (Chen et al., 2011). Una vez que la bacteria es fagocitada, la toxina formadora de poros Listeriolisina (LLO) y dos fosfolipasas (PlcA y PlcB) permiten su escape de la célula, liberándose al citosol donde es capaz de crecer y multiplicarse (Hamon et al., 2012; Meyer-Morse et al., 2010). Finalmente, la translocación de *L. monocytogenes* a células vecinas se produce a través de la proteína inductora del ensamblaje de actina (ActA) que permite la motilidad intracelular mediante

la polimerización de las fibras de actina (Artola y Herrejón, 2010; Travier et al., 2013). Por lo tanto, la expresión de los factores de virulencia durante la infección es un proceso cuidadosamente regulado.

PrfA además de regular la virulencia de este patógeno, también promueve la formación de biopelículas en hábitats no entéricos, lo que sugiere que este factor de transcripción tiene un rol global en la modulación de los estilos de vida de *L. monocytogenes* (Lemon et al., 2010). Esta idea se sustenta con la evidencia de que algunos factores de virulencia están involucrados en la formación de biopelículas en hábitats no entéricos. Por ejemplo, algunas cepas de *L. monocytogenes* que producen InlA trunca, es decir que su síntesis se interrumpe prematuramente, exhiben una mayor capacidad de formar biopelículas (Franciosa et al., 2009). Por otro lado, Chen et al. (2009) encontraron una correlación positiva entre la fuerza de adhesión de *L. monocytogenes* en superficies de vidrio con la expresión relativa de los genes de *inlA* y *inlB*. Mientras que Gilmartin et al. (2016) observaron que la InlA se expresa en mayor medida en células planctónicas que en biopelículas maduras (24 h). Aunque cepas mutantes con delección en el gen *inlA* son capaces de formar biopelículas maduras (Yang, 2012). Esto podría indicar que la InlA juega un papel importante en las etapas iniciales como la adhesión en lugar de etapas posteriores. Otra internalina, la InlC se ha cuantificado en mayor abundancia en células de *L. monocytogenes* que crecen en biopelícula en comparación con células en estado planctónico (Lourenço et al., 2013), lo que sugiere que las diferentes internalinas tienen distintas funciones durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

Otro factor de virulencia que se ha cuantificado en mayor proporción en biopelículas que en células planctónicas es la proteína ActA (Lourenço et al., 2013). Este factor de virulencia se asocia principalmente al estilo de vida intracelular (García-del Portillo et al., 2011). Pero también se ha demostrado mediante mutaciones isogénicas ($\Delta prfA$, $\Delta inlA$, $\Delta inlB$, $\Delta actA$ y Δhly) que ActA se involucra en mayor medida con la formación de biopelículas (Travier et al. 2013). En el mismo estudio se comprobó que la proteína ActA promueve la agregación bacteriana mediante interacciones directas ActA-ActA, favoreciendo la formación de biopelículas en los hábitos extracelulares (Travier et al., 2013). Estas interacciones ocurren en el extremo C-terminal de ActA, que no es esencial para la polimerización de la actina, lo que sugiere otras funciones además de la motilidad intracelular, por ejemplo, la adhesión intercelular (Travier et al., 2013). Sin embargo, se

desconoce el patrón de expresión del gen que codifica este factor de virulencia durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.

La capacidad de *L. monocytogenes* para utilizar factores de virulencia para invadir las células huésped y formar biopelículas, garantiza su supervivencia en los hábitos entéricos (estilo de vida intracelular) y en los hábitos no entéricos (estilo de vida sésil). Es posible que la participación de PrfA en ambos procesos requiera componentes regulatorios que respondan a diferentes estímulos o condiciones ambientales. Sin embargo, las redes de señalización que controlan la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* siguen sin entenderse completamente.

2.4 La Señalización de la PrkA es Clave en la Regulación de la Formación de las Biopelículas y la Virulencia de *L. monocytogenes*

Los desencadenantes de la transición del estado planctónico al modo de vida sésil pueden ser múltiples, como la falta de nutrientes (Zhao et al., 2017), un estrés oxidativo (Gambino y Cappitelli, 2016), el contacto físico con las superficies abióticas (O'Toole y Wong, 2016) o el daño en la pared celular (Chen et al., 2014). Las bacterias son capaces de censar estas condiciones mediante sistemas de percepción y traducción de señales químicas que desencadenan cambios específicos en la expresión genética y traen como consecuencia una serie de cambios metabólicos y fenotípicos (Bridier et al., 2017). En principio, la señalización en bacterias ocurre en tres pasos (Figura 3): (i) una señal ambiental (O_2 , fragmentos de peptidoglicano o moléculas señal) es percibida por receptores celulares, (ii) La información que es recibida es traducida a una señal química y regularmente es amplificada antes de (iii) evocar una respuesta específica (Berg et al., 2002). Estos receptores frecuentemente son proteínas transmembranales que tienen tanto dominios extracelulares como intracelulares. Un sitio de unión en el dominio extracelular reconoce específicamente la molécula señal o ligando y esta interacción receptor-ligando altera la estructura terciaria o cuaternaria del receptor, incluido el dominio intracelular. Comúnmente, estos cambios conformacionales activan el dominio catalítico intracelular y provocan la cascada de señalización (Airola et al., 2013).

En *L. monocytogenes*, la transición al estado de vida sésil está relacionada con la respuesta al estrés, mediada por el factor de transcripción SigB (van der Veen y Abee, 2010). SigB contribuye a la adaptación a bajas temperaturas, pH bajo, alta osmolaridad, estrés oxidativo y al agotamiento de nutrientes, factores que influyen en la formación de biopelículas de esta bacteria (Raimann et al., 2009). Además, la actividad de SigB está estrechamente relacionada con la virulencia de *L. monocytogenes*, ya que es capaz de unirse al promotor *PprfA2* que controla la transcripción de *PrfA*, que su vez controla la expresión de genes asociados a factores de virulencia como internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC*), listeriolisina O (*hly*), fosfolipasa C (*plcB*) y la proteína ActA (*actA*) los cuales están involucrados en la formación de biopelículas en hábitats extracelulares (Kelley et al., 2015). El factor de transcripción SigB es controlado al nivel post-traducciona l mediante una red de señalización que involucra la actividad de cinasas y fosfatasas y un complejo proteico denominado estresosoma (Figura 4) (Shin et al., 2010). El estresosoma, que se describió primeramente en *Bacillus subtilis*, está compuesto por las proteínas RsbR, RsbS y RsbT. Presenta una estructura supramolecula r icosaédrica compuesta de 40 copias de RsbR asociada a 20 copias de RsbS y en estado basal, 20 moléculas de RsbT que se asocian con 20 moléculas de RsbS (Marles-Wright et al., 2008). Se ha descrito que el mecanismo para censar el estrés del entorno de *L. monocytogenes* es idéntico al de *B. subtilis* (Shin et al., 2010). Cuando la bacteria entra en estado de estrés, RsbR es activado mediante fosforilación en el residuo Thr171 (Kim et al., 2004) lo que provoca la disociación de RsbT del estresosoma. RsbT en su forma libre se une y activa a la fosfatasa RsbU mediante interacción proteína-proteína directa (Shin et al., 2010). Cuando RsbU se encuentra activa, defosforila a la proteína RsbV y de ésta forma RsbV se une a la proteína anti-sigB, RsbW. SigB se mantiene inactivo al estar unido a RsbW, por lo que la interacción entre RsbV y RsbW provoca la liberación de SigB en su forma activa (Shin et al., 2010).

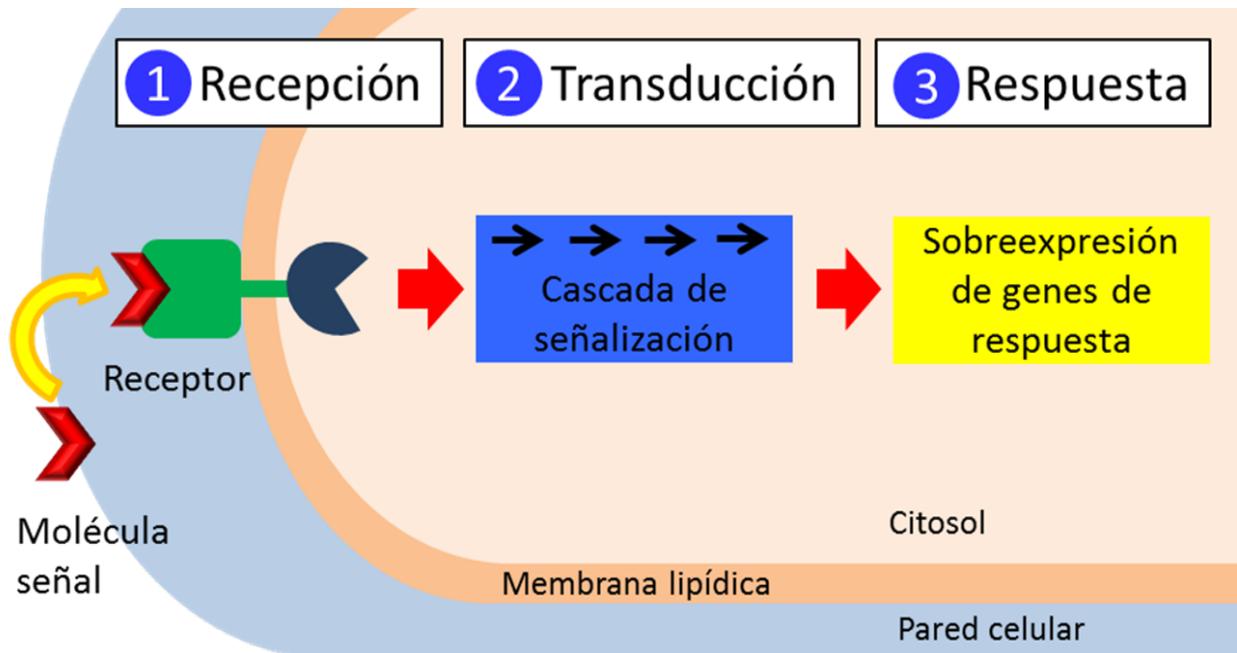


Figura 3. Esquema general de la traducción de señales en bacterias. En este modelo, las señales medioambientales son percibidas por receptores específicos que comúnmente sufren cambios conformacionales debido a la unión del ligando, lo que provoca la activación del dominio intracelular que convierte las señales percibidas en señales químicas mediante fosforilación, produciendo cascadas de señalización. Como resultado, se produce la sobreexpresión de genes de respuesta específicos para la señal percibida.

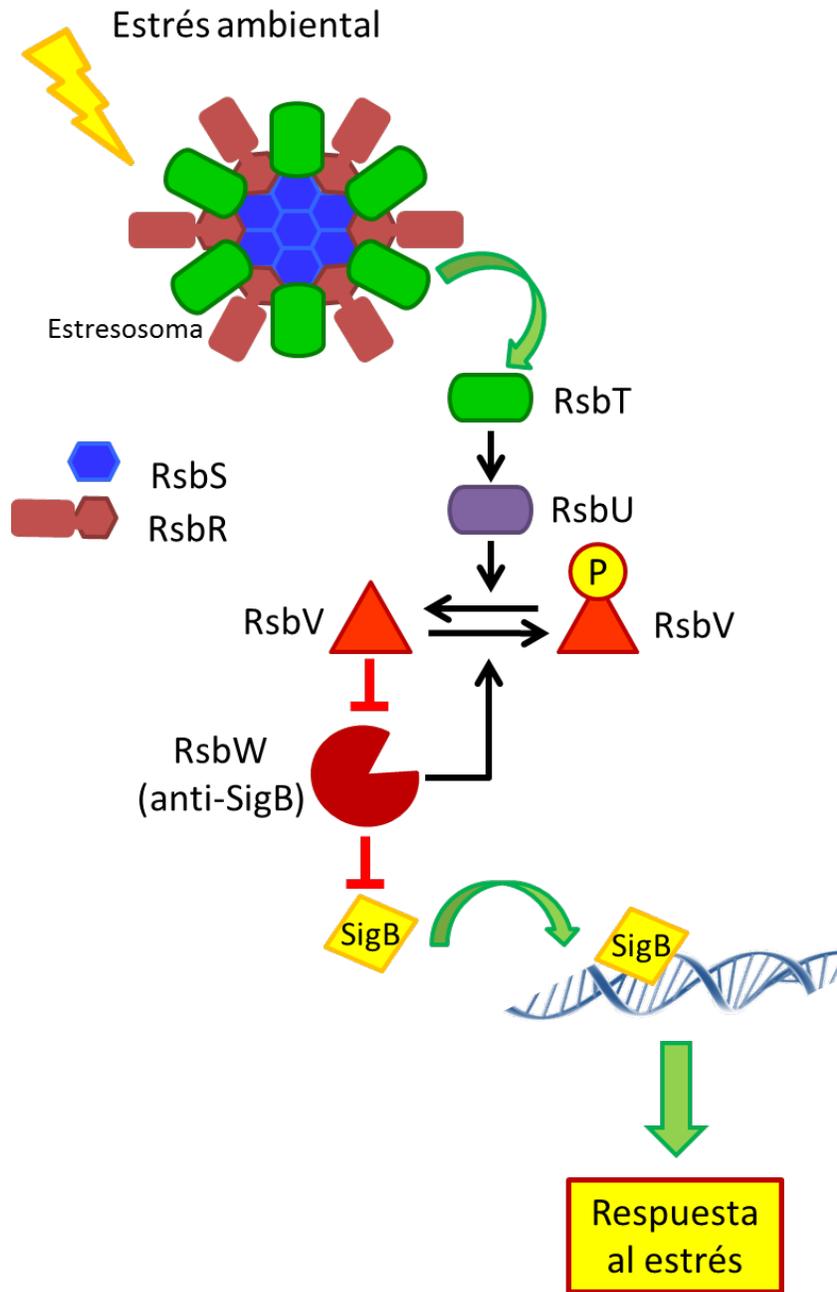


Figura 4. Diagrama de la activación de la respuesta al estrés en *L. monocytogenes* mediante el complejo proteico estresosoma. Una vez que el estímulo estresor es percibido, la proteína RsbT es liberada, lo que desencadena la cascada de señalización que culmina en la liberación de SigB de su represor. El factor de transcripción SigB induce la expresión de los genes de respuesta.

A pesar de que el mecanismo de liberación y activación de SigB se ha estudiado ampliamente, la o las proteínas responsables de la fosforilación y activación del estresosoma aún se desconocen. Sin embargo, el hecho de que dicha activación ocurra mediante la fosforilación de un residuo de treonina (Thr), sugiere la participación de sistemas que involucran serina/treonina cinasas. Estas son enzimas que transfieren el grupo fosfato de ATP a residuos específicos de serina, treonina y/o tirosina de diversas proteínas sustrato. Normalmente, la fosforilación activa funcionalmente al sustrato para realizar una actividad específica o transferir este grupo fosfato a proteínas efectoras, desencadenando así una cascada de señalización (Canova y Molle, 2014). Una característica distinguible de esta familia de cinasas, que las hace muy diferente a los sistemas de dos componentes, es que una sola cinasa puede fosforilar diferentes sustratos (Derouiche et al., 2013).

En *L. monocytogenes*, el análisis de su genoma reveló la presencia de un sistemas de fosforilación compuesto por la serina/treonina cinasa PrkA (*lmo1820*) y una fosfatasa (*lmo1821*) (Archambaud et al., 2005). El gen de la serina/treonina PrkA, se encuentra organizado en un operón (Figura 5) que incluye otros genes como *lmo1821* y otros genes involucrados en vías de información (ADN, ARN y modificación y metabolismo de las proteínas; *lmo1819*, *lmo1822*, *fmt* y *priA*) y el metabolismo intermedio (*lmo1818* y *lmo1825*) (Lima et al., 2011). La PrkA es una proteína transmembranal de 655 aminoácidos con un peso molecular teórico de 72 kDa. Consta de un dominio extracelular PASTA (Penicillin binding protein and Ser/Thr kinase Associate), un dominio transmembranal y el dominio catalítico en la región N-terminal (residuos 1-338) orientado al citosol. El dominio catalítico pertenece a la superfamilia de cinasas tipo Hanks, y presenta un alto porcentaje de identidad con serina/treonina cinasas presentes en otras bacterias como PrkC de *Bacillus subtilis* (68%), StkP de *Streptococcus pneumoniae* (53%), Stk1 de *S. aureus* (49%) y PknB de *M. tuberculosis* (46%) (Lima et al., 2011). Sin embargo, no se ha obtenido la estructura cristalina de esta proteína.

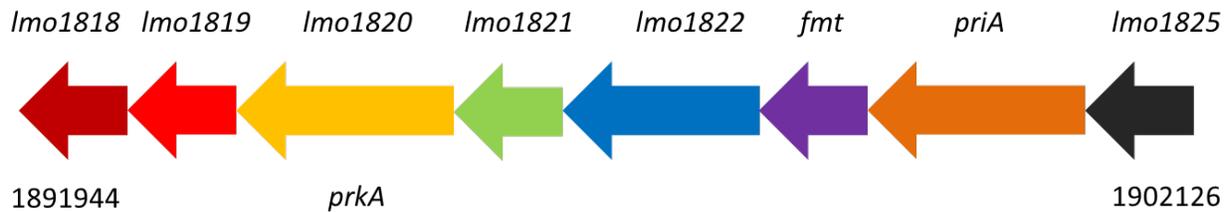


Figura 5. Organización de la región genómica que contiene el gen que codifica para la serina/treonina cinasa PrkA. La dirección de las flechas indica la orientación de la transcripción. *lmo1818*: similar a ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa; *lmo1819*: similar a GTPasa; *lmo1820*: PrkA; *lmo1821*: similar a fosfatasa; *lmo1822*: similar a proteína de unión de ARN; *fmt*: similar a formiltransferasa; *priA*: factor de replicación; *lmo1825*: similar a flavoproteína (Lima et al., 2011).

En un estudio previo llevado a cabo por Lima et al. (2011), se identificaron mediante espectrometría de masas, 62 proteínas distintas que fueron fosforiladas de manera exógena por la PrkA, las cuales están involucradas en procesos como el metabolismo de carbohidratos, transporte de proteínas y lipoproteínas, secreción de proteínas y otras funciones metabólicas, lo que sugiere su participación en estos procesos (Lima et al., 2011). En otras bacterias se ha reportado que las serina/treonina cinasas homologas participan en procesos celulares como el metabolismo central, la respuesta al estrés, síntesis de peptidoglicano, división celular, síntesis de pared celular y virulencia, entre otros (Misra et al., 2011; Pereira et al., 2011). Mientras que PrkC de *B. subtilis*, PknB de *S. mutans* y Stk de *S. epidermis* se requieren para la formación de biopelículas de estas bacterias, aunque se desconocen los mecanismos exactos de participación (Hussain et al., 2006; Liu et al., 2011; Madec et al., 2002).

Por otra parte, Misra et al. (2011) realizaron un análisis del fosfoproteoma de *L. monocytogenes*, confirmando algunas de las proteínas sustrato propuestas por Lima et al. (2011). En ese mismo estudio, se encontró la proteína RsbR (la cual forma parte del estresosoma de *L. monocytogenes*) fosforilada en el residuo Thr175, que corresponde al sitio de activación de RsbR de *B. subtilis*, lo que sugiere su participación en la activación de la respuesta al estrés y por ende, la virulencia en este patógeno. Esta idea se sustenta con lo reportado por Pensinger et al. (2016), donde observaron que mutantes con delección en el gen de la PrkA ($\Delta prkA$), no solo fueron incapaces de replicarse intracelularmente en macrófagos, sino que perdieron la viabilidad entre las 5 y 8 horas después de la infección. Esto mismo se corroboró en un modelo de infección murino donde las cepas mutantes fueron incapaces de replicarse en el vaso e hígado, comprobando su participación en la virulencia de este *L. monocytogenes* (Pensinger et al., 2016). Al estar la virulencia y la formación de

biopelículas estrechamente relacionadas en *L. monocytogenes*, estas observaciones permiten hipotetizar la participación de la PrkA en el desarrollo de biopelículas. Es por esto que la PrkA puede considerarse una diana estratégica para el control de virulencia y biopelículas de *L. monocytogenes*.

2.5 Potencial de Quercetina para Inhibir PrkA y la Formación de Biopelículas y Producción de Virulencia de *L. monocytogenes*

Dentro de las propuestas para el control de biopelículas de *L. monocytogenes* se encuentra el uso de compuestos naturales derivados de plantas, como aceites esenciales, extractos de subproductos ricos en compuestos fenólicos o sus compuestos bioactivos. Por ejemplo, se ha demostrado que extractos de raquis de uva ricos en compuestos fenólicos y sus principales compuestos identificados (ácido cafeico, ferúlico, gálico, así como catequina y ruitna) inhiben la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno (Vazquez-Armenta et al., 2018). También, el aceite esencial de milenrama (*Achillea millefolium*) inhibió la adhesión de *L. monocytogenes* en diferentes superficies abióticas (Jadhav et al., 2013). De igual manera los aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Syzygium aromaticum*, así como sus principales constituyentes, los terpenos citral y nerol, fueron efectivos para reducir la formación de biopelículas de este patógeno (Leonard et al., 2010). Estos compuestos son ampliamente aceptados por los consumidores gracias a la percepción de ser seguros debido a su uso histórico en la medicina popular para la prevención y tratamiento de enfermedades e infecciones (Sandasi et al., 2010). Debido a esto, se ha propuesto su uso para el control de biopelículas en la industria alimentaria.

Otra estrategia dentro del uso de antimicrobianos naturales es explotar la actividad anti-virulencia de estos compuestos. La ventaja de esta estrategia es que se busca interferir específicamente en los procesos que regulan la virulencia de los patógenos sin generar presión evolutiva que pudiera provocar desarrollo de resistencia, que comúnmente se asocia a los compuestos con actividad biocida (Rasko y Sperandio, 2010). En este sentido, debido al papel esencial que juega la PrkA en la patogenicidad de *L. monocytogenes*, se hipotetiza que la inhibición de su actividad podría considerarse clave para atenuar su virulencia y prevenir la formación de biopelículas. Para este

propósito podemos aprovechar los importantes esfuerzos en la búsqueda de inhibidores de cinasas que se han hecho principalmente en serina/treonina cinasas de humanos, debido a su importancia en diferentes patologías (Taunton et al., 2014). Los inhibidores de cinasas se clasifican en cuatro tipos, de acuerdo a su mecanismo de inhibición. Los tipo I y II son inhibidores que compiten por el sitio de unión del ATP y actúan sobre la forma activa e inactiva de las cinasas, respectivamente. Los tipo III son inhibidores alostéricos que se unen específicamente en una cavidad adyacente al sitio de unión del ATP, mientras que los tipo IV son inhibidores alostéricos que se unen a cavidades lejos del sitio de unión del ATP (Wu et al., 2015). Los inhibidores que compiten por el sitio de unión de ATP se consideran de amplio espectro, ya que este sitio se encuentra altamente conservado en la súper-familia de cinasas, tanto en eucariotas como procariontes (Endicott et al., 2012).

Esta búsqueda, ha destacado a los flavonoides que son compuestos fenólicos presentes en plantas y alimentos de origen vegetal, como kaempferol, isoramnetina, isoquercetina, rutina y quercetina, siendo este último de los más efectivos ($IC_{50} = 2.7 - 27.5 \mu M$) (Lolli et al., 2012; Nehmé et al., 2013). La quercetina se encuentra presente en mayor abundancia en cebolla, manzana, té, brócoli, moras, uvas y vino tinto (Larson et al., 2012). La estructura química de la quercetina consta de dos anillos benzénicos A y B, y un anillo heterocíclico C con sustituciones de grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 7, 3' y 4' (Figura 6). Es un antimicrobiano reconocido con efecto bacteriostático y su mecanismo de acción involucra diferentes procesos celulares como la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y el ensamble de la pared celular, ya que actúa como inhibidor competitivo por el sitio de unión de ATP de la ADN girasa y la alanina-alanina ligasa, respectivamente (Plaper et al., 2003; Wu et al., 2008; Wu et al., 2013). Una característica que le permite actuar en enzimas intracelulares es su coeficiente de partición aceite-agua, el cual es un indicador de su lipofilia y se expresa como LogP, donde valores > 1.0 indican afinidad de los compuestos por sistemas lipídicos (Yang et al., 2014). La quercetina tiene un $LogP = 2.54$ lo que indica que puede interactuar con membranas lipídicas y ser transportado a través de estas mediante difusión pasiva (Yang et al., 2014). Lo que hace a este compuesto un candidato para evaluar su actividad inhibitoria contra la PrkA de *L. monocytogenes*.

Por otro lado, las serina/treonina cinasas se caracterizan por la presencia de 12 subdominios que se pliegan en dos lóbulos característicos (Lóbulo N y C) y en medio de estos dos se encuentra el sitio de unión al ATP. El lóbulo N está conformado por seis láminas β antiparalelas y está involucrado

en la orientación y unión del ATP, mientras que el lóbulo C está compuesto de seis hélices α y dos láminas β y se involucra en la unión de las proteínas sustrato e inicia la transferencia del grupo fosfato (Rakette et al., 2012). Los subdominios pueden variar en tamaño; mientras que el sitio de unión de ATP, que consta de 12 residuos de aminoácidos, es casi invariable entre las diferentes serina/treonina cinasas (Pereira et al., 2011). En la PknB de *S. aureus* (que presenta un 49% de identidad con la PrkA), el análisis estructural de la proteína cristalizada con un análogo del ATP el AMP-PNP, mostró que el grupo amida y el oxígeno de los residuos Ile90 y Glu88, respectivamente, forman puentes de hidrógeno con el anillo de la adenina, estabilizando al análogo dentro del sitio de unión. La presencia de grupos $-OH$ en los anillos A y C de la quercetina, permite hipotetizar la formación de puentes de hidrógeno entre estos grupos y los residuos del sitio de unión del ATP de la PrkA. Estas interacciones de quercetina se han reportado en el sitio de unión de ATP de la ADN girasa, donde además se observó que los anillos A y C mimetizan el anillo de adenina del ATP (Plaper et al., 2003). Por lo que la quercetina se puede considerar un inhibidor potencial de la PrkA de *L. monocytogenes* y modular su virulencia y formación de biopelículas.

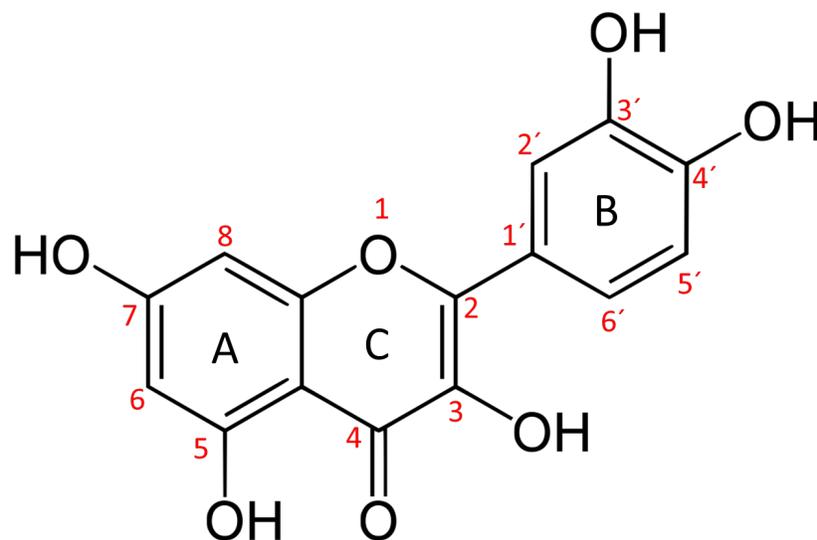


Figura 6. Estructura química de la quercetina.

3. HIPÓTESIS

La quercetina reduce la formación de biopelículas y expresión de los factores de virulencia *inlA*, *inlC* y *actA* de *L. monocytogenes* mediante la inhibición de la actividad de la enzima PrkA.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto inhibitorio de quercetina sobre la PrkA y la reducción de la formación de biopelículas y los factores de virulencia *inlA*, *inlC* y *actA* de *L. monocytogenes*.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la actividad antibacteriana y anti-biopelícula de quercetina contra *L. monocytogenes*.
- Analizar el efecto de la quercetina sobre la densidad celular, morfología y producción de sustancias poliméricas extracelulares durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*.
- Determinar el nivel de expresión de genes modulados por la actividad de la PrkA relacionados con la formación de biopelículas y factores de virulencia (*sigB*, *prfA*, *inlA*, *inlC* y *actA*) de *L. monocytogenes* expuesta a quercetina.
- Evaluar el efecto inhibitorio de quercetina sobre la enzima PrkA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Etapa 1: Caracterización de la Actividad Antibacteriana y Anti-biopelícula de Quercetina contra *L. monocytogenes*

5.1.1 Cepas Bacterianas y Condiciones de Cultivo

En este estudio se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644. La cepa se almacenó a -70 °C en solución salina (NaCl 0.9%) con glicerol al 20% como crioprotectante hasta el momento de su uso. Mientras que el cultivo de trabajo se preparó a partir de una colonia crecida en agar Oxford (Difco) que se inoculó en 10 mL de caldo Mueller-Hinton a 37 °C durante 18 h.

5.1.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida (CMB) de la Quercetina contra *L. monocytogenes*

La actividad antibacteriana de la quercetina contra *L. monocytogenes* se evaluó mediante el método de microdilución en caldo. A partir de un cultivo en fase exponencial (18 h) se preparó una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/mL. Por otra parte, se prepararon diferentes concentraciones de quercetina en caldo Mueller-Hinton (0, 0.8, 1.6, 2.5, 3.3, 4.9, 6.6, 8.3, 9.9, 11.6 y 13.2 mM) diluyendo previamente el compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO), sin exceder el 5% v/v de DMSO en el caldo de cultivo. El ensayo consistió en colocar 1 μ L de la suspensión bacteriana (para obtener un inóculo inicial de $\sim 3.3 \times 10^3$ UFC/mL) y 299 μ L de cada concentración de quercetina en un pozo estéril de una microplaca (96-well microplate, Costar) e incubar a 37 °C durante 24 h. La concentración más baja de quercetina en la cual no se observó visualmente el crecimiento de *L. monocytogenes* se consideró como la CMI (Alvarez et al., 2013). Mientras que la CMB se determinó sembrando alícuotas de al menos tres concentraciones más altas que la CMI en agar para

cuenta estándar (Plate Count Agar) e incubándolas 37 °C durante 24 h. La concentración más baja de quercetina en la cual la bacteria no fue capaz de crecer en el agar se consideró como la CMB. Este experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas y ambos valores se expresaron en mM.

5.1.3 Efecto de la Quercetina sobre Biopelículas Maduras de *L. monocytogenes*

Con la finalidad de evaluar la susceptibilidad a la quercetina de *L. monocytogenes* en su estado sésil, se formaron biopelículas en acero inoxidable durante 24 h a 37 °C (BioSurface Technologies) utilizando un biorreactor (CDC biofilm reactor modelo CBR 90-1; BioSurface Technologies Corp., Bozeman, Montana, E.U.A). Los discos de acero inoxidable (diámetro: 1.27 cm) se montaron en varillas de polietileno (tres discos por varilla) y se colocaron dentro del biorreactor con 350 mL de caldo Mueller-Hinton. Una vez montado el biorreactor se esterilizó mediante autoclave. Para iniciar la formación de biopelículas se agregó 1 mL de suspensión bacteriana (1×10^5 UFC/mL) a los 350 mL de caldo Mueller-Hinton para obtener un inóculo inicial de $\sim 3.3 \times 10^3$ UFC/mL. Por último el biorreactor se operó en modo discontinuo a 37 ± 1 °C y 150 rpm durante 24 h (Ponnusamy et al., 2013). Una vez formadas las biopelículas, los discos de acero inoxidable con las biopelículas se lavaron con agua destilada estéril y se trataron con diferentes concentraciones de quercetina (0, 3.3, 6.6, 13.2, 19.8 y 26.5 mM) durante 1 h a temperatura ambiente. Después de los tratamientos, se determinó el número de células sobrevivientes mediante conteo en placa. Los resultados se expresaron como el número de bacterias adheridas por unidad de área (Log UFC/cm²). El experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas.

5.1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelículas de Quercetina contra *L. monocytogenes*

El efecto inhibitorio de la quercetina sobre la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* se estudió en superficies de acero inoxidable 304. La formación de biopelículas se realizó como se describió anteriormente en la sección 5.1.3; sin embargo, al biorreactor estéril a 25 °C se le agregó quercetina previamente disuelta en DMSO para obtener concentraciones finales de 0, 0.2, 0.4 y 0.8 mM en experimentos independientes. Posteriormente se operó en modo discontinuo a 37 ± 1 °C y 150 rpm durante 24 h. Para determinar el efecto de la quercetina sobre la adhesión inicial y la formación de biopelículas, se retiraron del biorreactor tres discos de acero inoxidable a las 2 y 24 h de incubación, respectivamente. Inmediatamente, los discos fueron lavados con agua destilada estéril para remover las células débilmente adheridas y enseguida se colocaron en 3 mL de solución salina y se sometieron a un baño de ultrasonido (Branson 2510, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, E.U.A) a 40 kHz durante 5 min con la finalidad de desprender las células adheridas. Enseguida se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar Mueller-Hinton para determinar el número de células adheridas por área de los discos (Log UFC/cm²). La concentración más baja de quercetina en la que no se observó formación de biopelícula (número de células debajo del límite de detección de 1.24 Log UFC/cm²) a las 24 h se consideró como la CMIB (Gupta, 2015). El experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas.

5.1.5 Efecto de la Quercetina Sobre la Permeabilidad de la Membrana y las Propiedades Físico-químicas de Células Planctónicas de *L. monocytogenes*.

5.1.5.1 Integridad de la membrana de *L. monocytogenes* expuesta a quercetina. La alteración en la permeabilidad de la membrana ocasionada por la quercetina se evaluó mediante el método de absorción del cristal violeta (Halder et al., 2015). Para esto, la bacteria se cultivó en caldo BHI durante 18 h a 37 °C y las células se colectaron mediante centrifugación a 4500 x g durante 5 min, se lavaron dos veces y se suspendieron en solución salina (NaCl 0.9%) a una densidad óptica (D.O.) de 0.4 a $\lambda = 600$ nm. La quercetina se disolvió previamente en DMSO y se agregó a la suspensión bacteriana para alcanzar concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mM, y se incubó durante 0, 30, 60 y 120 min a 37 °C. Enseguida, las células se colectaron nuevamente (9300 x g durante 5 min),

se lavaron para remover la quercetina, se suspendieron en una solución de cristal violeta (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron nuevamente a 37 °C durante 30 min con la finalidad de permitir la absorción del cristal violeta por las células. Por último, la suspensión se centrifugó a 9300 x g durante 15 min y se leyó la D.O. de los sobrenadantes a $\lambda = 590$ nm. Para calcular el porcentaje de absorción del cristal violeta, la D.O. de la solución de trabajo se consideró como el 100% y se utilizó la siguiente fórmula: % de absorción = (D.O. del sobrenadante/D.O. de la solución de cristal violeta) x 100. El experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas.

5.1.5.2 Medición del potencial zeta. La carga superficial de *L. monocytogenes* expuesta a quercetina se determinó mediante la medición del potencial zeta (Nano-ZS 90, Malvern instrument, Malvern, R.U.). En este experimento, se cultivó *L. monocytogenes* en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, por sus siglas en inglés) suplementado con quercetina (0.2 y 0.8 mM) durante 18 h a 37 °C. Las células cultivadas en caldo BHI sin la adición de quercetina fueron el control. Después de la incubación, las células se colectaron mediante centrifugación a 4500 x g durante 5 min y se lavaron dos veces con solución salina estéril (NaCl al 0.9 %) antes de suspenderlas en agua destilada, ajustar su D.O. a 0.4 y llevar a cabo la medición del potencial zeta ($\lambda = 600$ nm) (Hernandez-Leon et al., 2017). El experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas.

5.1.5.3 Determinación de la energía libre superficial. El efecto de la quercetina sobre la energía libre superficial de *L. monocytogenes* se determinó de acuerdo a lo descrito por Zhang et al. (2015). Para esto, se prepararon suspensiones bacterianas como se describió previamente a partir de cultivos de *L. monocytogenes* que crecieron en presencia de quercetina (0.2 y 0.8 mM) o en ausencia (control) y se ajustaron a una densidad celular de aproximadamente 1×10^{10} UFC/mL. Adicionalmente, se prepararon mezclas binarias de etanol:agua con diferentes proporciones (100:0 a 0:100, v:v) para obtener valores de tensión superficial de 23 a 76 mJ/m^2 , los cuales se determinaron con un tensiómetro (CSC - Du Nouy, No. 70535) (Vazquez-Armenta et al., 2018). Posteriormente, se tomaron 100 μL de la suspensión bacteriana y se agregaron a los 500 μL de cada solución etanol:agua y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Luego, las

muestras se centrifugaron a 200 x g durante 6 min y se leyó la D.O. del sobrenadante a $\lambda = 600$ nm en un lector de microplacas (Omega Fluostar, BMG Labtech). La D.O. de los sobrenadantes se graficó contra sus respectivos valores de tensión superficial y los datos de la curva se sometieron a un ajuste polinomial de tercer orden con la finalidad de determinar el valor máximo de dispersión. El experimento consistió en tres replicas biológicas con tres repeticiones técnicas y los resultados se expresaron como mJ/m^2 .

5.1.5.4 Efecto de la quercetina sobre el potencial de adhesión (ΔG_{adh}) de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable. Los valores de energía superficial se utilizaron para calcular el potencial (ΔG_{adh}) de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable. Este es un parámetro que indica si el proceso de adhesión entre las bacterias tratadas y la superficie abiótica es energéticamente favorable o no, desde el punto de vista termodinámico (Absolom et al., 1983). El potencial de adhesión se puede calcular a partir de la ecuación de estado de Neumann:

$$\Delta G_{adh} = 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{bv}-\gamma^{lv})^2} + 2\sqrt{\gamma^{sv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{sv}-\gamma^{lv})^2} - 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{sv}} e^{-\beta (\gamma^{bv}-\gamma^{sv})^2} - 2\gamma^{lv}$$

Donde γ^{bv} , γ^{sv} and γ^{lv} son la energía superficial de la bacteria, del acero inoxidable y del medio líquido donde se lleva a cabo el proceso (NaCl 0.9%), respectivamente (el superíndice v representa la fase vapor en la cual se determinó la energía superficial), y β es una constante empírica con valor de $0.0001247 (\text{mJ}/\text{m}^2)^{-2}$ (Kwok y Neumann, 1999). La energía superficial de la solución salina (γ^{lv}) se determinó mediante un tensiómetro (CSC - Du Nouy, No. 70535) y fue de $65.3 \text{ mJ}/\text{m}^2$. Mientras que la energía superficial del acero inoxidable utilizado fue de $58.71 \text{ mJ}/\text{m}^2$ y se determinó mediante el método de la gota sésil utilizando un goniómetro CAM-Plus Micro, Tantec (Schaumburg, IL, E.U.A) en conjunto con la ecuación de estado de Neumann (Kwok y Neumann,

2000). El ΔG_{adh} se calculó tanto para las bacterias control (sin quercetina) como las células crecidas en presencia de quercetina a 0.2 y 0.8 mM. El experimento se realizó por triplicado.

5.1.5 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar para todos los experimentos. Para los ensayos de inhibición de la formación de biopelículas los factores fueron la concentración de quercetina y el tiempo de incubación (2 y 24 h). Mientras que para el ensayo de erradicación el factor fue la concentración de quercetina evaluada. En ambos ensayos la variable de respuesta fue el número de células viables por unidad de área (Log UFC/cm²). En cuanto a los ensayos de las propiedades fisicoquímicas de la bacteria expuesta a quercetina el factor fue la concentración del compuesto y las variables de respuesta fueron el potencial zeta (mV), la energía superficial (mJ/m²) y el potencial de adhesión (mJ/m²). Mientras que en el ensayo de permeabilidad, los factores fueron la concentración de quercetina y el tiempo de exposición, siendo la variable de respuesta el porcentaje de absorción de cristal violeta (%). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en donde se encontraron diferencias se llevó a cabo una comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer a un 95% de confianza en el paquete estadístico NCCS 2007.

5.2 Etapa 2: Efecto de la Quercetina Sobre la Organización Espacio-temporal de Biopelículas de *L. monocytogenes* y la Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares.

5.2.1 Cinética de Formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en Presencia de Quercetina

En esta etapa se siguió la formación de biopelículas en presencia de quercetina. Se seleccionó la concentración de 0.2 mM por que fue una dosis menor a las requeridas para causar pérdida de viabilidad bacteriana, esto fue de utilidad para observar los cambios en las variables de respuesta que se pueden ver comprometidas por la pérdida de viabilidad. La formación de biopelículas se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 5.1.3, pero los muestreos se realizaron a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 h. Como control, se corrió otro experimento bajo las mismas condiciones pero sin adicionar quercetina en el medio de cultivo. La cuantificación de las células adheridas al acero inoxidable se llevó a cabo como se describió previamente en la sección 5.1.3. En cada intervalo de muestreo se retiraron tres discos de acero inoxidable y los resultados se expresaron como Log UFC/cm².

5.2.2 Extracción y Cuantificación de las Sustancias Poliméricas Extracelulares

Para la extracción de las SPE, se tomaron tres discos de acero inoxidable en cada intervalo de muestreo. Los discos se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en 5 mL de solución salina adicionando 30 µL de formaldehído (37 %) para prevenir la lisis celular. Después de 1 h a 4 °C, se agregó a la solución 2 mL de NaOH (1 M) y se sometió a un baño de ultrasonido a 40 kHz durante 10 min y se dejó en reposo durante 3 h a 4 °C. Enseguida, la muestra se sometió sucesivamente a dos separaciones por membrana. La primera consistió en una filtración a través de una membrana de 0.2 µm para retener las células intactas. Luego, el filtrado que contenía las SPE se sometió a diálisis (membrana de 3500 Da) contra agua Milli-Q durante 24 h a 4 °C y haciendo tres recambios, con la finalidad de separar los metabolitos de bajo peso molecular de la muestra a analizarse. Finalmente, la muestra dializada se liofilizó a – 50 °C durante 48 h (Liu y Fang, 2002).

Para la cuantificación de los principales componentes de la matriz extracelular, las muestras liofilizadas se solubilizaron en 0.5 mL de agua Milli-Q. El contenido de polisacáridos se determinó por el método colorimétrico del fenol – ácido sulfúrico y los resultados se expresaron como µg equivalentes de glucosa a partir de una curva estándar (Masuko et al., 2005). Las proteínas totales se cuantificaron por medio de la reacción con ácido bicinonínico (BCA; Thermo Scientific™)

utilizando una curva estándar de albumina. Mientras que la concentración de ADN extracelular (ADNe) se determinó mediante espectrofotometría leyendo la D.O. a $\lambda = 260$ nm (Thermo Scientific™, Nanodrop 2000). La interferencia en la D.O. que causa la presencia de proteínas en la muestra se sustrajo de acuerdo a las ecuaciones de Porterfield y Zlotnick (2010). El experimento consistió en tres replicas biológicas y la extracción y cuantificación se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como μg de cada componente por unidad de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

5.2.4 Microscopía Láser Confocal de Barrido

Con la finalidad de inspeccionar las características estructurales de las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas en presencia de quercetina (0 y 0.2 mM), se realizó un análisis mediante microscopía láser confocal de barrido. Para este análisis, las biopelículas se formaron en porta objetos de vidrio bajo las mismas condiciones de temperatura, inóculo y agitación que se describió en la sección 5.1.3. En cada intervalo de muestreo (2, 6, 12 y 24 h) los porta objetos con las biopelículas se retiraron asépticamente y se lavaron con agua destilada estéril previo a su tinción. La tinción se realizó con el colorante fluorescente Syto 9 (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La adquisición de las imágenes se llevó a cabo en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 equipado con un láser de argón de 488 nm y un objetivo de 40X (área escaneada = $319 \times 319 \mu\text{m}$). La fluorescencia emitida se capturó en el rango de 500 – 600 nm y se tomaron dos pilas de imágenes en el plano horizontal (eje Z) en puntos aleatorios de la biopelícula con un espaciado de $0.45 \mu\text{m}$ entre cada imagen. La reconstrucción 3D de las imágenes obtenidas se realizó utilizando el software Zen (Zeiss), mientras que los parámetros estructurales como el biovolumen ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), el área cubierta (%) y el grosor promedio (μm) de las biopelículas en los diferentes tratamientos se determinaron con el software de procesamiento de imágenes Fiji (<https://fiji.sc/>). El experimento completo se realizó por triplicado.

5.2.5 Cinética de Crecimiento de *L. monocytogenes* en Estado Planctónico Presencia de Quercetina

Con la finalidad de asegurar que el efecto de la quercetina sobre la adhesión y producción de SPE durante la formación de biopelículas no se deba a una pérdida en la viabilidad celular, se realizó una cinética de crecimiento en estado planctónico en presencia de quercetina a 0.2 mM. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que se describieron en la sección 5.1.2. El control negativo consistió en 300 μ L de caldo Mueller-Hinton suplementado con quercetina (0.2 mM concentración final) sin la adición de inóculo. Mientras que caldo Mueller-Hinton con inóculo bacteriano pero sin quercetina se utilizó como control positivo. La microplaca se incubó a 37 °C durante 24 con agitación intermitente (previo a cada lectura) y se tomaron lecturas de D.O. a 600 nm cada 30 min. Los datos obtenidos se ajustaron a la función de Baranyi con ayuda de un complemento para Microsoft Excel (D-model, J. Baranyi, Institute of Food Research, Norwich, UK) con la finalidad de calcular los parámetros cinéticos del crecimiento bacteriano como la fase lag (h), tasa de crecimiento (DO/h) y crecimiento máximo (OD) de cada curva obtenida. El experimento completo se realizó por triplicado.

5.2.6 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar para todos los experimentos. En esta etapa los factores fueron la concentración de quercetina (0 y 0.2 mM) y el tiempo de incubación (2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 y 24 h). Las variables de respuesta fueron la densidad celular (Log UFC/cm²), el contenido de proteínas, polisacáridos y ADN extracelular (μ g/cm²), el biovolumen (μ m³/cm²), el área cubierta (%) y el grosor promedio (μ m) de las biopelículas. Para las cinéticas de crecimiento en estado planctónico el factor fue la concentración de quercetina (0 y 0.2 mM) y las variables de respuesta fueron los

parámetros de crecimiento bacteriano. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en donde se encontraron diferencias se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer a un 95% de confianza en el paquete estadístico NCSS 2007.

5.3 Etapa 3: Expresión de *prkA*, *sigB*, *prfA*, *inlA*, *inlC* y *actA* en *L. monocytogenes* Expuesta a la Presencia de Quercetina

En esta etapa, la obtención de ARN para los ensayos de RT-PCR en tiempo real, se realizó a partir de cultivos de *L. monocytogenes* crecidos en caldo BHI suplementado con quercetina (0, 0.2 y 0.8 mM) a 37 °C durante 18 h. La extracción del ARN total de los cultivos crecidos en presencia de quercetina se realizó a partir del pellet bacteriano mediante cartuchos de extracción el kit comercial RNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Valencia, CA, E.U.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El posible ADN contaminante se degradó utilizando la enzima DNaseI (Ambion, California, E.U.A.). La concentración de ARN se cuantificó utilizando el Nano-Drop 2000 (Thermo-Scientific, Massachusetts, E.U.A.) a longitudes de onda de 260-280 nm para descartar contaminación por proteínas. Por otra parte, se realizó una electroforesis de agarosa (0.1%) para comprobar la integridad del ARN extraído. A partir del ARN obtenido, se llevó a cabo la síntesis del cDNA complementario utilizando la transcriptasa inversa SuperScript™ III RT siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific™, Massachusetts, E.U.A.) y las muestras obtenidas se conservaron a -80 °C hasta el momento de su análisis.

Los cebadores utilizados se listan en el Cuadro 2. La especificidad de ellos se confirmó mediante una curva de “melting” posterior a su amplificación. El cDNA sintetizado se utilizó como templado para el análisis cuantitativo de PCR utilizando siguiendo la reacción de amplificación mediante el reactivo SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, California, E.U.A.). Cada reacción incluyó 5 µL de cDNA (10 ng concentración final), 10 µL de Master Mix, 1 µL de cada primer (5 µM) y 3 µL de H₂O para obtener un volumen total de 20 µL por cada reacción. Los productos se amplificaron en un termociclador Step-One™ (Applied Biosystems, California, E.U.A.). Las condiciones de amplificación fueron de 40 ciclos que incluyeron secuencialmente 95 °C durante 5 min, 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min y 72 °C durante 5 min. Controles sin templado (NTC) se

incluyeron para cada gen de interés. El ratio (R) de la expresión relativa de los genes de interés en los cultivos crecidos en presencia de quercetina y en el control (sin quercetina) se calculó utilizando una modificación de la fórmula del $\Delta\Delta Ct$ (1) de Pfaffl (2001) y utilizando como referencia la expresión del gen constitutivo *16S*.

Cuadro 2. Lista de cebadores utilizados en este estudio.

Gen	Secuencia 5' - 3'	Referencia
<i>16S</i>	F: CACTGGGACTGAGACACGG R: GGACAACGCTTGCCACCTA	(Suo et al., 2014)
<i>sigB</i>	F: TCATCGGTGTCACGGAAGAA R: TGACGTTGGATTCTAGACAC	(Mataragas et al., 2015)
<i>prfA</i>	F: CAATGGGATCCACAAGAATATTGTAT R: AATAAAGCCAGACATTATAACGAAAGC	(Mataragas et al., 2015)
<i>actA</i>	F: AAGAAATTGATCGCCTAGCTGATT R: GTAAAAAACCCGCATTTCTTGAGT	(Deshayes et al., 2012)
<i>inlA</i>	F: GGTCTCACAAACAGATCTAGACCAAGT R: TCAAGTATTCCACTCCATCGATAGATT	(Knudsen et al., 2012)
<i>inlC</i>	F: ACTGGTCAGAAATGTGTGAATGA R: CCATCTGGGTCTTTGACAGT	(Hadjilouka et al., 2016)

$$(1) \quad R = \frac{(E_{gen\ de\ interés})^{\Delta Ct_{gen\ de\ interés}}}{(E_{referencia})^{\Delta Ct_{referencia}}}$$

(células no tratadas- células tratadas) / (células no tratadas- células tratadas)

Donde el $E_{gen\ de\ interés}$ y $E_{referencia}$ son las eficiencias de amplificación de cada par de cebadores de el gen de interés y el gen de referencia, respectivamente. Estos valores se calcularon a partir de una curva estándar de 5 puntos utilizando el valor Ct de cada concentración de cDNA evaluada. A partir de la pendiente de esta curva se calculó el valor E de acuerdo a formula $E = 2^{-1/pendiente}$. Los ratios de expresión relativa se representaron en logaritmo base 2 (Log2). Este experimento consistió en dos replicas biológicas con tres repeticiones técnicas.

5.3.1 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar para este experimento. El factor que se analizó fue la concentración de quercetina y la variable de respuesta fue el ratio de expresión relativa expresado como Log2. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en donde se encontraron diferencias se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer a un 95% de confianza en el paquete estadístico NCSS 2007.

5.4 Etapa 4: Efecto Inhibitorio de la Quercetina contra la PrkA

5.4.1 Construcción del Modelo de la Estructura de la PrkA

La estructura cristalina de la serina treonina cinasa PrkA de *L. monocytogenes* aún no se ha reportado, por lo que se construyó un modelo por homología del dominio catalítico (residuos 1 – 338) utilizando como templado la estructura de PknB (PDB: 4EQM), a partir de la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la PrkA (clave NCBI: NP_465345.1). Para seleccionar el templado se realizó una búsqueda de secuencias homólogas mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos PDB (Protein Data Bank). A partir de estos resultados, se seleccionó la serina/treonina cinasa PknB de *S. aureus* (PDB: 4EQM) la cual es la que presenta el mayor porcentaje de identidad con PrkA (47%). El modelo se construyó utilizando el servidor Phyre2 en modo intensivo con la función de modelado uno-a-uno (Kelley et al., 2015). El modelo obtenido se analizó con el software de visualización UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004), y se utilizó para estudiar las características estructurales de PrkA.

5.4.2 Sobreexpresión y Purificación del Dominio Cinasa de PrkA

A partir de la secuencia de nucleótidos que codifica para el dominio catalítico de la PrkA (clave NCBI: NP_465345.1) se construyó un gen sintético con una etiqueta de polihistidina (6-His) en cual se insertó en el vector de sobreexpresión pD444-NH. Tanto la síntesis del gen y la ligación con el vector la realizó la compañía ATUM™. Con este vector, se transformaron cepas de *E. coli* Rosetta 2 químicamente competentes mediante choque térmico. Las cepas transformadas se cultivaron en caldo LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C con agitación constante a 220 rpm en un agitador orbital MaxQ 4000 (Thermo-Scientific, Massachusetts, E.U.A.), hasta alcanzar una D.O. de 0.6 ($\lambda = 600$ nm). La sobreexpresión de la PrkA se indujo con la adición de IPTG 1 mM (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). A partir de ahí, se tomaron alícuotas a las 0, 6, 8 y 16 h posteriores a la inducción para determinar el tiempo óptimo de sobreexpresión, para esto, las células en las alícuotas se colectaron mediante centrifugación (5000 x g, 15 min, 4 °C) y el pellet bacteriano se resuspendió en buffer de lisis (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH = 7.4) y se lisó mediante sonicación en hielo (6 ciclos de 10 s a 10% de potencia). El lisado se centrifugó (2,5000 x g, 15 min, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante y el pellet para analizar la presencia de la PrkA en la fracción soluble e insoluble respectivamente mediante SDS-PAGE. Una vez corroborada la presencia de la PrkA en la fracción soluble, se procedió a sobreexpresarla para su purificación considerando el tiempo de 6 h como el óptimo. A este tiempo, las células (1 g de pellet) se colectaron y lisaron como se describió anteriormente. El lisado se centrifugó (2,5000 x g, 15 min, 4 °C) y se recuperó el sobrenadante el cual se cargó a una columna HisTrap HP de 1 mL cargada con Ni²⁺ para su purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC) en un cromatógrafo ÄKTA prime Plus. La elución de la PrkA se realizó mediante un gradiente lineal de imidazol de 10 – 500 mM a un flujo constante de 1 mL/min (Buffer A: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH = 7.4; Buffer B: 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH = 7.4). El proceso de elución se monitoreo midiendo la absorbancia a $\lambda = 280$ nm y se colectaron fracciones de 3 mL. La purificación de la proteína se siguió mediante SDS-PAGE (Laemmli 1970) y su concentración se determinó por el método de Bradford después de dializar las fracciones contra Tris-HCl 50 mM y NaCl 300 mM (pH = 7.4) (Lima et al., 2011).

5.4.3 Ensayo de Actividad Enzimática

Para corroborar que la proteína purificada se encontrará activa, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática utilizando el kit comercial Kinase-Glo® de Promega. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de 50 μ L. El buffer de reacción estuvo compuesto de Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 1 mM y MnCl₂ 1 mM. La PrkA se agregó a la reacción a una concentración final de 5 μ M junto con la proteína susceptible a fosforilación MPB (Myelin Basic Protein) a 40 μ M. La reacción se inició con la adición de ATP 100 μ M y se dejó incubar en reposo durante 2 h a 37 °C. Por último la reacción se detuvo con la adición de 50 μ L del reactivo Kinase-Glo el cual contiene la enzima luciferasa que consume el ATP remanente de la reacción de la PrkA produciendo luminiscencia. La lectura de la luminiscencia se realizó transcurridos 10 min para permitir la estabilización de la señal y se llevó a cabo en el lector de microplacas Fluostar Omega en el modo de detección. Como controles se incluyeron reacciones sin la PrkA y reacciones sin ATP. Los resultados se expresaron como Unidades Relativas de Luminiscencia (URL). El experimento se realizó por triplicado.

Una vez confirmada la actividad de la proteína sobreexpresada se prosiguió a evaluar el efecto inhibitorio de la quercetina sobre ésta. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior. Posterior a la adición de la PrkA, se agregó quercetina (5 μ L) previamente disuelta en DMSO a concentraciones finales de 0, 40, 80 y 160 μ M y se dejó incubar durante 10 min a 37 °C. Enseguida se agregó MBP (40 μ M) y se inició la reacción con la adición del ATP (100 μ M). De igual manera se incluyeron los controles sin la PrkA y sin ATP. Los resultados se expresaron como porcentaje de actividad residual tomando como el 100% de actividad la reacción sin adición de quercetina.

Por otra parte, para calcular la concentración de quercetina que inhibe el 50% de la actividad enzimática (IC₅₀) se realizó un análisis de dosis-respuesta. Se evaluaron concentraciones de quercetina de 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 μ M y los datos obtenidos se transformaron a escala logarítmica y se ajustaron a un modelo de regresión no lineal en el software GraphPad Prism 5.01 (Schaenzer et al., 2017). El experimento completo se repitió dos veces y cada concentración de quercetina se evaluó por triplicado.

5.4.4 Análisis de Acoplamiento Molecular

El modelo de la PrkA, obtenido según lo descrito en la sección 5.4.1, se utilizó para realizar un análisis de acoplamiento molecular (*docking*) entre la quercetina y el sitio de unión del ATP de la PrkA con el complemento AutoDock Vina del programa Chimera (Trott y Olson, 2010). Adicionalmente, se hizo el análisis de acoplamiento molecular entre el ATP y su sitio de unión en la PrkA. La estructura tridimensional de la quercetina y ATP se importaron desde la base de datos PubChem (ID: 5280343 y 5957, respectivamente). La energía de las estructuras (PrkA y ligandos) se minimizó y se agregaron átomos de hidrogeno y cargas parciales utilizando la función Dock Prep. El área para el análisis de acoplamiento molecular fue de 66 x 66 x 66 Å que contenía el sitio de unión del ATP. Para cada ligando se generaron 8 poses de las cuales se seleccionaron aquellas con la menor energía de unión. Por último, con la ayuda del software Discovery studio (BIOVIA, 2017), se calcularon las interacciones tanto hidrofóbicas como puentes de hidrógeno entre la PrkA y cada ligando.

5.4.5 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completo al azar en los experimentos de actividad enzimática e inhibición. El factor que se analizó fue la concentración de quercetina y la variable de respuesta fue las URL y la actividad residual (%). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en donde se encontraron diferencias se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer a un 95% de confianza en el paquete estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Etapa 1: Caracterización de la Actividad Antibacteriana y Anti-biopelícula de Quercetina contra *L. monocytogenes*

6.1.1 Efecto de la quercetina sobre *L. monocytogenes* en estado planctónico y biopelícula

La actividad antibacteriana de la quercetina se evaluó contra *L. monocytogenes* y se determinó que la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (MIC) en estado planctónico fue de 4.9 mM, mientras que la concentración mínima bactericida (MBC) fue > 26.5 mM. Esto indica que la quercetina ejerce un efecto bacterioestático en las concentraciones evaluadas; sin embargo, es importante mencionar que no fue posible disolver el compuesto a concentraciones más elevadas. Por otra parte, la habilidad de este compuesto para erradicar biopelículas maduras (24 h de formación) de *L. monocytogenes* (densidad celular de 6.05 Log UFC/cm²) también fue investigada (Figura 7). La exposición de las biopelículas maduras a diferentes concentraciones de quercetina durante 1 h redujo el número de células viables, en comparación con el control ($p \leq 0.05$); sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las concentraciones aplicadas. La reducción en los tratamientos fue de 0.56–0.94 Log UFC/cm².

En este contexto, se evaluó el efecto de la quercetina en la adhesión inicial (2 h) y subsecuente formación de biopelículas (24 h) (Figura 8) Se pudo observar un efecto dosis-dependiente en donde en las primeras 2 h, el número de células adheridas en ausencia de quercetina fue de 2.93 Log UFC/cm². Por otro lado, en presencia de este compuesto a 0.2 mM se observó una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de 1.48 Log UFC/cm² en relación al control. Al incrementar la concentración a 0.4 y 0.8 mM no se detectaron células viables en las superficies de acero inoxidable. A las 24 h de formación, las biopelículas de *L. monocytogenes* mostraron una densidad celular de 6.09 Log UFC/cm². Sin embargo, el desarrollo de estas biopelículas se vio afectado por la presencia de quercetina, ya que a 0.2 y 0.4 mM provocó una reducción ($p \leq 0.05$) en las bacterias asociadas a la superficie en alrededor de 1.96 y 3.21 Log UFC/cm², respectiva-

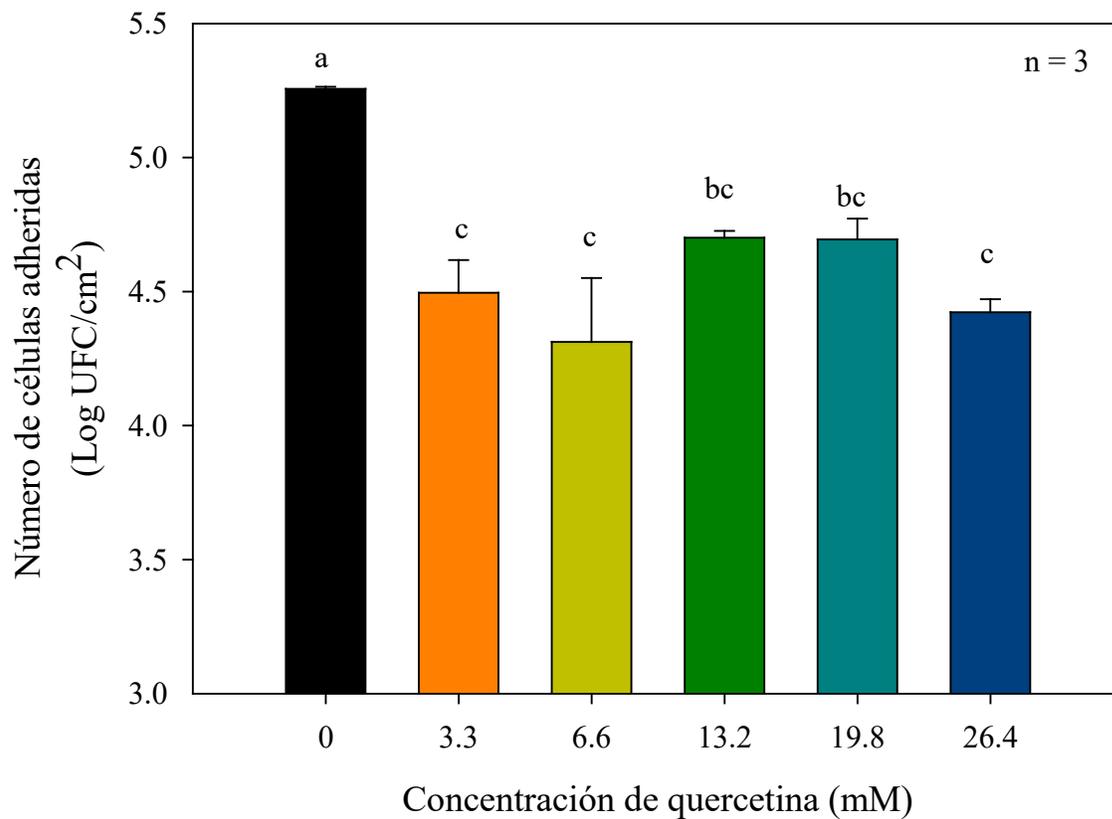


Figura 7. Número de células viables en las biopelículas de *L. monocytogenes* (24 h de formación a 37 °C) expuestas a diferentes concentraciones de quercetina durante 1 h. Los valores son medias de tres experimentos independientes \pm el error estándar. Literales diferentes representan diferencias significativas entre las concentraciones ($p \leq 0.05$).

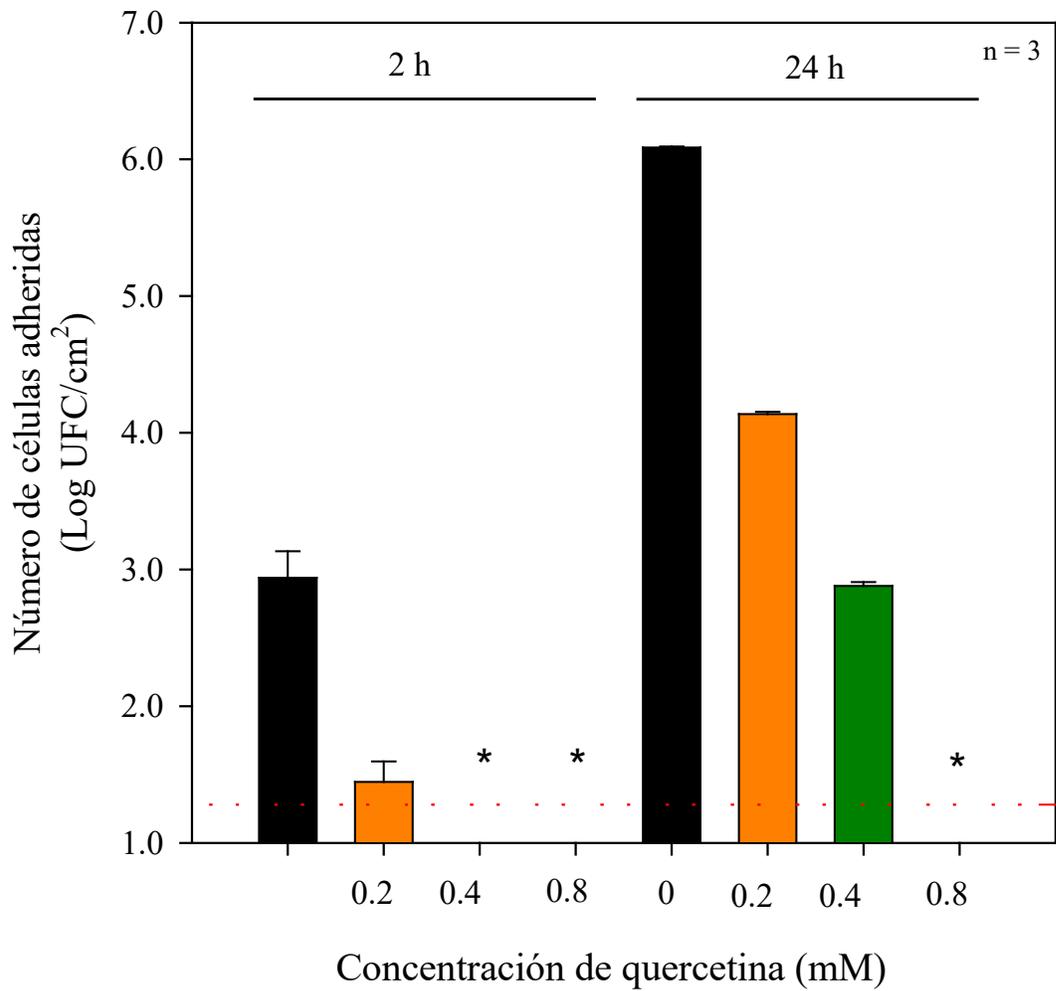


Figura 8. Efecto de la quercetina sobre la prevención de la adhesión (2 h) y formación de biopelículas (24 h) de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable a 37 °C. * valores debajo del límite de detección (1.28 Log UFC/cm²). Los valores son medias de tres experimentos independientes \pm el error estándar.

mente. Mientras que a la concentración más alta evaluada (0.8 mM) no se recuperaron células viables de los cupones de acero inoxidable, por tal motivo esta concentración se consideró como la concentración mínima de inhibición de biopelículas (CMIB). Estos resultados confirman el papel de la quercetina como un agente que previene la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*, más allá de afectar la viabilidad celular a nivel planctónico o de biopelículas pre-establecidas.

El mecanismo bacterio-estático de la quercetina sobre *L. monocytogenes* ha sido relacionado con la interferencia en procesos celulares como la síntesis de ácidos nucleicos (Wu et al., 2013) y de constituyentes de la pared celular (Wu et al., 2008). Sin embargo, esta interferencia no parece ser suficiente para causar un efecto bactericida. Adicionalmente, existe evidencia del papel protector de las biopelículas maduras sobre el efecto antibacteriano de diversos compuestos (Pan et al., 2006) sin embargo, en el presente estudio no fue posible observar esto debido a la baja solubilidad de la quercetina a > 26.4 mM en el medio de cultivo.

Similar a lo que observamos, Sivaranjani et al. (2016) reportaron que el flavonoide morina, a concentraciones de 0.08 y 0.33 mM, fue incapaz de erradicar biopelículas de *L. monocytogenes* después de 1 h de tratamiento, de acuerdo a la cuantificación de la biomasa total, actividad metabólica y análisis por microscopia confocal. Mientras que los ácidos gálico y ferúlico a 5.87 y 5.15 mM, respectivamente, fueron inefectivos para remover biopelículas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en 1 h de tratamiento. Aunque estos compuestos redujeron la actividad metabólica más de un 70% de todas las biopelículas (Borges et al., 2012). Igualmente, el estilbeno resveratrol a su CMI (0.8 mM) redujo entre un 70 y 80% la actividad metabólica de biopelículas de *L. monocytogenes*, pero fue incapaz de erradicarlas. Por otra parte, es importante resaltar que los tratamientos que están dirigidos a la inactivación de biopelículas con base en un efecto biocida son inefectivos para remover o desprender las células muertas y las SPE, lo que podría facilitar la recolonización de la superficie con otras bacterias patógenas (Shen et al., 2012). Para la remoción de las SPE se han propuesto tratamientos enzimáticos (Meireles et al., 2016), aunque esta opción pudiera incrementar considerablemente los costos de sanitización. Es por esto que prevenir la formación de estas comunidades podría considerarse una mejor alternativa que su erradicación, lo cual fue el resultado más positivo de la quercetina.

Al comparar las concentraciones de inhibición de la formación de biopelícula con las de erradicación observamos que la CMIB (0.8 mM) es hasta 33 veces menor que la concentración más alta evaluada en los ensayos de erradicación (26.5 mM). Esto nos indica que este compuesto actúa

con mayor efectividad en las primeras etapas de formación, que corresponde a la adhesión inicial. De igual manera, la CMIB es 6 veces menor a la concentración requerida para inhibir el crecimiento planctónico (CMI = 4.9 mM), indicando que este compuesto provoca cambios en las células planctónicas que repercuten en su capacidad de adhesión, más allá de afectar su capacidad de replicarse. Con estos resultados se prosiguió a explorar el mecanismo que ejerce la quercetina para inhibir la formación de las biopelículas de acuerdo a la hipótesis establecida.

6.1.2 Efecto de la Quercetina en la Permeabilidad de la Membrana de *L. monocytogenes* y en las Propiedades Físicoquímicas.

En la Figura 9 se observa el efecto de la concentración de quercetina y el tiempo de exposición sobre la absorción del cristal violeta, siendo este efecto dosis dependiente ($p \leq 0.05$). El cristal violeta es un colorante catiónico que es impermeable a las membranas celulares intactas, por lo que su absorción es un indicador de la disrupción de la permeabilidad de este organelo. La concentración de 0.1 mM causó un 30% de absorción en los 30 min de contacto con la bacteria, mientras que a los 120 min el valor incrementó al 71%. Las concentraciones de 0.2 a 0.8 mM provocaron entre el 71 y 79% de absorción en los primeros 30 min. Estos resultados muestran que la quercetina fue capaz de disminuir la permeabilidad de la membrana de *L. monocytogenes*.

Trabajos previos utilizando liposomas como modelo de estudio, han demostrado que la quercetina se puede internalizar en las membranas lipídicas e intercalarse a las regiones intermedias, lo que provoca rigidez y un aumento en la permeabilidad (Tsuchiya, 2010; Wu et al., 2013). Mientras que el presente estudio observó el efecto opuesto en la permeabilidad, estas diferencias podrían deberse a la composición de los liposomas utilizados y la composición lipídica de la membrana de *L. monocytogenes*. A su vez, los resultados obtenidos nos sugieren que la quercetina podría acumularse en regiones exteriores de la membrana, causando un aumento en su fluidez y provocando la pérdida de la permeabilidad, lo que también podría permitir la internalización del compuesto y actuar en otras dianas celulares.

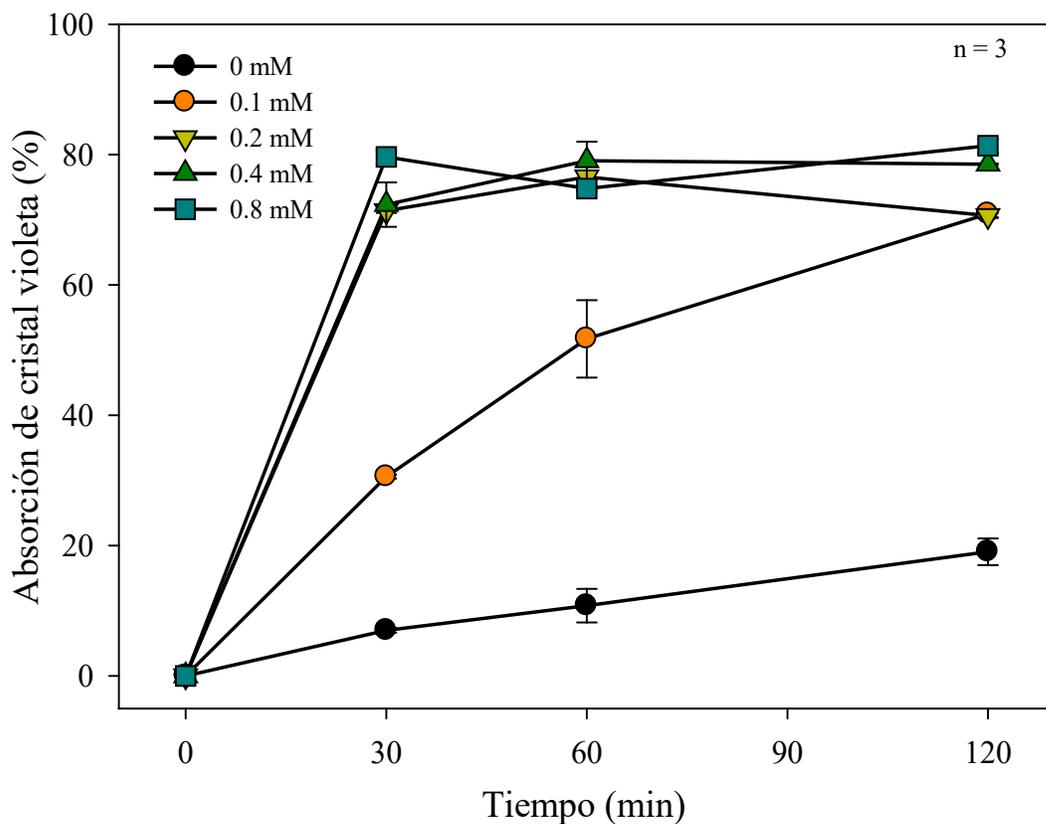


Figura 9. Porcentaje de absorción de cristal violeta por *L. monocytogenes* expuesta a diferentes concentraciones de quercetina como indicador de la permeabilidad de su membrana. Mayor porcentaje de absorción del colorante indica una mayor permeabilidad. Los valores son el promedio de tres determinaciones \pm el error estándar.

Por otra parte, ya que la adhesión de *L. monocytogenes* está influenciada principalmente por interacciones fisicoquímicas entre la bacteria y la superficie abiótica (Zhang et al., 2015), se evaluó el efecto de la quercetina sobre la carga superficial (potencial zeta), el potencial de adhesión y la energía libre superficial. El potencia zeta de las bacterias no tratadas fue de -38.07 ± 0.72 mV, y no se observaron cambios en este parámetro en las células cultivadas en presencia de quercetina a 0.2 mM; sin embargo, al aumentar la concentración a 0.8 este valor disminuyó a -36.53 ± 0.32 mV ($p \leq 0.05$). Por otra parte, la quercetina provocó una disminución en la energía libre superficial de *L. monocytogenes* mostrando valores de 35.14 ± 0.31 y 30.82 ± 0.2 mJ/m² a 0.2 and 0.8 mM,

respectivamente, siendo menores ($p \leq 0.05$) al de las células no tratadas ($42.47 \pm 0.95 \text{ mJ/m}^2$). La energía libre superficial refleja el carácter hidrofóbico/hidrofílico de la bacteria (Shen et al., 2017), por lo que los datos obtenidos indican que la presencia de quercetina aumenta la hidrofobicidad de *L. monocytogenes*. A su vez, esto provocó una alteración en el potencial de adhesión (ΔG_{adh}) entre las bacterias de cada tratamiento y el acero inoxidable. De acuerdo a los resultados, el proceso de adhesión entre *L. monocytogenes* y el acero inoxidable es energéticamente favorable ($-5.37 \pm 0.19 \text{ mJ/m}^2$), aunque en presencia de quercetina se vuelve aún más (-6.66 a -7.28 mJ/m^2). Estos resultados demuestran que la quercetina perturba las propiedades fisicoquímicas de *L. monocytogenes* de manera dosis dependiente, aun cuando no se relaciona positivamente con el efecto anti-adherente observado.

El valor negativo del potencial zeta refleja la carga neta negativa de la superficie bacteriana, que se le atribuye a los grupos fosfato de los ácido teicoicos de la pared celular y los fosfolípidos de la membrana (Bisbiroulas et al., 2011). La disminución en la carga negativa podría deberse a un incremento en la síntesis de fosfolípidos neutros como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, la cual se ha observado en células de *L. monocytogenes* adaptadas a condiciones ácidas (Bisbiroulas et al., 2011; Mastronicolis et al., 2010). Por otro lado, se sabe que el acero inoxidable presenta una carga negativa a valores de pH ácidos y cercanos al neutro (Hedberg et al., 2014; Hedberg et al., 2013), por lo que en teoría, la fuerzas de repulsión entre este material y las bacterias tratadas con quercetina debería disminuir (al disminuir la carga negativa) y el número de células adheridas aumentar. Este comportamiento se ha observado en *P. aeruginosa* y *S. aureus* cultivadas en presencia de concentraciones sub-inhedoras del antibiótico norfloxacin, que provocó una disminución en el potencial zeta e incrementó la capacidad de formar biopelículas de ambas bacterias en superficies de poliestireno (Kumar y Ting, 2013).

Sin embargo, en nuestro estudio también observamos que la quercetina provocó un aumento en la hidrofobicidad de *L. monocytogenes*. Las bacterias más hidrofóbicas tienden a colonizar con mayor facilidad superficies hidrofóbicas y viceversa, es decir, superficies con energía libre superficial cercana a la suya (Tuson y Weibel, 2013). Por lo que en las bacterias tratadas con quercetina la barrera energética se vuelve aún más grande al ser el acero inoxidable un material hidrofílico ($\gamma^{sv} = 58.71 \text{ mJ/m}^2$). Esto nos indica que en *L. monocytogenes* las interacciones hidrofóbicas contribuyen en mayor medida al proceso de adhesión que las fuerzas electroestáticas de atracción y repulsión. La hidrofobicidad está relacionada con la presencia de apéndices extracelulares (Dorobantu et al.,

2008), por lo que el aumento provocado por la quercetina podría deberse a una menor presencia de proteínas extracelulares que son de carácter hidrofílico debido a los grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH).

Por otra parte, el potencial de adhesión es un parámetro termodinámico que nos indica la factibilidad de que ocurra el proceso de adhesión. El valor negativo de ΔG_{adh} que se observó entre las bacterias tratadas con quercetina y el acero inoxidable, discrepa de la inhibición de la adhesión observada experimentalmente. Sin embargo, el proceso de adhesión es complejo e involucra un balance entre fuerzas de repulsión - atracción de las cargas superficiales y las interacciones hidrofóbicas (Li et al., 2012). Por lo que un desequilibrio en uno o más de estos parámetros pudiera afectar este proceso. Además, es importante recordar que la adhesión ocurre en dos etapas, la reversible y la irreversible, y para que esta última ocurra es necesario que la bacteria produzca adhesinas extracelulares para reforzar la unión inicial. Se ha reportado que en *P. aeruginosa* la síntesis de adhesinas se desencadena minutos después del contacto físico con la superficie, aunque el mecanismo exacto aún es desconocido (Li et al., 2012). Por lo que es posible que la quercetina pudiera afectar los mecanismos específicos de adhesión como la síntesis de adhesinas que ayudan a reforzar la unión bacteria-superficie volviéndola irreversible. Esta idea se sustenta con la posible internalización de la quercetina, los cambios en la hidrofobicidad que están relacionados con la presencia de apéndices extracelulares y la inhibición de la adhesión a acero inoxidable, aunque es necesario profundizar en este posible mecanismo de acción.

6.1.3 Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta etapa demuestran que la quercetina actúa en las primeras etapas de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* inhibiendo la adhesión inicial (2h) debido a la reducción en la carga superficial, la energía libre superficial y la alteración del potencial de adhesión. Esto podría deberse a la posible internalización de la quercetina donde podría actuar en otros sitios diana e inhibir la producción de adhesinas que refuerzan la unión a la superficie. Por lo que es necesario profundizar en este posible mecanismo, evaluando el efecto de la quercetina en la producción de sustancias poliméricas extracelulares de *L. monocytogenes*.

6.2 Etapa 2: Efecto de la Quercetina Sobre la Densidad Celular, Morfología y Producción de Sustancias Poliméricas Extracelulares de Biopelículas de *L. monocytogenes* Durante su Formación.

6.2.1 Cinéticas de Formación de Biopelículas de *L. monocytogenes* en Presencia de Concentraciones No Letales de Quercetina.

Con la finalidad de profundizar en el estudio del mecanismo de acción, se realizaron cinéticas de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en presencia de una concentración no letal de quercetina, esto para evitar la influencia de los cambios en la carga celular sobre la adhesión bacteriana. Se seleccionó la concentración de 0.2 mM ya que de acuerdo a los resultados previos permite el establecimiento y desarrollo de las biopelículas, el cual es necesario para visualizar el efecto que provoca este compuesto en las células adheridas en cuanto a la producción de SPE y su organización espacio-temporal. El efecto de la quercetina a 0.2 mM sobre el crecimiento planctónico de *L. monocytogenes* se evaluó mediante una cinética de crecimiento. Las células planctónicas en el medio de cultivo contribuyen a la formación de biopelículas durante el desarrollo normal de las mismas, debido a la continua deposición sobre las capas de células adherentes (Nguyen et al., 2014), por lo que su participación en la formación de biopelículas debe considerarse. Como se puede observar en el Cuadro 3., la quercetina a 0.2 mM no afectó los parámetros cinéticos del crecimiento como la fase lag ($p = 0.64$), la tasa de crecimiento ($p = 0.39$) y el crecimiento máximo ($p = 0.073$), lo que indica que el crecimiento planctónico no fue afectado a esta concentración.

Por otra parte, la Figura 10 se muestra el efecto de la quercetina sobre la densidad celular de biopelículas de *L. monocytogenes* durante su formación sobre acero inoxidable a 37 °C. Esta concentración del compuesto interfirió en la adhesión inicial, observándose una reducción de 1.32 Log UFC/cm² en las primeras 2 h, en comparación con el control. Mientras que la densidad celular en presencia de quercetina incrementó exponencialmente después de 4 h, alcanzando la densidad

máxima a las 12 h y permaneció sin diferencias ($p > 0.05$) hasta las 16 y 20 h (promedio 4.71 Log UFC/cm²). Este valor fue menor ($p \leq 0.05$) que el número de células adherentes

Cuadro 3. Efecto de la quercetina sobre los parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes* en estado planctónico. Los valores son el promedio de tres determinaciones \pm el error estándar.

Tratamiento	Fase Lag (h)	Tasa de crecimiento (O.D./h)	Y max (O.D.)
Control	2.77 \pm 0.52	0.099 \pm 0.013	0.74 \pm 0.01
Quercetina	2.47 \pm 0.04	0.079 \pm 0.006	0.83 \pm 0.03
	$p = 0.64$	$p = 0.39$	$p = 0.073$

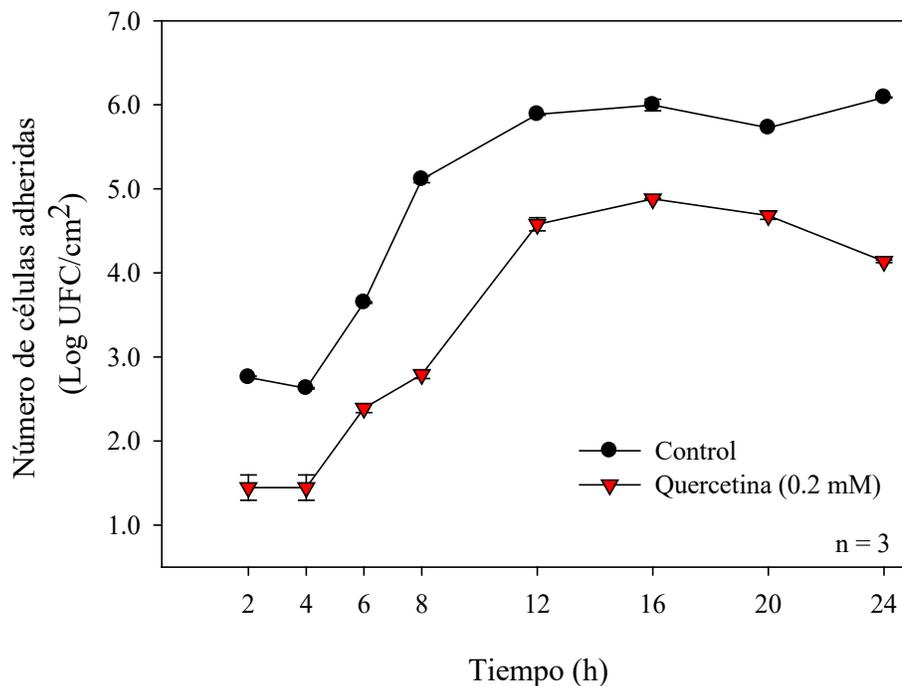


Figura 10. Cinética de formación de biopelículas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable a 37 °C en presencia de quercetina (0.2 mM). Los valores son el promedio de tres determinaciones \pm el error estándar.

en el tratamiento control en el mismo tiempo (promedio 5.87 Log UFC/cm²). Finalmente, a las 24 h las biopelículas formadas en presencia de quercetina presentaron una densidad celular menor al tratamiento control de 1.94 Log UFC/cm². Estos resultados nos indican que la quercetina interfiere en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* probablemente debido a la inhibición de la síntesis de las SPE que ayudan a la retención de las células hijas una vez completada la división celular.

Se encontró que la matriz extracelular de *L. monocytogenes* está compuesta principalmente por proteínas (\approx 66–97% del total de las SPE), y su contenido incrementa durante el proceso de formación (Figura 11). Como se muestra en la Figura 11 en las biopelículas control (sin quercetina) el contenido de proteínas extracelulares aumenta ($p \leq 0.05$) drásticamente de 63.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a las 12 h a 189.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a las 16 h; estos valores permanecieron constantes hasta las 24 h (190.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). En cuanto al contenido de exopolisacáridos y ADN extracelular estos variaron de 3.69 a 8.56 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de 0.08 a 0.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, durante el desarrollo de las biopelículas, respectivamente, pero no fueron diferentes estadísticamente ($p > 0.05$). Por otro lado, las biopelículas formadas en presencia de quercetina presentaron un 41 % menos ($p > 0.05$) de contenido de proteínas extracelulares a las 24 h de formación, en relación al control. La producción de exopolisacáridos y el ADN extracelular no se vio afectada ($p > 0.05$) por este compuesto variando su contenido de 3.93 a 6.94 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y de 0.05 a 0.38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Estos resultados demuestran que la quercetina interfiere en la producción de proteínas extracelulares de las bacterias adherentes lo que podría repercutir en su capacidad de mantenerse unidas y/o adheridas a la superficie.

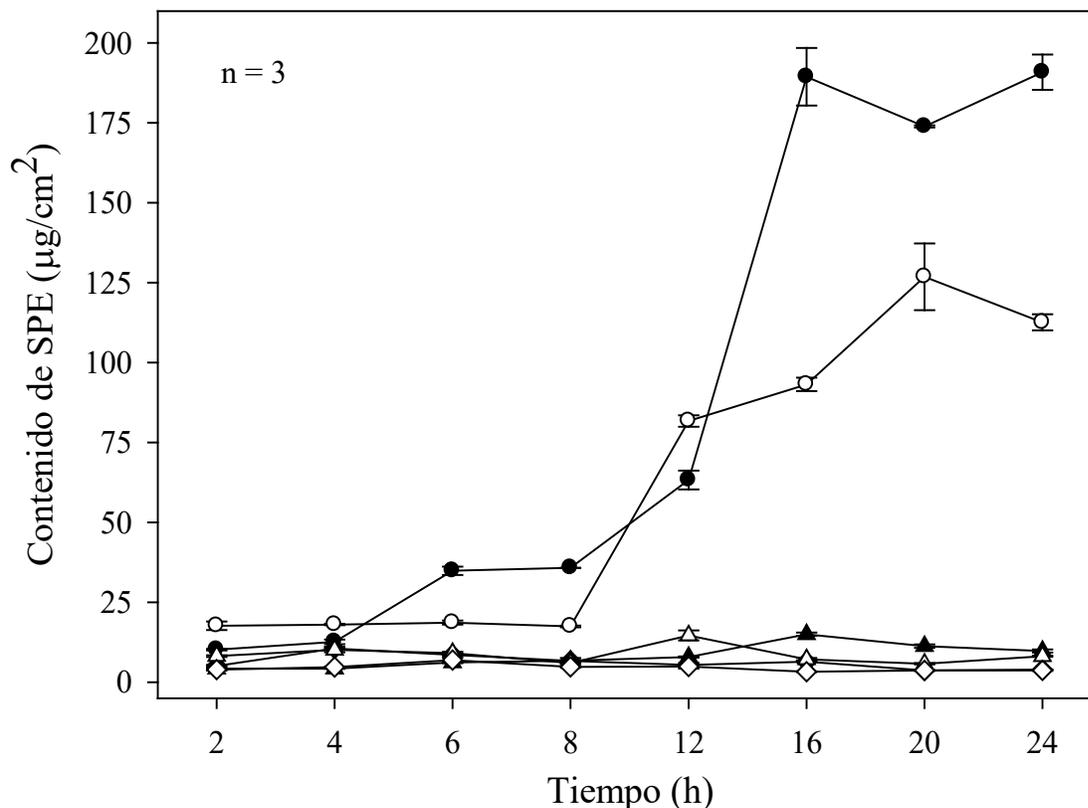


Figura 11. Contenido de sustancias poliméricas extracelulares durante la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable en presencia de quercetina (0.2 mM) a 37 °C. ● Proteínas totales, ▲ ADN y ◆ exopolisacáridos totales en el control; ○ proteínas totales, △ ADN y ◇ exopolisacáridos totales en el tratamiento con quercetina. Los valores son el promedio de tres determinaciones ± el error estándar.

Otro aspecto importante de la formación de biopelículas es la colonización de la superficie durante su desarrollo. En este sentido, en la Figura 12 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia. Se puede observar que la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* comienza con la adhesión de células planctónicas individuales sobre el sustrato (2 h), seguido de su replicación para formar microcolonias (6 h). En las muestras control (Figura 12), las microcolonias se observaron como agregados bacterianos con diversas formas y tamaños, algunos de ellos interconectados. De acuerdo a la reconstrucción 3D y de la vista ortogonal en el plano XZ, estas estructuras son planas y forman una mono capa. Las biopelículas de 12 h se caracterizaron por la presencia de un patrón más definido de distribución sobre la superficie; mientras que a las 24 h se observó el desarrollo de una arquitectura más compleja.

Además, las imágenes evidencian que en presencia de quercetina (0.2 mM), *L. monocytogenes* es incapaz de desarrollar biopelículas maduras con estructuras complejas como pasó en las muestras control. Este efecto es evidente desde la formación de microcolonias, donde se observó un menor número de estos agregados. En la Figura 13 se presenta un acercamiento de estos agregados donde las microcolonias formadas en presencia de quercetina fueron menos densas que el tratamiento control. En ambos casos se observó la formación de septos (flechas rojas) que indican que la replicación celular no fue afectada a esta concentración. De igual manera, el efecto de la quercetina se observó en la distribución de las biopelículas a las 12 y 24 h. El análisis cuantitativo de las imágenes (Figura 14) nos muestra que este compuesto afectó la dinámica de formación de las biopelículas de *L. monocytogenes*, ya que en presencia de quercetina redujo la colonización de la superficie (menor área cubierta) en las etapas evaluadas. A las 24 h, esta reducción significó un 12% menos que las muestras control. Otro parámetro que se modificó fue el biovolumen, que indica el volumen de la biomasa por unidad de área del sustrato ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) el cual se redujo ($p \leq 0.05$) un 57% respecto al control por efecto de la quercetina. Aunque el grosor promedio (μm) de las biopelículas no se vio afectado ($p \leq 0.05$) por el tratamiento. Los resultados confirman que este flavonoide actúa en las primeras etapas de formación de las biopelículas y altera su organización espacio-temporal.

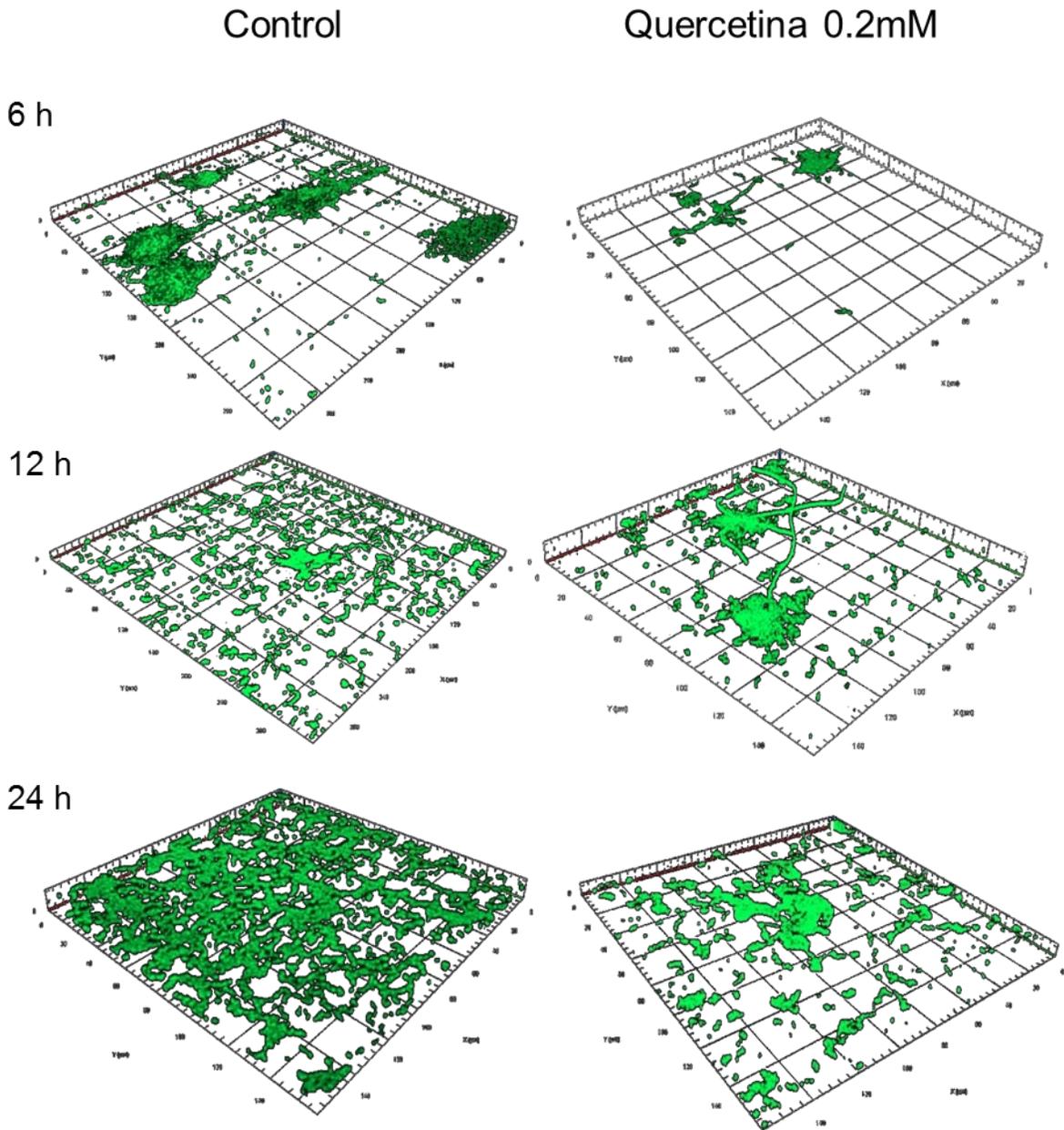


Figura 12. Formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en presencia de quercetina a 0.2 mM a 37 °C durante 24 h. Las imágenes son la representación en 3D de los cortes sobre el eje Z obtenidos mediante microscopía láser confocal.

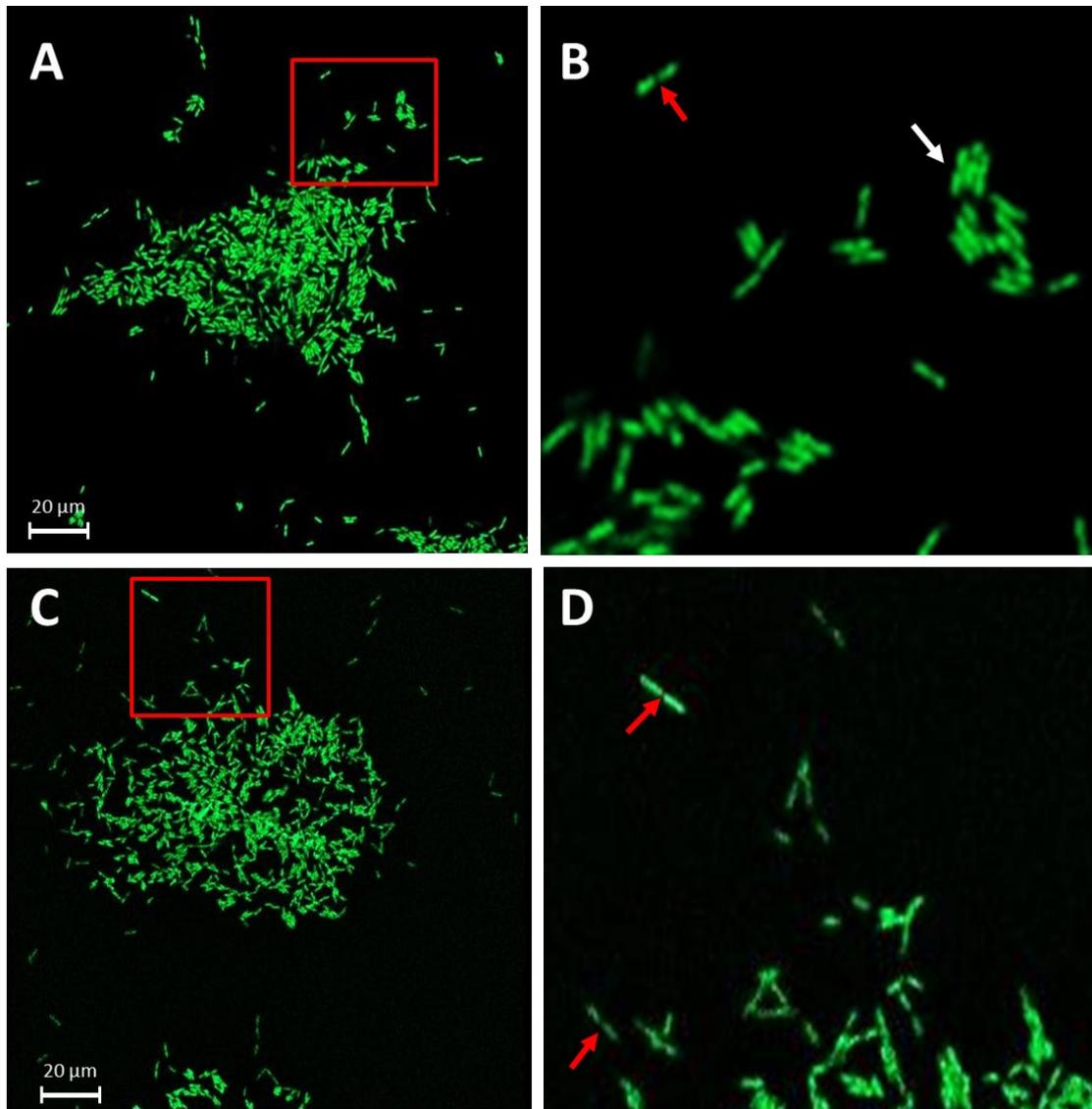


Figura 13. Microcolonias representativas de *L. monocytogenes* en el tratamiento control (A y B) y con quercetina 0.2 mM (C y D). Las flechas rojas señalan la presencia de septos de división. La flecha blanca señala la interacción célula-célula que favorece la formación de agregados.

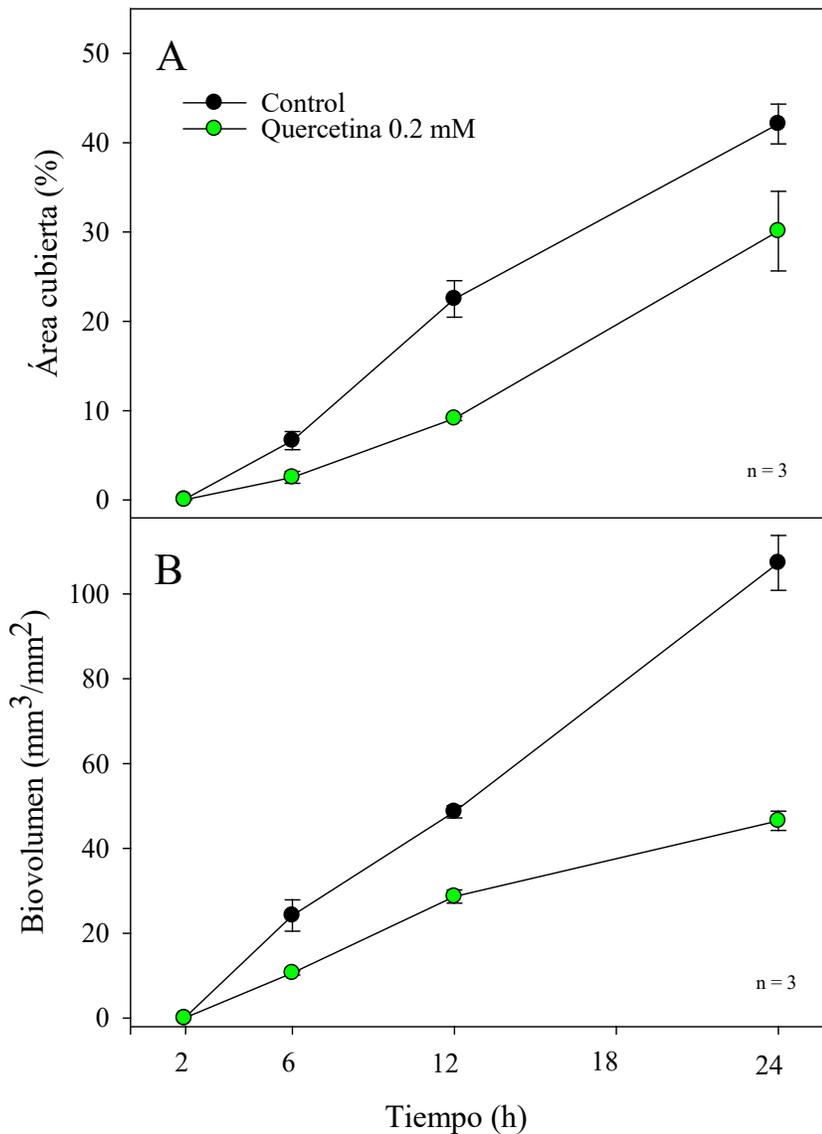


Figura 14. A) Área cubierta y B) biovolumen de las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas sobre acero inoxidable en presencia de quercetina. Los valores son el promedio de tres determinaciones \pm el error estándar.

Trabajos previos han caracterizado la organización espacio-temporal de las biopelículas de *L. monocytogenes* (Mosquera-Fernández et al., 2014; Mosquera-Fernández et al., 2016; Vikram et al., 2010), pero este enfoque no se ha aplicado para estudiar en efecto de compuestos antibiopelícula como la quercetina. En este estudio, se encontró una correlación fuerte y positiva entre el contenido total de las SPE y densidad celular de las biopelículas ($r = 0.7989$; $p = 0.0174$), así como entre el

área cubierta ($r = 0.9670$; $p = 0.033$). Esto nos indica que la producción de SPE es muy importante para la colonización de las superficies abióticas. En este sentido, los resultados evidencian que la quercetina tiene un impacto negativo en la producción de proteínas extracelulares y como consecuencia afecta la organización espacio-temporal y la retención de las células en la biopelícula. Estudios previos han abordado el estudio de flavonoides como inhibidores de biopelículas de bacterias patógenas. Vikram et al. (2010) evaluaron el efecto de diversos flavonoides sobre la formación de biopelículas de *E. coli* O157: H7, donde la quercetina, naringenina y la sinensteina fueron los compuestos más efectivos al disminuir la biomasa total en un 50, 42 y 35% respectivamente, a una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al profundizar en el posible mecanismo de acción se observó que la naringenina reprimió la expresión de los genes del sistema de secreción tipo III en *V. harveyi*. En otro estudio, la quercetina y el ácido tánico fueron los compuestos responsables de la actividad antibiopelícula de extractos de la planta *A. japonica* contra *S. aureus* (Lee et al., 2013). Mientras que los flavonoides como la miricetina, hesperetina y la chalcona fletina inhibieron la formación de biopelículas de *S. aureus* RN4220 en más de un 70% a concentraciones de 16 a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta cepa portaba el plásmido pUL5054 que contiene el gen *msrA* que codifica para la bomba de eflujo MsrA. Aunque la cepa *S. aureus* SA1199B, que sobreexpresaba el gen *norA* que codifica para la bomba de eflujo responsable de excretar fluoroquinolonas y otras sustancias nocivas, fue menos susceptible a la acción de los flavonoides (Lopes et al., 2017).

En los trabajos antes mencionados la actividad antibiopelícula se evaluó después de 24 h de formación de la biopelícula en presencia de los compuestos, utilizando el colorante cristal violeta para cuantificar la biomasa total. Es importante mencionar que este método no permite visualizar el efecto de los compuestos en las diferentes etapas de formación como la adhesión y formación de microcolonias, como se observó en el presente trabajo. Además, que la tinción con cristal violeta no distingue entre células viables y no viables o los componentes de la matriz extracelular, por lo que solo se hacen especulaciones sobre el posible mecanismo de acción. El proceso de formación de biopelículas es complejo y requiere la coordinación de la replicación sobre la superficie y la producción de SPE para colonizar la superficie y establecer biopelículas maduras. Se sabe que en *L. monocytogenes* las etapas tempranas de formación como la adhesión y el establecimiento de microcolonias influye en la dinámica de colonización de las superficies abióticas (Mosquera-Fernández et al., 2016). Esto concuerda con lo observado en el presente estudio ya que de acuerdo

a los resultados, la quercetina afecta la producción de proteínas extracelulares, reduce la adhesión y la formación de microcolonias, lo que repercute en la capacidad de colonizar las superficies abióticas y formar biopelículas maduras.

Las biopelículas maduras se caracterizan por el incremento en el contenido de las SPE que a su vez definen su estructura tridimensional y la composición y función de sus componentes depende de cada especie bacteriana. En *L. monocytogenes* el ADN extracelular participa en la adhesión inicial; aunque se sabe que es de origen cromosómico, el mecanismo de liberación se desconoce y se especula que puede ser resultado la lisis celular (Harmsen et al., 2010). En cuanto a los polisacáridos, los ácidos teicoicos de la pared celular son los principales componentes (Brauge et al., 2016). También se ha reportado la presencia de un polisacárido insoluble unido a la pared celular compuesto de poli β -(1,4)-N-acetilmanosamina decorado residuos de α -1,6- galactosa, el cual se induce cuando los niveles del segundo mensajero c-di-GMP aumentan (Köseoğlu et al., 2015). A ambos polisacáridos se les atribuye un papel protector más que un papel estructural en la formación de biopelículas (Brauge et al., 2016; Köseoğlu et al., 2015). En el presente estudio, no se observó efecto de la quercetina sobre el contenido de estos componentes extracelulares, por lo que en nuestras condiciones experimentales su participación no fue significativa para el desarrollo de biopelículas maduras.

Estudios de proteómica han reportado que numerosas proteínas se expresan diferencialmente cuando *L. monocytogenes* forma biopelículas en comparación con el estado planctónico (Lourenço et al., 2013; Mata et al., 2015; Misra et al., 2014). Se han identificado proteínas relacionadas en el metabolismo central (piruvato deshidrogenasa y 6-fosfofructocinasa), proteínas ribosomales (30S), y chaperonas involucradas en la protección al estrés (DnaK, GroeL), y su función se ha relacionado con el estado metabólico de las bacterias en biopelícula (Lourenço et al., 2013; Tremoulet et al., 2002).

Otro grupo de proteínas que se encuentran presentes en la matriz extracelular de *L. monocytogenes* son algunos factores de virulencia como la proteína ActA y la InlC (Lourenço et al., 2013). La evidencia sugiere que estos factores de virulencia además de coordinar el ciclo de infección de este patógeno, también participan en la formación de biopelículas manteniendo las uniones célula-célula y célula superficie. Por ejemplo, la proteína ActA que media la motilidad intracelular y la translocación de célula a célula dentro del hospedero (Travier y Lecuit, 2014; Vera et al., 2013), promueve la agregación bacteriana mediante interacciones directas ActA-ActA con células

vecinas, favoreciendo la formación de biopelículas (Travier et al., 2013). De igual manera, la expresión de los genes *inlA* y *inlB*, que codifican a las internalinas unidas a la pared celular (InlA y InlB, respectivamente), se correlacionó positivamente con la fuerza de adhesión de *L. monocytogenes* en superficies de vidrio (Chen et al., 2009). En nuestro estudio se observó que la quercetina inhibió la producción de proteínas extracelulares y se afectó la adhesión inicial y formación de biopelículas de *L. monocytogenes*, lo que refuerza nuestra hipótesis de que el mecanismo de acción antibiopelícula de este flavonoide es a través de la inhibición de la síntesis de factores de virulencia que actúan como adhesinas. Sin embargo, es necesario contemplar el efecto de este compuesto sobre la expresión de los genes de virulencia y sus componentes regulatorios.

6.2.2 Conclusiones

La quercetina a una concentración no letal afecta la producción de proteínas extracelulares, mientras que el contenido de polisacáridos y ADN extracelular no se ve modificado. Por lo que el efecto inhibitorio sobre la formación de biopelículas se debe a la inhibición de la acumulación de proteínas en la matriz extracelular, lo que perjudica la adhesión, la formación de microcolonias y por ende el establecimiento de biopelículas maduras.

6.3 Etapa 3: Expresión de Genes inducidos por la Actividad de PrkA Relacionados con la Formación de Biopelículas y Factores de Virulencia (*sigB*, *prfA*, *inlA*, *inlC* y *actA*) de *L. monocytogenes* Expuesta a Quercetina

En la Figura 15 se muestra el efecto de la quercetina sobre la expresión relativa de los genes de virulencia relacionados con la formación de biopelícula (*actA*, *inlA* y *inlC*) y sus componentes regulatorios (*sigB* y *prfA*). Los valores de expresión fueron normalizados con la expresión del gen constitutivo que codifica para la región 16S de la subunidad menor del ribosoma. El análisis de RT-PCR en tiempo real indicó que la quercetina reprimió la expresión de los genes evaluados,

siendo este efecto dosis dependiente ($p \leq 0.05$). En las células expuestas a 0.2 mM de quercetina se observaron ratios de expresión relativa (Log_2 ; control vs. células tratadas) para *sigB*, *prfA*, *actA*, *inlA* y *inlC* de -2.26, -2.86, -4.26, -2.75 y -3.67, respectivamente. Mientras que a 0.8 mM los ratios fueron de -3.25, -3.58, -4.83, -3.87 y -4.53, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la actividad hemolítica de los sobrenadantes de *L. monocytogenes* cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de quercetina (Figura 16). La lisis de eritrocitos es mediada por la listeriolisina (LLO) que es codificada por el gen *hly* que se encuentra bajo el control de PrfA (Lobel et al., 2015). Las concentraciones evaluadas (0.2 – 1.6 mM) inhibieron por completo la lisis de los eritrocitos, indicando que LLO no se produjo cuando la bacteria fue cultivada en presencia de quercetina. Esto indica que la quercetina es capaz de modular la expresión de factores de virulencia de *L. monocytogenes*.

Estos resultados podrían estar relacionados con la reducción en la producción de proteínas extracelulares en las biopelículas de *L. monocytogenes*. En el presente trabajo se observó que la concentración de 0.8 mM la expresión de las internalinas *inlA* y *inlC* fue 14 y 23 veces menor en comparación con las células no tratadas. Gilmartin et al. (2016) reportaron que InlA se expresó en mayor medida en células planctónicas que en biopelículas maduras, lo que indicó que esta proteína extracelular podría participar en la adhesión inicial en lugar de las etapas de maduración. Por otra parte, InlC se cuantificó en mayor abundancia en biopelículas en comparación con células planctónicas (Lourenço et al., 2013), lo que sugiere que las diferentes internalinas tienen distintas funciones durante el desarrollo de biopelículas de *L. monocytogenes*. Por lo que la represión observada en los tratamientos con quercetina podría estar relacionada con la inhibición de *L. monocytogenes* en acero inoxidable.

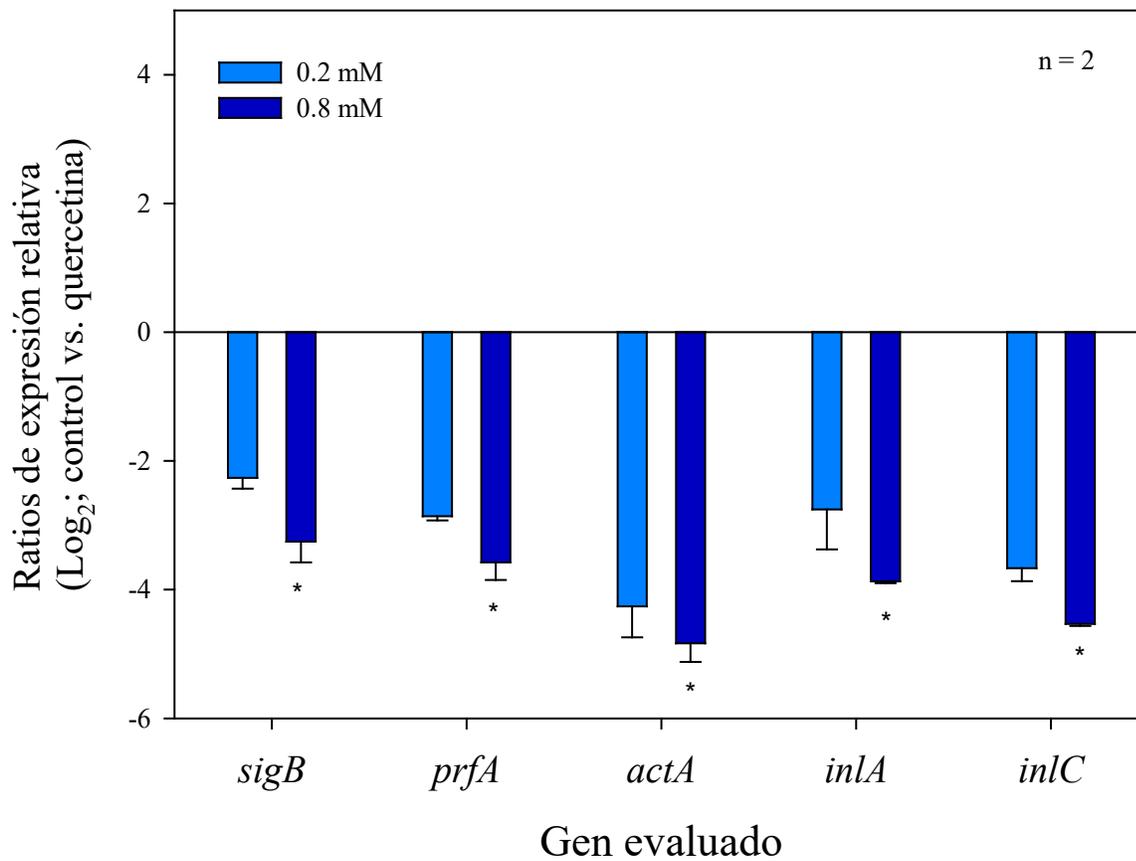


Figura 15. Cambios en los ratios de expresión relativa de los genes de virulencia de *L. monocytogenes* en respuesta al tratamiento con quercetina (0.2 y 0.8 mM). Los ratios se transformaron a logaritmo base 2 (Log₂). * diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las concentraciones de quercetina. Los resultados son el promedio de dos replicas biológicas con tres repeticiones técnicas \pm el error estándar.

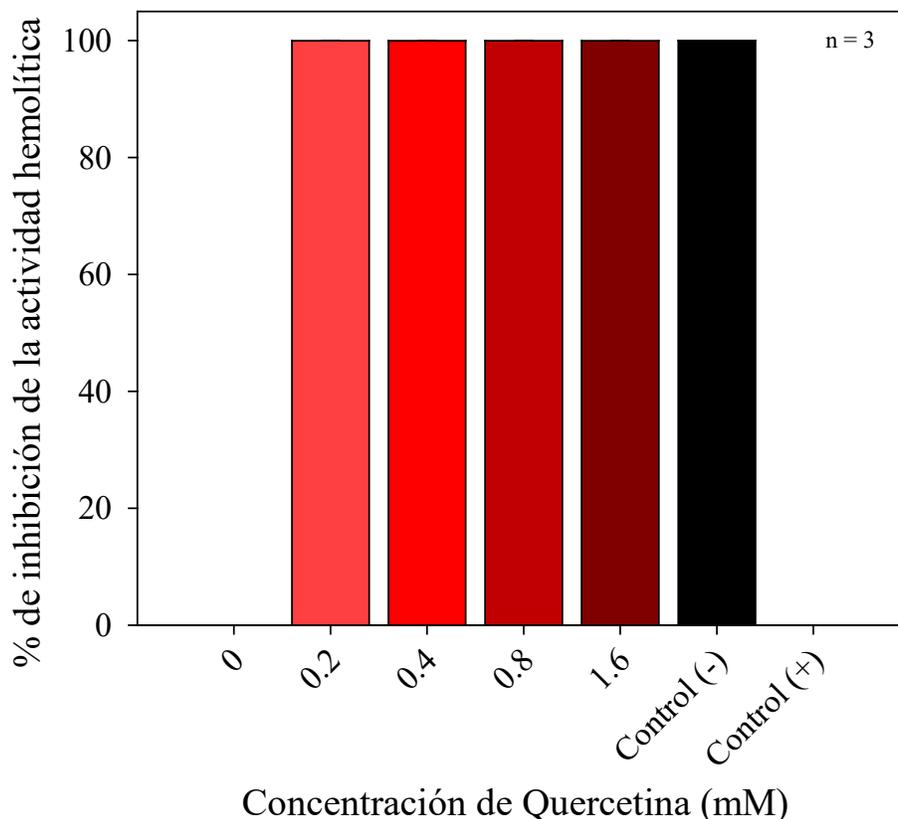


Figura 16. Actividad hemolítica de los sobrenadantes de *L. monocytogenes* cultivada en presencia de quercetina. Los valores son el promedio de tres experimentos independientes. Control (-): eritrocitos expuestos a solución salina (0 % hemólisis). Control (+): eritrocitos expuestos a agua destilada (100 % hemólisis).

De igual manera, a las concentraciones de 0.2 y 0.8 mM la expresión del gen *actA* fue de 20 y 29 veces menor en comparación con las células no tratadas, respectivamente. La proteína ActA se encontró en mayor abundancia en biopelículas que en células planctónicas (Lourenço et al., 2013) donde promueve la agregación bacteriana mediante interacciones ActA-ActA (Travier et al., 2013). Se ha reportado que las fuerzas de adhesión célula-célula influyen la forma, el tamaño y la organización de microrcolonias en *E. coli* y *P. aeruginosa* y contribuye al desarrollo normal de las biopelículas (Marie-Cécilia et al., 2017). Estas fuerzas de adhesión están mediadas por las adhesinas extracelulares, como la proteína ActA en el caso específico de *L. monocytogenes*. Por lo que es probable que el efecto en el establecimiento de microcolonias y maduración de las biopelículas formadas en presencia de quercetina esté relacionado con la represión del gen *actA*.

Otros autores han abordado el estudio de los flavonoides sobre la virulencia de *L. monocytogenes*, pero se ven limitados al no profundizar en el posible modo de acción. Sivaranjani et al. (2016) reportaron que la morina inhibió la actividad hemolítica de este patógeno entre un 54 – 70%; sin embargo, no se evaluó su efecto sobre la expresión génica. Es importante resaltar que en el estudio en mención la morina inhibió la formación de biopelículas actuando en las primeras etapas de formación, al igual que lo que observamos con la quercetina, aunque los autores no relacionaron la participación de los factores de virulencia en la formación de las biopelículas. De igual manera, la chalcona floretina inhibió la actividad hemolítica de *L. monocytogenes*, a pesar de que este compuesto no afectó la transcripción del gen *hly*. Esto podría indicar, que para el caso específico de la actividad hemolítica la floretina pudiera estar actuando a nivel postraducciona contra la LLO (Wang et al., 2017). Este efecto se ha reportado para el flavonoide fisteina el cuál inhibió la oligomerización de la LLO mediante la competencia del sitio de unión al colesterol, que se requiere para el anclaje de la LLO a las membranas de los eritrocitos (Wang et al., 2015).

En el presente trabajo, observamos que la quercetina reprimió la expresión de los genes *inlA*, *inlC* y *actA*, por lo que es probable que la inhibición la actividad hemolítica se debió también a la represión del gen *hyl* ya que todo ellos se encuentran en la misma isla de patogenicidad (LPI1) bajo el control de *prfA*, también reprimido por efecto de la quercetina. En este sentido, nuestros resultados contribuyen a esclarecer el mecanismo de acción de los flavonoides sobre la virulencia de *L. monocytogenes*, al demostrar que afectan la expresión génica de los factores de virulencia y sus componentes regulatorios. Además, este efecto hace que la quercetina y flavonoides con estructura similar sean considerados candidatos para su uso en terapias anti-virulencia las cuales buscan atenuar la patogenicidad bacteriana sin afectar la viabilidad y así prevenir la generación de resistencia a otros antibióticos causada por la presión selectiva (Maura et al., 2016).

Por último, el efecto de la quercetina sobre *sigB* y *prfA* refuerza la hipótesis planteada en esta tesis de que la quercetina interfiere con el sistema de traducción de señales mediado por la serina treonina cinasa PrkA. Se sabe que el contacto de las bacterias con las superficies abióticas genera un estrés en la pared celular el cuál desencadena la transición del estado planctónico al estilo de vida sésil al inducir la síntesis de adhesinas para consolidar su unión a la superficie (O'Toole y Wong, 2016). En *L. monocytogenes* SigB es el regulador global de la respuesta al estrés e induce la transcripción del gen *prfA* mediante la unión directa con su región promotora (Rauch et al., 2005; Scotti et al., 2007), por lo que es factible suponer que la represión de *sigB* causada por la

quercetina, evitó la sobreexpresión de *prfA* y a su vez, de al menos *inlA*, *inlC* y *actA*. Afectando como consecuencia la capacidad de adherirse irreversiblemente al acero inoxidable y formar biopelículas. La evidencia reportada en la literatura sugiere que la PrkA participa en este proceso en *L. monocytogenes*, ya que en estudios de fosfoproteómica se ha encontrado que la proteína RsbR, que forma parte del complejo proteico llamado estresosoma, se encuentra fosforilada en el residuo Thr175 (Misra et al., 2011). Este residuo es clave para la activación de esta proteína y la subsecuente cascada de señalización que culmina en la activación y sobreexpresión de SigB (Misra et al., 2011).

6.3.1 Conclusiones

Los resultados demuestran que la quercetina reprime la expresión de genes de estrés (*sigB*) y virulencia (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*) relacionados con la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*. Estos resultados además, reflejan las ventajas potenciales de la quercetina para atenuar la virulencia de esta bacteria tanto en la industria alimentaria como en el área clínica.

6.4 Etapa 4: Efecto Inhibitorio de la Quercetina Sobre PrkA de *L. monocytogenes*

6.4.1 Modelo Tridimensional del Dominio Catalítico de la PrkA de *L. monocytogenes*

En la Figura 17 se presenta la gráfica de Ramachandran donde se muestran los ángulos de torsión diédricos Ψ (psi) y Φ (phi) de los residuos de aminoácidos de nuestro modelo, que contribuyen a la conformación de la estructura terciaria. La región delimitada con la línea verde corresponde a la región con el plegamiento más favorable, mientras que los puntos azules representan cada residuo de aminoácido en nuestro modelo. Ya que la mayoría de estos residuos cayeron dentro de los límites

de las regiones antes mencionadas, se puede asumir que el plegamiento del modelo construido de la PrkA es estable.

Como era de esperarse, la PrkA presentó un plegamiento similar a la estructura cristalina de PknB de *S. aureus* (Figura 18). En el modelo obtenido, la PrkA se encontró en la conformación abierta o inactiva, que es la conformación que comúnmente se obtiene al cristalizar estas cinasas con análogos del ATP (Rakette et al., 2012). El plegamiento de la PrkA es característico al de las cinasas tipo *Hanks* que se distinguen por la presencia de dos lóbulos, el N y C terminal. De acuerdo al modelo obtenido, en la PrkA el lóbulo N está conformado por seis láminas β antiparalelas y un hélice α . Mientras que el lóbulo C está compuesto por seis hélices α y dos láminas β paralelas. Una región muy importante para las cinasas en general es el sitio de unión del ATP que se encuentra en medio de los dos lóbulos. En la Figura 19 se muestra la superposición del modelo de la PrkA con la estructura de PknB de *S. aureus* en presencia de un análogo del ATP (Rakette et al., 2012), el AMP-PNP, el cual se muestra ocupando el sitio de unión del ATP. Se observó que la PrkA conserva los dominios y residuos de aminoácidos que participan en la orientación de la molécula del ATP y en la transferencia del grupo γ -fosfato. Por ejemplo, el lazo rico en glicina que interconecta dos láminas β que ayudan a mantener el anillo de adenina dentro de la cavidad en la que se une. Este lazo tiende a aproximarse a la molécula de ATP cuando la cinasa adopta su conformación cerrada o activa (Cox et al., 1994). Seguido de este lazo, se encuentra un residuo de lisina (Lys39), invariable en las serina treonina cinasas, el cual forma un puente salino con el ácido glutámico (Glu89) en la conformación cerrada y ayuda a estabilizar al α - y β -fosfato del ATP (Rakette et al., 2012). Otro dominio muy importante en esta superfamilia de cinasas es el DFG, compuesto por Asp151, Phe152 y Gly153 en PknB, que es crítico para estabilizar los grupos fosfato del ATP mediante el ion Mg^{++} que se encuentra ligado al Asp151 (Rakette et al., 2012). Mientras que el dominio HRD también se encuentra presente en la PrkA y está compuesto por His131, Arg132 y Asp133. Este último es el residuo catalítico que actúa como una base débil que atrae el protón del residuo de serina o treonina en las proteínas sustrato, favoreciendo la transferencia del γ -fosfato hacia la proteína diana (Endicott et al., 2012). Por lo anterior se puede decir que el modelo obtenido de la PrkA de *L. monocytogenes* tiene un plegamiento típico de la superfamilia de cinasas tipo *Hanks*.

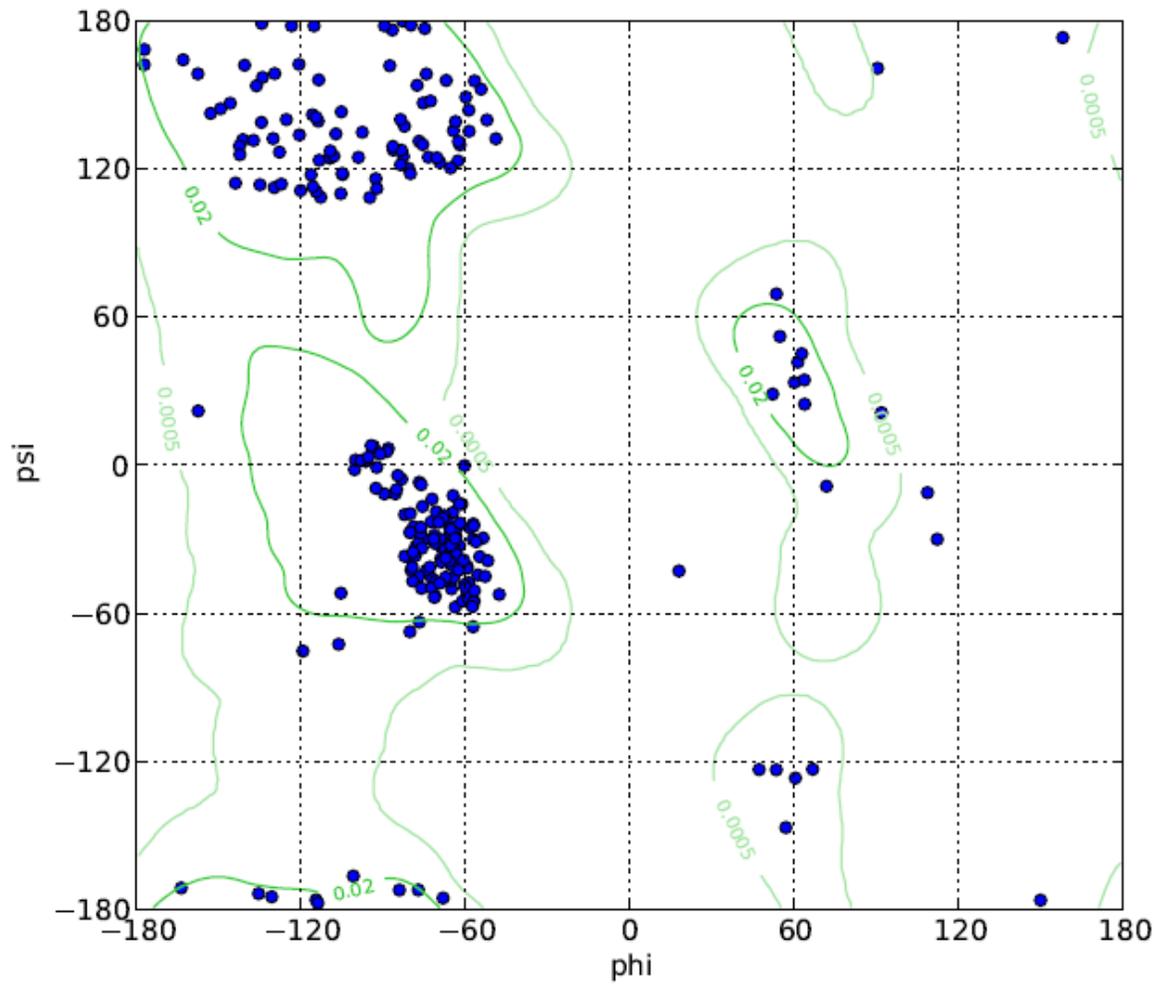


Figura 17. Gráfica de Ramachandran del modelo de la PrkA de *L. monocytogenes*. Los puntos azules representan cada residuo de aminoácido del modelo. Las líneas verdes delimitan las regiones con plegamientos favorables.

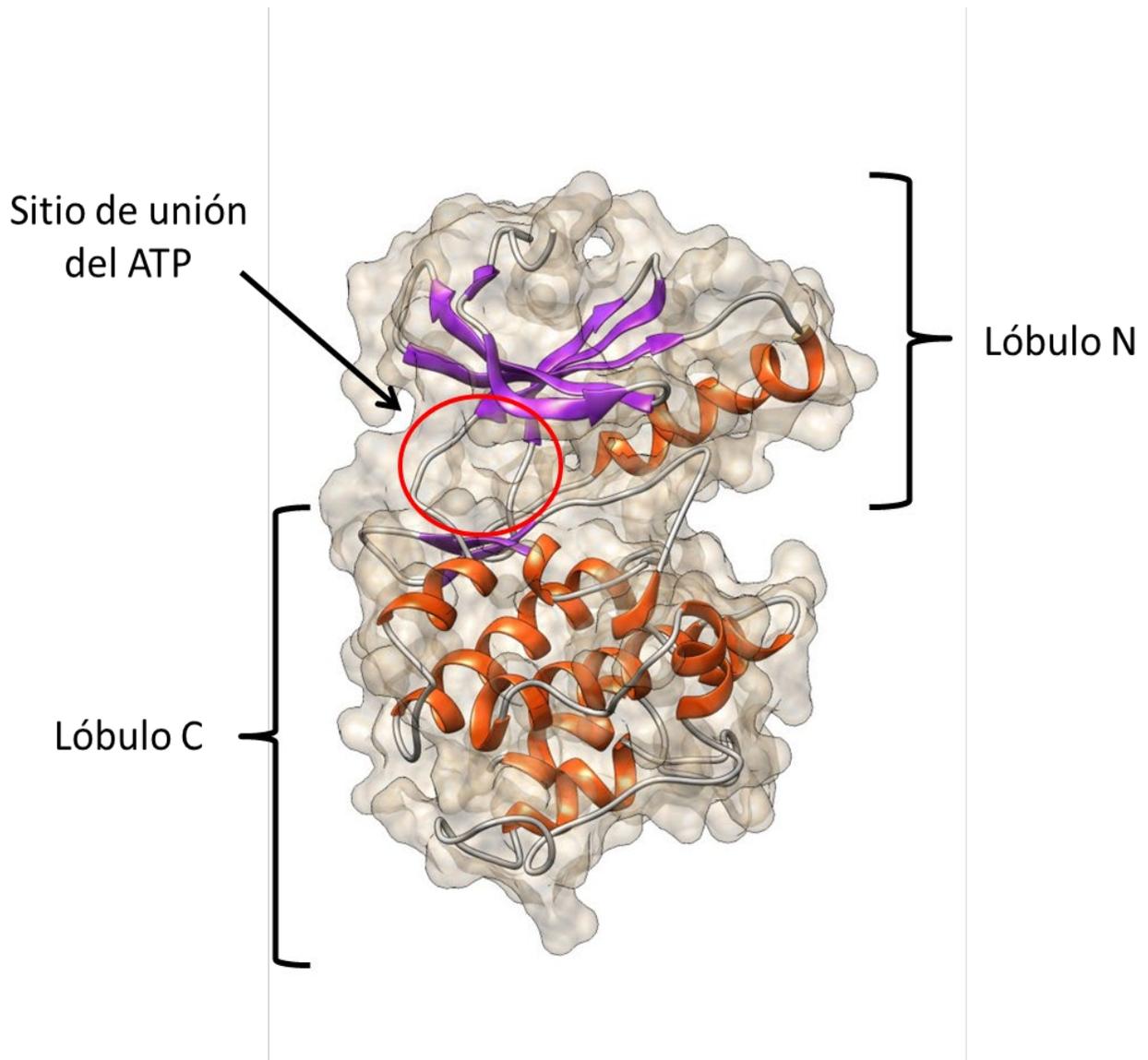


Figura 18. Modelo teórico de la PrkA de *L. monocytogenes* que muestra el plegamiento característico de las serina treonina cinasas con la presencia de dos lóbulos (N y C terminal) con el sitio de unión del ATP entre ambos (círculo rojo). Las láminas β se representan en color morado mientras que las hélices α en naranja.

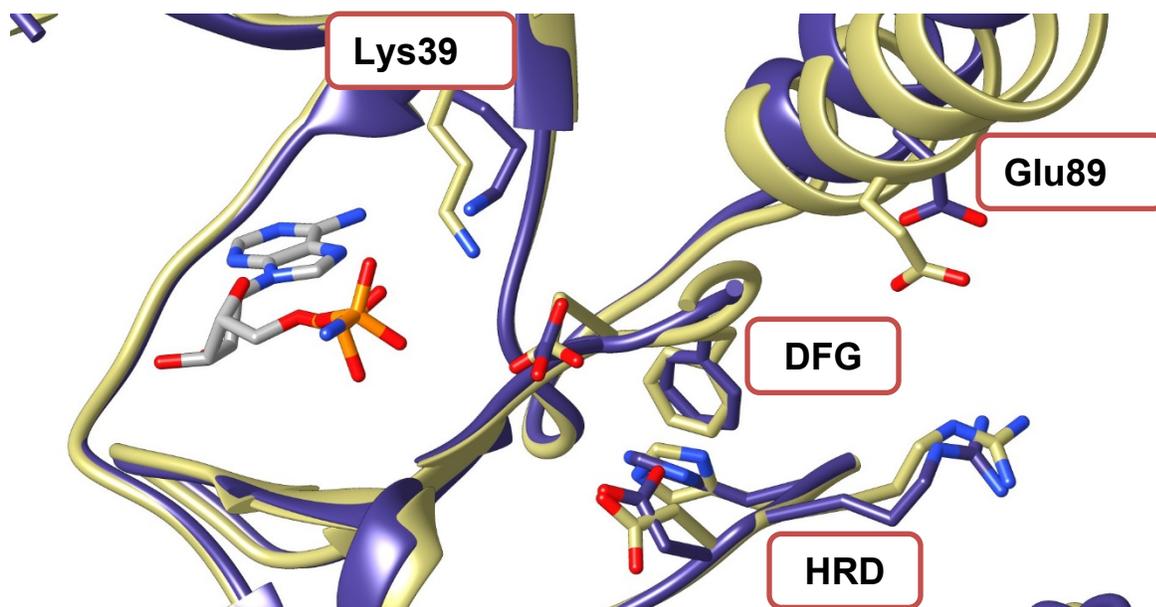


Figura 19. Superposición del modelo de la PrkA de *L.monocytogenes* (azul) y la estructura de PknB (PDB: 4EQM) de *S. aureus* (dorado) con el análogo del ATP. Los residuos que participan en la estabilización de los grupos fosfato y en la catálisis se encontraron presentes en el modelo proyectado de la PrkA. Además, se muestra el dominio DFG compuesto por Asp151, Phe152 y Gly153, que es crítico para estabilizar los grupos fosfato del ATP mediante un ion Mg^{++} así como el dominio HRD compuesto por His131, Arg132 y Asp133. Este último es el residuo catalítico que actúa como una base débil que atrae el protón del residuo de serina o treonina en las proteínas sustrato.

6.4.2 Sobreexpresión y Purificación de la PrkA Mediante Cromatografía de Afinidad

En la Figura 20 se muestra el gel SDS-PAGE al 12% donde se observó la aparición de una banda con el tamaño esperado de la PrkA (39 kDa) a partir de las 4 h de inducción, tanto en la fracción soluble como un remanente en la fracción insoluble. Dado que este sistema de expresión dio buenos resultados, estas condiciones se siguieron utilizando para la purificación de la proteína. La PrkA fue purificada mediante cromatografía por afinidad a metales (IMAC) aplicando un gradiente de imidazol para su elución. En la Figura 21 se muestra el cromatograma característico del proceso de

purificación. El primer pico de elución corresponde a las proteínas que no mostraron afinidad a la columna, mientras que aproximadamente a 100 mM de imidazol se presentó otro pico; sin embargo, de acuerdo al análisis de SDS-PAGE fueron uniones inespecíficas. A partir de 200 mM de imidazol, se observó otro pico de elución el cuál se colectó en tres fracciones que presentaron una sola banda con un patrón de migración en geles de acrilamida correspondiente al peso molecular esperado para la PrkA (39 kDa). Estas fracciones se mezclaron y se dializaron contra buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH = 7.4 con la finalidad de remover el imidazol. La concentración de proteína total se cuantificó posterior a la diálisis y se calculó el rendimiento de la purificación el cual fue de 0.39 mg de proteína pura/g de pellet bacteriano.

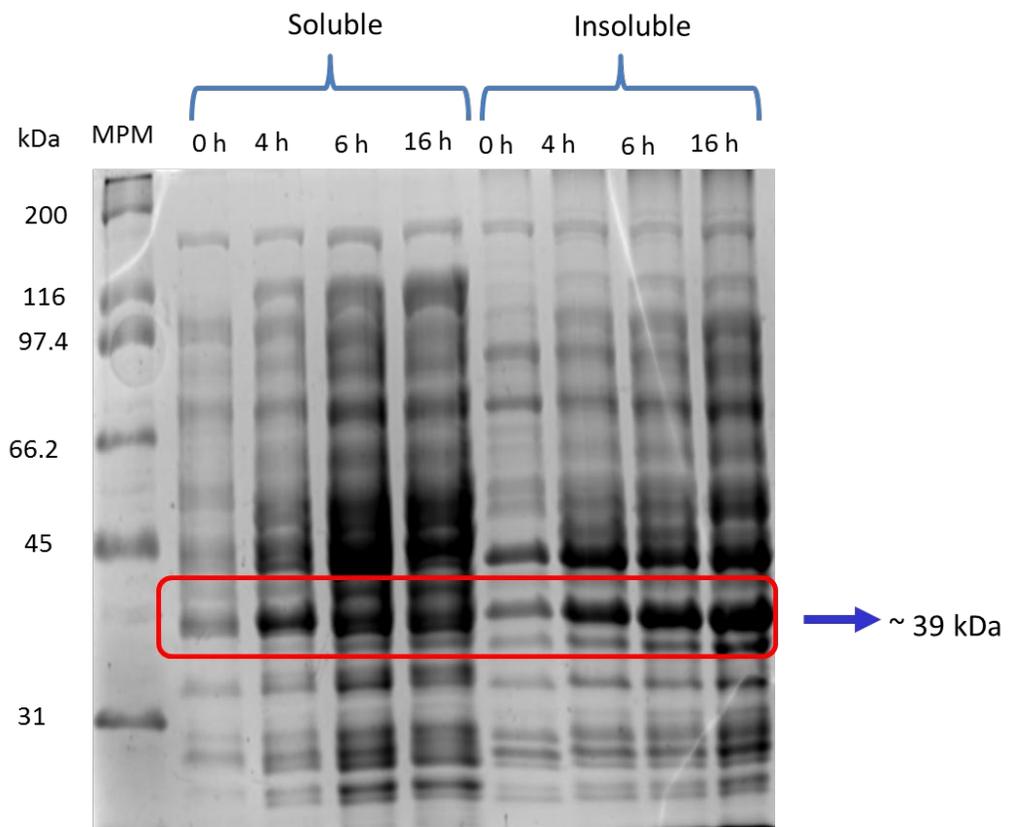


Figura 20. Cinética de sobreexpresión de la PrkA recombinante. MPM = Marcador de peso molecular. Inducción con 1 mM de IPTG a 37 °C. La PrkA se presentó en la fracción soluble a partir de 4 h de inducción.

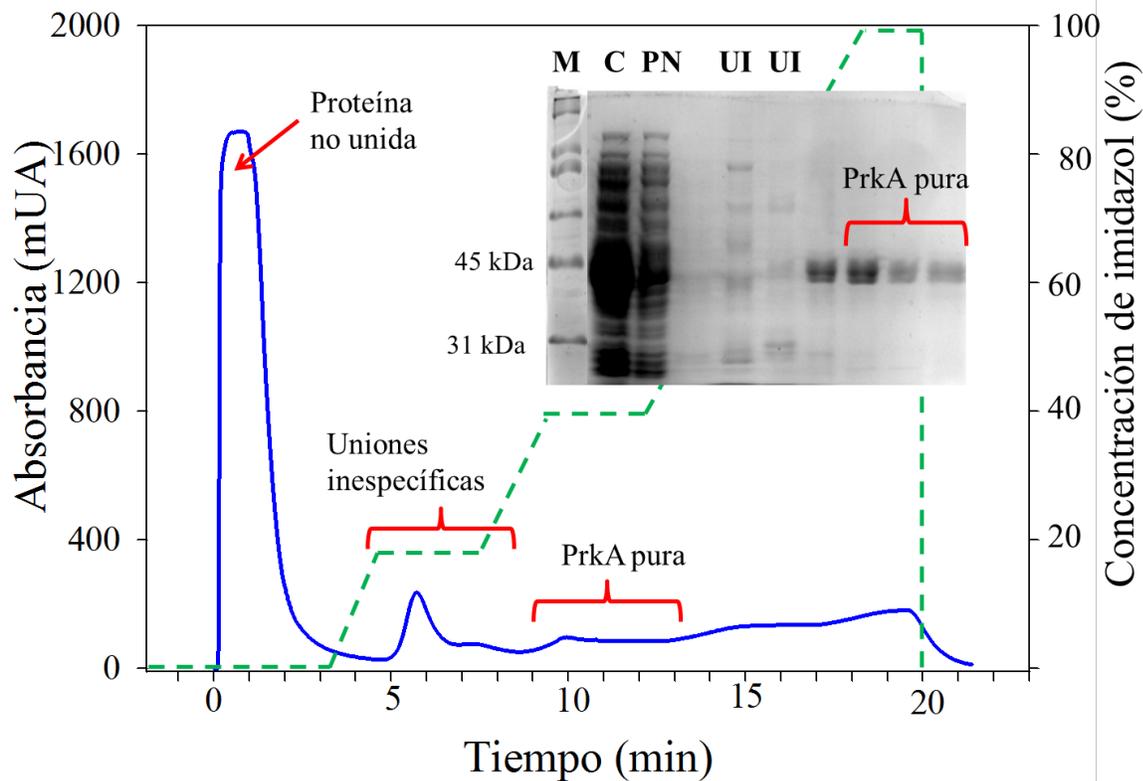


Figura 21. Purificación de la PrkA por cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Se muestra el cromatograma de la purificación en donde la línea azul representa la absorbancia y la verde el gradiente de imidazol. En la figura interna se muestra el gel de electroforesis al 12%: M=Marcador de peso molecular; C=clarificado; PN=Proteína no unida; UI=Uniones inespecíficas.

Para corroborar que la enzima estaba activa, se llevó a cabo un ensayo de actividad enzimática en buffer Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, DTT 1mM con la PrkA 10 μM y MBP 40 μM y ATP 100 μM como sustratos (Figura 22). El análisis mostró que en presencia de la PrkA las Unidades Relativas de Luminiscencia (RLU) disminuyeron, lo que indica el consumo de ATP por parte de la PrkA, por lo que se comprobó que la enzima se purificó en su forma activa y es estable bajo las condiciones de manejo de los experimentos.

La sobreexpresión y purificación del dominio catalítico de la PrkA se reportó primeramente por Lima et al. 2011. En ese estudio se utilizó la cepa de *E. coli* M15 [pREP4] como sistema de expresión y la proteína recombinante se purificó mediante IMAC. Pensinger et al. 2014 reportan su sobreexpresión fusionada con la glutatión S-transferasa y su purificación mediante perlas de

sefarosa. Mientras que Schaezner et al. 2017 obtuvieron la PrkA recombinante pura mediante cromatografía de intercambio iónico. En los estudios antes mencionados la PrkA recombinante se obtuvo, al igual que en el presente trabajo, en la fracción soluble y en su forma activa, sin embargo los autores no reportan el rendimiento de la purificación. A pesar de que esta proteína se ha sido estudiada previamente por algunos grupos de investigación, su caracterización bioquímica y estructural aún no se ha llevado a cabo.

6.4.3 Efecto Inhibitorio de la Quercetina Sobre la Actividad Cinasa de la PrkA y Análisis de Acoplamiento Molecular

Una vez obtenida la proteína pura y activa, se procedió a evaluar el efecto inhibitorio de la quercetina sobre la actividad serina/treonina cinasa de PrkA. Como primer escrutinio, se evaluaron concentraciones de quercetina a 0, 20, 40 y 80 μM . Como se muestra en la figura 23, se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) en la actividad enzimática con 40 y 80 μM de quercetina. Estas concentraciones disminuyeron la actividad residual de la proteína entre un 18 y 64%, respectivamente. Mientras que a 20 μM no se observó diferencias respecto al control sin quercetina. Al demostrarse el efecto inhibitorio de la quercetina, se procedió a realizar un análisis dosis-respuesta aumentando el rango de concentraciones evaluadas (10 – 180 μM). En la Figura 24 se muestra que al aumentar la concentración de quercetina las URL aumentan también, lo que indica que el ATP en la reacción no se consume debido al efecto inhibitorio de este compuesto sobre la PrkA. Estos datos se ajustaron a un modelo de regresión no lineal y se obtuvo un valor $\text{IC}_{50} = 76.04 \pm 0.39 \mu\text{M}$. Estos resultados demuestran que la quercetina inhibe la actividad enzimática de la PrkA.

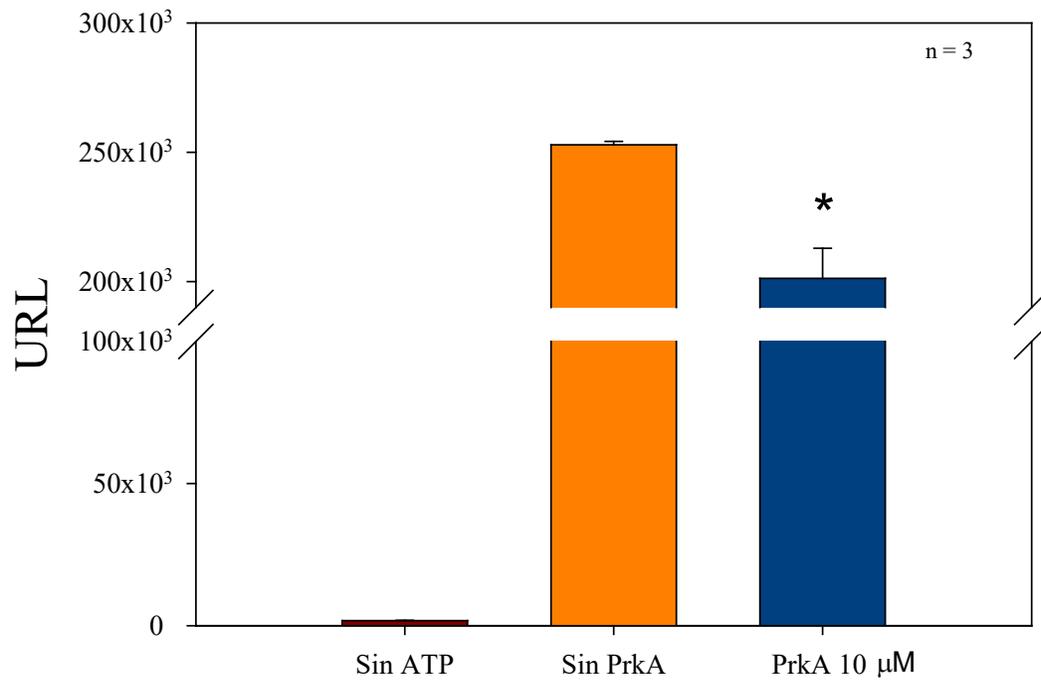


Figura 22. Ensayo de actividad enzimática de PrkA. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm error estándar. * Representa diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con el control sin la PrkA.

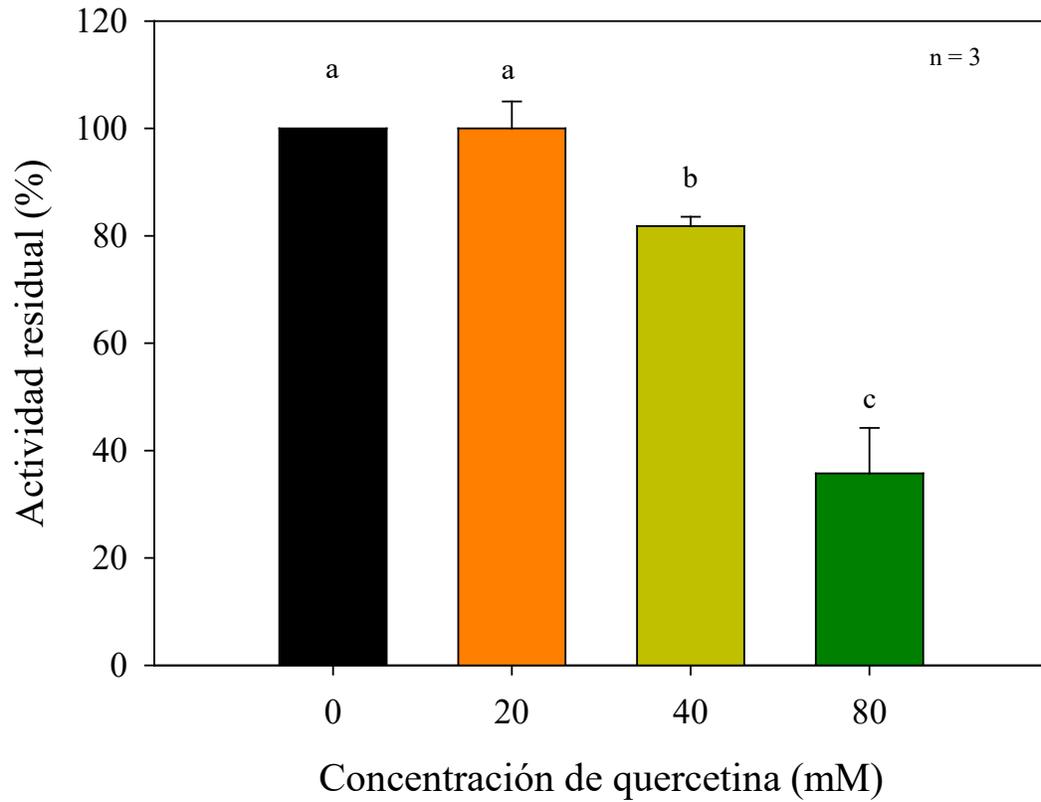


Figura 23. Efecto de la quercetina sobre la actividad residual de la PrkA. Los valores son el promedio de tres repeticiones \pm error estándar. Literales diferentes representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las diferentes concentraciones de quercetina evaluadas.

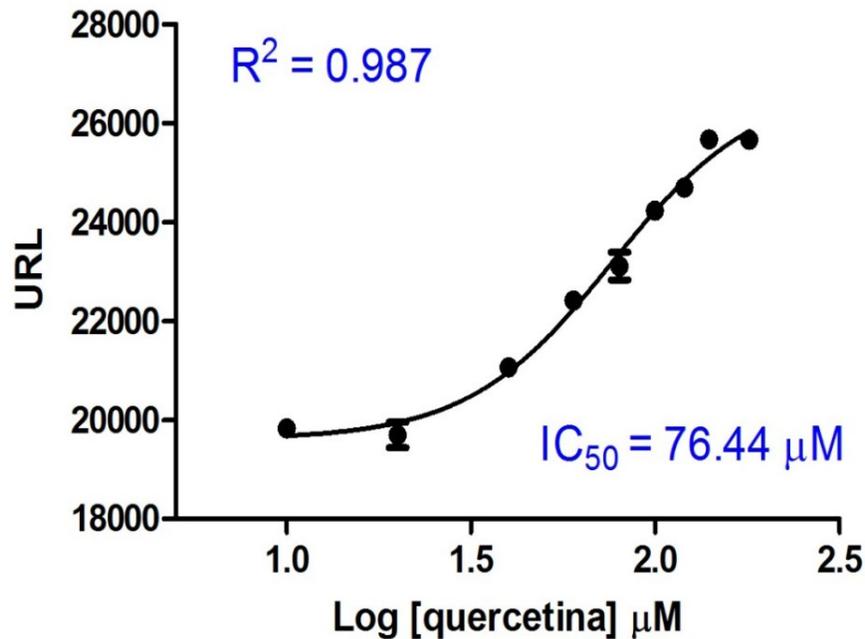


Figura 24. Curva dosis-respuesta de quercetina y la actividad serina/treonina cinasa de PrkA. La quercetina fue incubada con la PrkA 10 min a 37 °C previo a la adición de ATP a la reacción. El ensayo completo se realizó por duplicado evaluando cada concentración por triplicado.

Debido a que los estudios que han determinado el mecanismo de inhibición enzimática de flavonoides sobre serina/treonina cinasa reportan que es mediante competencia por el sitio de unión al ATP (Lolli et al., 2012), se llevó a cabo un análisis de acoplamiento molecular entre la PrkA y quercetina. Además se incluyó la molécula de ATP en el análisis para identificar los posibles residuos que participan en interacción proteína-sustrato. Se obtuvieron ocho poses para cada ligando evaluado y se consideró como la mejor pose aquella con la menor energía de interacción (Trott y Olson, 2010) para el caso de la quercetina. Mientras que para la molécula de ATP la pose que se asemeja a la de su análogo en la estructura de PknB ya que esta se determinó experimentalmente mediante cristalografía (PDB: 4EQM).

En la Figura 25 se muestra la superposición de las poses obtenidas del análisis de acoplamiento molecular para la quercetina y ATP, las cuales presentaron una energía de interacción de -7.3 y -7.1 kcal/mol, respectivamente. En la Figura 25.A podemos observar que ambos ligandos se encuentran dentro de la cavidad formada entre los lóbulos N y C de la PrkA. De acuerdo a la representación de cargas electroestáticas, los residuos alrededor de esta cavidad forman un ambiente polar con cargas negativas (rojo), mientras que al interior de la cavidad se observa un

ambiente parcialmente hidrofóbico al tener en mayor abundancia regiones no polares (blanco) debido a los residuos Ala38 y Val25. En la Figura 25.B se muestra el acomodo de los ligandos al interior de la cavidad y se observó que los anillos A y C de la quercetina se superpusieron con el heterociclo de la adenina de la molécula de ATP.

Por otro lado, en la Figura 26 se muestran las interacciones entre los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión del ATP y los grupos funcionales del ATP y la quercetina. Se puede observar que la molécula de ATP es estabilizada principalmente mediante interacciones hidrofóbicas que se forman entre la cadena lateral de los residuos Ala38, Val91 y Leu141 con los anillos presentes en la adenina que son considerados aromáticos. Este tipo de interacciones se conocen como CH/ π y se encuentran con frecuencia en proteínas que presentan sitios de reconocimiento de sustrato que contienen nucleótidos en su estructura como adenilato cinasa y alcohol deshidrogenasa, entre otras (Boehr et al., 2002). Además, entre el heterociclo de la adenina y el grupo imidazol de la His90 se forma una interacción π/π que es de las más conocidas entre los sistemas de anillos aromáticos (Boehr et al., 2002). Estas interacciones se consideran más débiles en comparación con los puentes de hidrógeno convencionales; sin embargo, su formación es relativamente más fácil ya que al ser interacciones hidrofóbicas, se facilita la remoción de las moléculas de agua (Sarno et al., 2003). La unión de los anillos de la adenina se refuerza entonces con puentes de hidrógeno entre los residuos Glu89, His90 y Gln138 que interactúa con la desoxirribosa. Mientras que, los anillos A y C de la quercetina se orientan de la misma manera que el heterociclo de la adenina, formando igualmente interacciones CH/ π entre las cadenas laterales de Ala38 y Leu141 y el anillo A, además se formase un puente de hidrógeno entre el grupo NH₂ de la cadena principal de Glu90 y el OH en la posición C7 del anillo A de la quercetina. Además, se observa en el anillo B una interacción CH/ π con la cadena lateral de Val25 y un puente de hidrógeno entre el grupo -COO⁻ y el -OH en la posición C3' del flavonoide. Estos resultados nos sugieren que la quercetina pudiera actuar como un inhibidor competitivo por el sitio de unión del ATP en la PrkA.

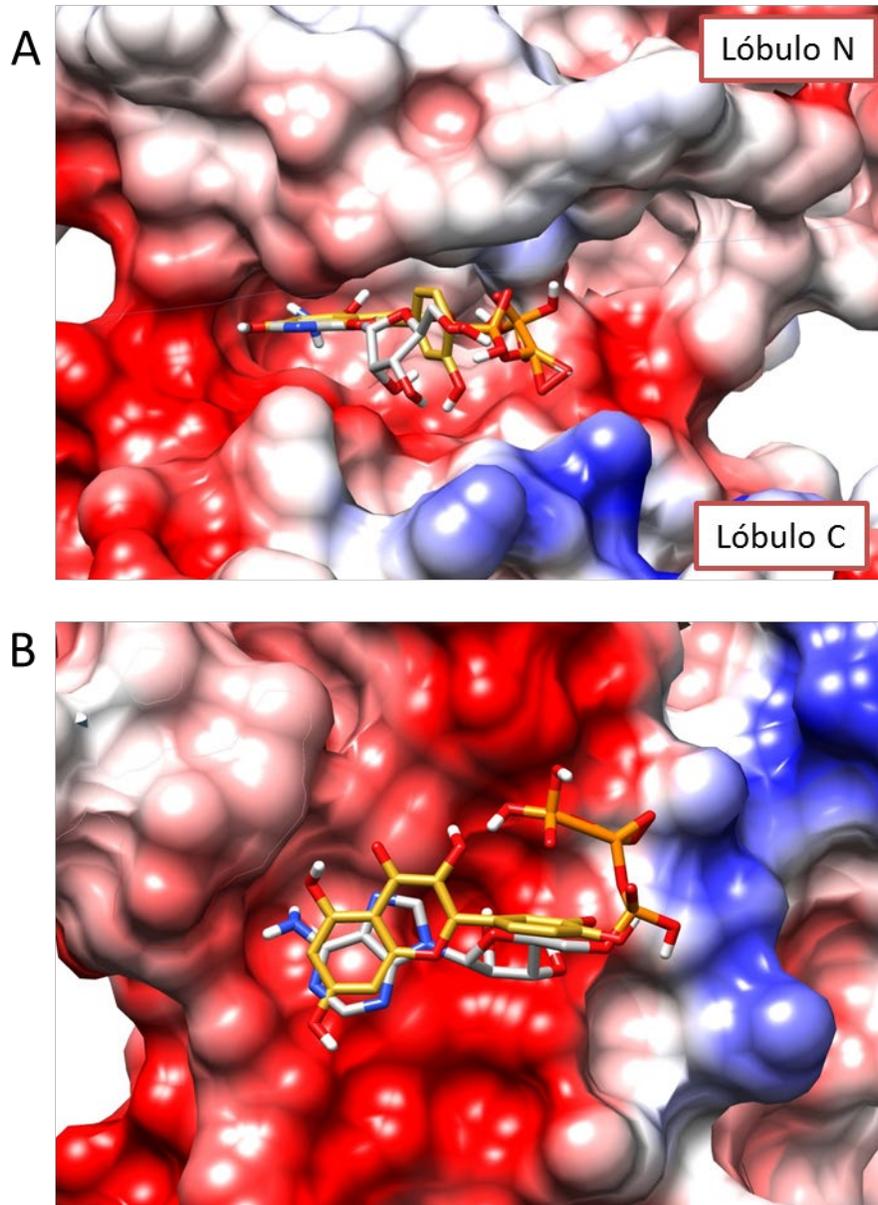


Figura 25. Superposición de las poses de ambos ligandos determinadas por el análisis de acoplamiento molecular en el sitio de unión del ATP de la PrkA. A) Vista frontal de la cavidad formada entre los lóbulos N y C. B) Vista superior donde se observan ambos ligandos dentro de la cavidad. La superficie de la PrkA está coloreada de acuerdo a la distribución de cargas electrostáticas donde los colores rojo y azul representan cargas polares negativas y positivas, respectivamente, mientras que en color blanco se representan las zonas no polares (hidrofóbicas).

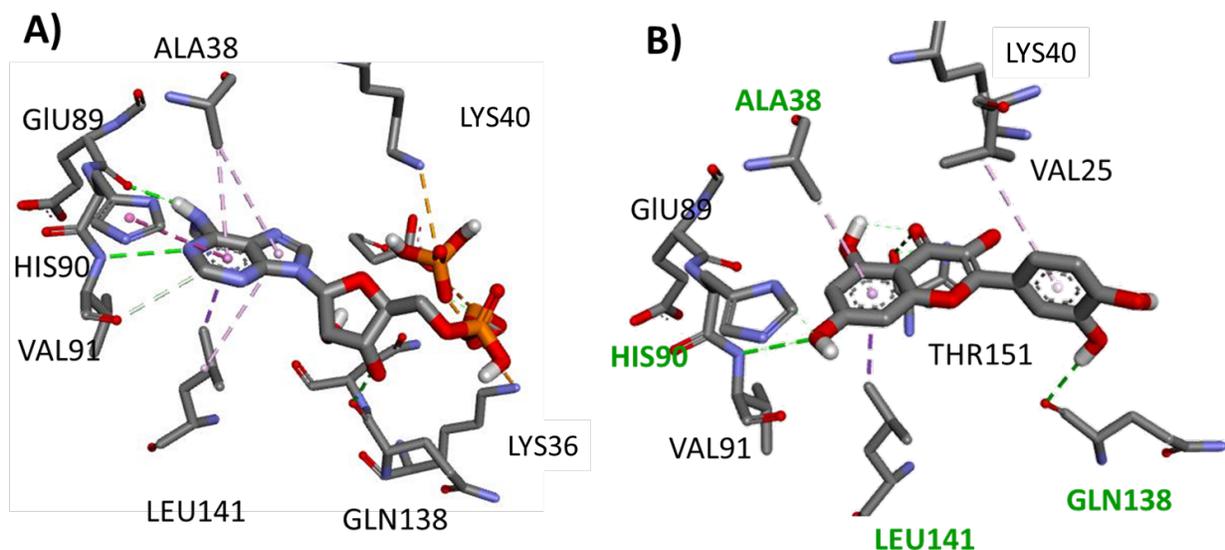


Figura 26. Interacciones del ATP (A) y la quercetina (B) con los residuos de aminoácidos presentes en el sitio de unión del ATP de la PrkA. En verde se señalan los residuos que interactúan tanto con el ATP como con la quercetina.

A la fecha no hay estudios que evalúen el efecto inhibitorio de los flavonoides sobre serina/treonina cinasas bacterianas. Este tipo de estudios se han enfocado a evaluar esta actividad de estos compuestos contra serina/treonina cinasas de células eucariotas, principalmente la caseína cinasa CK2, debido a su importancia en la regulación de procesos celulares como la diferenciación y su implicación en diversas patologías incluyendo el cáncer (Baier et al., 2018). Se observó en estos estudios que compuestos como la quercetina y la apigenina presentaron valores de IC_{50} de 0.85 y 1.2 μM , respectivamente sobre CK2 α (Baier et al., 2018). De igual manera la actividad inhibitoria (IC_{50}) de kaempferol, luteolina, quercetina y apigenina sobre CK2 fue de 0.4, 0.5, 0.55 y 0.8 μM , respectivamente (Lolli et al., 2012). Adicionalmente, se determinó que la inhibición ocurre mediante la competencia por el sitio de unión del ATP en esta cinasa (Lolli et al., 2012), esto concuerda con lo observado en el análisis de acoplamiento molecular en nuestro trabajo. De aquí que los flavonoides sean reconocidos como compuestos anticancerígenos, siendo la quercetina uno de los más estudiados (Raffa et al., 2017; Rauf et al., 2018). Al comparar los valores de IC_{50} reportados con el que obtuvimos en la presente tesis se observa que estos son menores hasta en dos órdenes de magnitud; sin embargo, se sabe que para inhibidores competitivos este valor depende de la concentración de sustrato utilizada en los ensayos (Chen, Kablaoui, et al., 2009; Wu et al.,

2003). Por lo que los resultados obtenidos indican que la quercetina y probablemente otros flavonoides inhiben las serina/treonina cinasas bacterianas.

En bacterias, las serina/treonina cinasas participan en diversos procesos fisiológicos como la síntesis de proteína, el metabolismo central, la división celular, el mantenimiento de la pared celular y la regulación de la virulencia entre otros (Dworkin, 2015). En *L. monocytogenes* se observó que mutantes deficientes en el gen que codifica para la PrkA ($\Delta prkA$) fueron incapaces de replicarse y sobrevivir en macrófagos y en el vaso e hígado de ratones infectados. Los autores atribuyeron este efecto a posibles defectos en la pared celular, al observar que las cepas mutantes fueron más susceptibles a antibióticos que actúan en la pared celular, en comparación con las cepas silvestres (Pensinger et al., 2016). Sin embargo, la evidencia sugiere que la PrkA pudiera regular la virulencia de esta bacteria mediante la modulación de *prfA*, ya que en mutantes de que expresan constitutivamente este factor de transcripción (*prfA**) se observó que, como era de esperarse, los factores de virulencia regulados por PrfA (PlcA, Hly, ActA, InlA y InlB) se sobreexpresaron en estas cepas. Mientras que, también se observó en las cepas mutantes mayor cantidad de la PrkA fosforilada en comparación con las cepas silvestres, lo que indica un aumento en su actividad (Misra et al., 2014).

Por otra parte, en nuestro estudio observamos que la quercetina inhibió la actividad enzimática de la PrkA de *L. monocytogenes in vitro*, lo que podría estar relacionado con la represión de los genes de estrés (*sigB*) y virulencia (*prfA*, *actA*, *inlA* y *inlC*) y por consecuencia, la inhibición de la formación de biopelículas sobre acero inoxidable. En otras bacterias patógenas como *B. subtilis*, se observó que la eliminación del gen que codifica para la serina/treonina cinasa PrkC redujo la formación de biopelículas (Madec et al., 2002). Un efecto similar se observó al sustituir el residuo Lys40 por Arg, mutación que provocó la pérdida de la actividad enzimática (Madec et al., 2002). En *Streptococcus mutans*, la eliminación del gen *pknB* provocó defectos en la formación de biopelículas afectando el grosor de estos agregados (28 μm ; cepa silvestre vs. 13 μm cepa mutante) y la colonización de la superficie, asemejándose a biopelículas en etapas tempranas de formación (Hussain et al., 2006). Cabe mencionar que este efecto también se observó en nuestro estudio en las biopelículas de *L. monocytogenes* formadas en presencia de quercetina. Mientras que cepas mutantes de *Staphylococcus epidermidis* deficientes en el gen *stk* que codifica para una serina/treonina cinasa, mostraron una menor adhesión inicial y una menor producción del

polisacárido PIA que actúa como adhesina lo que se reflejó en una menor formación de biopelículas (Liu et al., 2011).

Aunque el proceso de formación de estas bacterias se regula mediante diversos mecanismos, la participación de las serina/treonina cinasas parece desempeñar un papel fundamental en su desarrollo. Asimismo, ya que los fenotipos de formación de biopelícula observado en los estudios antes mencionados se asemeja al mostrado por *L. monocytogenes* provocado por la acción de la quercetina, podemos inferir que la inhibición de la actividad enzimática de la PrkA se relaciona con los defectos en la formación de biopelículas. Esto plantea nuevas preguntas de investigación por ejemplo, ¿Cómo integra la PrkA los estímulos extracelulares para modular la formación de biopelículas de *L. monocytogenes*?, ¿Cómo se involucra la PrkA en la percepción del contacto inicial entre *L. monocytogenes* y las superficies abióticas?, ¿Qué otras rutas metabólicas y/o procesos biológicos podría estar afectando la inhibición de la PrkA mediante quercetina? Por lo que se necesitan futuros estudios para profundizar en estas cuestiones.

6.4.4 Conclusiones

Se demostró que la quercetina inhibe la actividad enzimática de PrkA de *L. monocytogenes in vitro*. El análisis del acoplamiento molecular sugiere que el flavonoide interactúa con los residuos de aminoácidos del sitio de unión del ATP de PrkA. Por lo que la actividad anti-biopelícula de quercetina podría deberse a la inhibición de la señalización mediada por PrkA.

7. CONCLUSIONES GENERALES

La quercetina previene la adhesión y formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable. Este efecto se le atribuye a su capacidad de interferir con el sistema de señalización mediado por la serina/treonina cinasa PrkA. La quercetina actúa como inhibidor de la actividad enzimática de PrkA, probablemente por competencia por el sitio de unión del ATP, lo que provoca la inhibición de los eventos de señalización inducidos por esta enzima. Dentro de ellos se encuentra la respuesta al estrés mediada por SigB y la inducción de la expresión de los factores de virulencia mediados por PrfA, los cuales se reprimen por efecto de la quercetina. Como consecuencia, se reduce la producción de proteínas extracelulares lo que afecta la organización espacio-temporal y maduración de las biopelículas de *L. monocytogenes*.

8. RECOMENDACIONES

Para profundizar en el conocimiento generado en la presente tesis se recomienda:

- Realizar estudios de proteómica que permitan identificar cuales proteínas de la matriz extracelular de las biopelículas de *L. monocytogenes* se están inhibiendo por la acción de la quercetina.
- Evaluar la expresión de los genes de virulencia y respuesta al estrés durante la formación de biopelículas.
- Caracterizar bioquímica y estructuralmente a la PrkA.
- Realizar cinéticas de inhibición enzimática de la PrkA con quercetina y otros flavonoides para determinar su mecanismo inhibitorio.
- Llevar a cabo análisis de calorimetría de titulación isotérmica para determinar las constantes termodinámicas de la interacción PrkA-quercetina.

9. REFERENCIAS

- Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., Van Oss, C., Neumann, A., 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 90-97.
- Airola, M.V., Sukomon, N., Samanta, D., Borbat, P.P., Freed, J.H., Watts, K.J., Crane, B.R., 2013. HAMP domain conformers that propagate opposite signals in bacterial chemoreceptors. *PLOS Biology* 11, e1001479.
- Alvarez, M.V., Ponce, A.G., Moreira, M.d.R., 2013. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology* 50, 78-87.
- Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., Dussurget, O., 2005. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology* 56, 383-396.
- Artola, B.S., Herrejón, E.P., 2010. Infecciones por *Listeria*. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 10, 3368-3372.
- Baier, A., Nazaruk, J., Galicka, A., Szyszka, R., 2018. Inhibitory influence of natural flavonoids on human protein kinase CK2 isoforms: effect of the regulatory subunit. *Molecular and cellular biochemistry* 444, 35-42.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. Chapter 15 signal-transduction pathways: an introduction to information metabolism, in: Freeman, W.H. (Ed.), *Biochemistry*, 5th edition ed. New York.
- BIOVIA, D.S., 2017. Discovery studio modeling environment, San Diego.
- Bisbiroulas, P., Psylou, M., Iliopoulou, I., Diakogiannis, I., Berberi, A., Mastronicolis, S.K., 2011. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride. *Letters in Applied Microbiology* 52, 275-280.
- Blum-Menezes, D., Deliberalli, I., Bittencourt, N.C., Couto, C.A.T.d., Barbosa, L.N., Santos, A.M.d., Pinto, G.G., 2013. Listeriosis in the far south of Brazil: neglected infection? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46, 381-383.
- Boehr, D.D., Farley, A.R., Wright, G.D., Cox, J.R., 2002. Analysis of the π - π stacking interactions between the aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-IIIa and its nucleotide ligands. *Chemistry & Biology* 9, 1209-1217.
- Borges, A., Abreu, A., Malheiro, J., Saavedra, M.J., Simões, M., 2013. Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. *CECAV-Centro de Ciência Animal e Veterinária* 3, 2-41.
- Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, M., 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling* 28, 755-767.
- Brauge, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Benezech, T., Maes, E., Guerardel, Y., Midelet-Bourdin, G., 2016. Teichoic acid is the major polysaccharide present in the *Listeria monocytogenes* biofilm matrix. *FEMS Microbiology Letters* 363.

- Bridier, A., Piard, J.-C., Pandin, C., Labarthe, S., Dubois-Brissonnet, F., Briandet, R., 2017. Spatial organization plasticity as an adaptive driver of surface microbial communities. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D., 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379-394.
- Canova, M.J., Molle, V., 2014. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *Journal of Biological Chemistry* 289, 9473-9479.
- Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review—Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology* 145, 1-8.
- Castañeda-Ruelas, G., Eslava-Campos, C., Castro-del Campo, N., León-Félix, J., Chaidez-Quiroz, C., 2014. Listeriosis in Mexico: clinical and epidemiological importance. *salud pública de méxico* 56, 654-659.
- Castañeda-Ruelas, G.M., Castro, N., León, J., Valdez, J., Guzmán, J., Luchansky, J.B., 2013. Prevalence, levels, and relatedness of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods at retail markets in Culiacan, Sinaloa, Mexico. *Journal of Microbiology Research* 3, 92-98.
- Castañeda-Ruelas, G.M., Chaidez-Quiroz, C., Salazar-Jiménez, E.P., Hernández-Chiñas, U., Eslava-Campos, C.A., 2018. *Listeria monocytogenes* y la listeriosis, problema de salud pública en México. *salud pública de méxico* 60, 2.
- Colagiorgi, A., Di Ciccio, P., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., 2016. A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix. *Microorganisms* 4, 22.
- Combrouse, T., Sadovskaya, I., Faille, C., Kol, O., Guérardel, Y., Midelet-Bourdin, G., 2013. Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions. *Journal of applied microbiology* 114, 1120-1131.
- Cox, S., Radzio-Andzelm, E., Taylor, S.S., 1994. Domain movements in protein kinases. *Current Opinion in Structural Biology* 4, 893-901.
- Cross, A.S., 2008. What is a virulence factor? *Critical care (London, England)* 12, 196-196.
- Chen, B.-Y., Kim, T.-J., Silva, J.L., Jung, Y.-S., 2009. Positive correlation between the expression of *inlA* and *inlB* genes of *Listeria monocytogenes* and its attachment strength on glass surface. *Food Biophysics* 4, 304-311.
- Chen, Y., Harapanahalli, A.K., Busscher, H.J., Norde, W., van der Mei, H.C., 2014. Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 637-643.
- Chen, Y., Ross, W.H., Whiting, R.C., Van Stelten, A., Nightingale, K.K., Wiedmann, M., Scott, V.N., 2011. Variation in *Listeria monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1171-1180.

- Cherifi, T., Jacques, M., Quessy, S., Fravallo, P., 2017. Impact of nutrient restriction on the structure of *Listeria monocytogenes* biofilm grown in a microfluidic system. *Frontiers in Microbiology* 8.
- da Silva Meira, Q.G., de Medeiros Barbosa, I., Athayde, A.J.A.A., de Siqueira-Júnior, J.P., de Souza, E.L., 2012. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 25, 469-475.
- de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vázquez-Boland, J.A., 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* 14, 118-127.
- Derouiche, A., Cousin, C., Shi, L., Poncet, S., Pagot, Y., Mijakovic, I., 2013. Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation. *FEMS Microbiology Letters* 346, 11-19.
- Deshayes, C., Bielecka, M.K., Cain, R.J., Scortti, M., de las Heras, A., Pietras, Z., Luisi, B.F., Núñez Miguel, R., Vázquez-Boland, J.A., 2012. Allosteric mutants show that PrfA activation is dispensable for vacuole escape but required for efficient spread and *Listeria* survival *in vivo*. *Molecular Microbiology* 85, 461-477.
- Dorobantu, L.S., Bhattacharjee, S., Foght, J.M., Gray, M.R., 2008. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir* 24, 4944-4951.
- Dworkin, J., 2015. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 24, 47-52.
- Endicott, J.A., Noble, M.E.M., Johnson, L.N., 2012. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annual Review of Biochemistry* 81, 587-613.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology* 8, 623.
- Foreman, A., Jervis-Bardy, J., Boase, S.J., Tan, L., Wormald, P.J., 2013. Noninvasive *Staphylococcus aureus* biofilm determination in chronic rhinosinusitis by detecting the exopolysaccharide matrix component poly-N-acetylglucosamine, *International forum of allergy & rhinology*. Wiley Online Library, pp. 83-88.
- Franciosa, G., Maugliani, A., Scalfaro, C., Floridi, F., Aureli, P., 2009. Expression of internalin a and biofilm formation among *Listeria monocytogenes* clinical isolates. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 22, 183-193.
- Gambino, M., Cappitelli, F., 2016. Mini-review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* 32, 167-178.
- García-del Portillo, F., Calvo, E., D'Orazio, V., Pucciarelli, M.G., 2011. Association of ActA to peptidoglycan revealed by cell wall proteomics of intracellular *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34675-34689.
- Gilmartin, N., Gião, M.S., Keevil, C.W., O'Kennedy, R., 2016. Differential internalin A levels in biofilms of *Listeria monocytogenes* grown on different surfaces and nutrient conditions. *International journal of food microbiology* 219, 50-55.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., Briandet, R., 2015. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning

microscopy and the predominance of the honeycomb-like morphotype. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1813-1819.

- Gupta, A., 2015. Biofilm quantification and comparative analysis of MIC (minimum inhibitory concentration) & MBIC (minimum biofilm inhibitory concentration) value for different antibiotics against *E. coli*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4, 198-224.
- Gusnaniar, N., van der Mei, H.C., Qu, W., Nuryastuti, T., Hooymans, J.M., Sjollema, J., Busscher, H.J., 2017. Physico-chemistry of bacterial transmission versus adhesion. *Advances in colloid and interface science* 250, 15-24.
- Hadjilouka, A., Molfeta, C., Panagiotopoulou, O., Paramithiotis, S., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2016. Expression of *Listeria monocytogenes* key virulence genes during growth in liquid medium, on rocket and melon at 4, 10 and 30 °C. *Food Microbiology* 55, 7-15.
- Halder, S., Yadav, K.K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Haldar, S., Karmakar, S., Sen, T., 2015. Alteration of zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus* 4, 672.
- Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., Cossart, P., 2012. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in microbiology* 20, 360-368.
- Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., Molin, S., 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2271-2279.
- Hedberg, Y., Karlsson, M.-E., Blomberg, E., Odnevall Wallinder, I., Hedberg, J., 2014. Correlation between surface physicochemical properties and the release of iron from stainless steel AISI 304 in biological media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 122, 216-222.
- Hedberg, Y., Wang, X., Hedberg, J., Lundin, M., Blomberg, E., Odnevall Wallinder, I., 2013. Surface-protein interactions on different stainless steel grades: effects of protein adsorption, surface changes and metal release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24, 1015-1033.
- Hernandez-Leon, S., Sarabia-Sainz, J., Montfort, G., Guzman-Partida, A., Robles-Burgueño, M., Vazquez-Moreno, L., 2017. Novel synthesis of core-shell silica nanoparticles for the capture of low molecular weight proteins and peptides. *Molecules* 22, 1712.
- Hoffman, S., Macculloch, B., Batz, M., 2015. Economic burden of major foodborne illnesses acquired in the United States.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Crowley, J.R., Heuser, J., Chapman, M.R., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J.P., Hultgren, S.J., 2013. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio* 4, e00645-00613.
- Hussain, H., Branny, P., Allan, E., 2006. A Eukaryotic-Type Serine/Threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 188, 1628-1632.
- Ibusquiza, P.S., Herrera, J.J.R., Cabo, M.L., 2011. Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 28, 418-425.

- Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E.A., 2013. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control* 29, 125-130.
- Kalmokoff, M., Austin, J., Wan, X.D., Sanders, G., Banerjee, S., Farber, J., 2001. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of applied microbiology* 91, 725-734.
- Kate, T.M., Rachael, V., M., F.J., Andrea, C., Walter, S., Aamir, F., 2015. Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008. *Foodborne Pathogens and Disease* 12, 966-971.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845.
- Kim, T.-J., Gaidenko, T.A., Price, C.W., 2004. A multicomponent protein complex mediates environmental stress signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* 341, 135-150.
- Knudsen, G.M., Holch, A., Gram, L., 2012. Subinhibitory concentrations of antibiotics affect stress and virulence gene expression in *Listeria monocytogenes* and cause enhanced stress sensitivity but do not affect Caco-2 cell invasion. *Journal of applied microbiology* 113, 1273-1286.
- Koo, H., Yamada, K.M., 2016. Dynamic cell-matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3D microenvironments. *Current opinion in cell biology* 42, 102-112.
- Köseoğlu, V.K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z.T., Lehmann, T.E., Miller, K.W., Gomelsky, M., 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Molecular Microbiology* 96, 728-743.
- Kumar, A., Ting, Y.P., 2013. Effect of sub-inhibitory antibacterial stress on bacterial surface properties and biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 111, 747-754.
- Kwok, D., Neumann, A.W., 2000. Contact angle interpretation in terms of solid surface tension. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 161, 31-48.
- Kwok, D.Y., Neumann, A.W., 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in colloid and interface science* 81, 167-249.
- Larson, A.J., Symons, J.D., Jalili, T., 2012. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Advances in Nutrition* 3, 39-46.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M., 2019. *Listeria thailandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69, 74-81.
- Lee, J.-H., Park, J.-H., Cho, H.S., Joo, S.W., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 29, 491-499.
- Lemon, K.P., Freitag, N.E., Kolter, R., 2010. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 192, 3969-3976.

- Leonard, C.M., Virijevec, S., Regnier, T., Combrinck, S., 2010. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *South African Journal of Botany* 76, 676-680.
- Li, G., Brown, P.J., Tang, J.X., Xu, J., Quardokus, E.M., Fuqua, C., Brun, Y.V., 2012. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular Microbiology* 83, 41-51.
- Lima, A., Durán, R., Schujman, G.E., Marchissio, M.J., Portela, M.M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., Cerveñansky, C., 2011. Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *Journal of Proteomics* 74, 1720-1734.
- Liu, H., Fang, H.H., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of biotechnology* 95, 249-256.
- Liu, Q., Fan, J., Niu, C., Wang, D., Wang, J., Wang, X., Villaruz, A.E., Li, M., Otto, M., Gao, Q., 2011. The Eukaryotic-Type Serine/Threonine protein kinase Stk is required for biofilm formation and virulence in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One* 6, e25380.
- Lobel, L., Sigal, N., Borovok, I., Belitsky, B.R., Sonenshein, A.L., Herskovits, A.A., 2015. The metabolic regulator CodY links *Listeria monocytogenes* metabolism to virulence by directly activating the virulence regulatory gene *prfA*. *Molecular Microbiology* 95, 624-644.
- Lolli, G., Cozza, G., Mazzorana, M., Tibaldi, E., Cesaro, L., Donella-Deana, A., Meggio, F., Venerando, A., Franchin, C., Sarno, S., Battistutta, R., Pinna, L.A., 2012. Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. *Biochemistry* 51, 6097-6107.
- Lopes, L.A.A., dos Santos Rodrigues, J.B., Magnani, M., de Souza, E.L., de Siqueira-Júnior, J.P., 2017. Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microbial Pathogenesis* 107, 193-197.
- Lourenço, A., de Las Heras, A., Scortti, M., Vazquez-Boland, J., Frank, J.F., Brito, L., 2013. Comparison of *Listeria monocytogenes* exoproteomes from biofilm and planktonic state: Lmo2504, a protein associated with biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6075-6082.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Séror, S., 2002. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Molecular Microbiology* 46, 571-586.
- Marie-Cécilia, D., Thierry, M., Maxime, A., Vincent, C., David, B., Catherine, Q., Jean-Marc, G., Martial, B., Christophe, B., Sigolène, L., Nicolas, D., 2017. Asymmetric adhesion of rod-shaped bacteria controls microcolony morphogenesis. *Nature Communications* 9, 104679.
- Marles-Wright, J., Grant, T., Delumeau, O., van Duinen, G., Firbank, S.J., Lewis, P.J., Murray, J.W., Newman, J.A., Quin, M.B., Race, P.R., Rohou, A., Tichelaar, W., van Heel, M., Lewis, R.J., 2008. Molecular architecture of the "stressosome," a signal integration and transduction hub. *Science* 322, 92-96.
- Mastronicolis, S.K., Berberi, A., Diakogiannis, I., Petrova, E., Kiaki, I., Baltzi, T., Xenikakis, P., 2010. Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in

Listeria monocytogenes due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH. *Antonie van Leeuwenhoek* 98, 307-316.

- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry* 339, 69-72.
- Mata, M.M., da Silva, W.P., Wilson, R., Lowe, E., Bowman, J.P., 2015. Attached and planktonic *Listeria monocytogenes* global proteomic responses and associated influence of strain genetics and temperature. *Journal of proteome research* 14, 1161-1173.
- Mataragas, M., Rovetto, F., Bellio, A., Alessandria, V., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolin, L., 2015. Differential gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* in Cacciatore and Felino salami to reveal potential stress resistance biomarkers. *Food Microbiology* 46, 408-417.
- Maura, D., Ballok, A.E., Rahme, L.G., 2016. Considerations and caveats in anti-virulence drug development. *Current Opinion in Microbiology* 33, 41-46.
- Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., Simões, M., 2016. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International* 86, 140-146.
- Meyer-Morse, N., Robbins, J.R., Rae, C.S., Mochegova, S.N., Swanson, M.S., Zhao, Z., Virgin, H.W., Portnoy, D., 2010. Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS One* 5, e8610.
- Misra, S.K., Milohanic, E., Ake, F., Mijakovic, I., Deutscher, J., Monnet, V., Henry, C., 2011. Analysis of the serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* reveals phosphorylated proteins related to virulence. *Proteomics* 11, 4155-4165.
- Misra, S.K., Moussan Désirée Aké, F., Wu, Z., Milohanic, E., Cao, T.N., Cossart, P., Deutscher, J., Monnet, V., Archambaud, C., Henry, C., 2014. Quantitative proteome analyses identify PrfA-responsive proteins and phosphoproteins in *Listeria monocytogenes*. *Journal of proteome research* 13, 6046-6057.
- Moreno-Enriquez, R., Garcia-galaz, A., Accedo-felix, E., Gonzalez-rios, H., Call, J., Luchansky, J., Diaz-cinco, M., 2007. Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail Queso Fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *Journal of food protection* 70, 2596-2601.
- Mosquera-Fernández, M., Rodríguez-López, P., Cabo, M.L., Balsa-Canto, E., 2014. Numerical spatio-temporal characterization of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International journal of food microbiology* 182-183, 26-36.
- Mosquera-Fernández, M., Sanchez-Vizueté, P., Briandet, R., Cabo, M.L., Balsa-Canto, E., 2016. Quantitative image analysis to characterize the dynamics of *Listeria monocytogenes* biofilms. *International journal of food microbiology* 236, 130-137.
- Nehmé, R., Nehmé, H., Roux, G., Destandau, E., Claude, B., Morin, P., 2013. Capillary electrophoresis as a novel technique for screening natural flavonoids as kinase inhibitors. *Journal of Chromatography A* 1318, 257-264.

- Nguyen, H., Yang, Y., Yuk, H., 2014. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT-Food Science and Technology* 55, 383-388.
- O'Toole, G.A., Wong, G.C., 2016. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 30, 139-146.
- O'Toole, G.A., Wong, G.C., 2016. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 30, 139-146.
- Olanya, O.M., Hoshide, A.K., Ijabadeniyi, O.A., Ukuku, D.O., Mukhopadhyay, S., Niemira, B.A., Ayeni, O., 2019. Cost estimation of listeriosis (*Listeria monocytogenes*) occurrence in South Africa in 2017 and its food safety implications. *Food Control*.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C.d., Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79-96.
- Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, S., 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7711-7717.
- Papaioannou, E., Giaouris, E.D., Berillis, P., Boziaris, I.S., 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International journal of food microbiology* 267, 9-19.
- Pensing, D.A., Boldon, K.M., Chen, G.Y., Vincent, W.J.B., Sherman, K., Xiong, M., Schaenzer, A.J., Forster, E.R., Coers, J., Striker, R., Sauer, J.-D., 2016. The *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA and its substrate YvcK are required for cell wall homeostasis, metabolism, and virulence. *PLOS Pathogens* 12, e1006001.
- Pereira, S.F., Goss, L., Dworkin, J., 2011. Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 192-212.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M., Zurera, G., 2008. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in food science & Technology* 19, 131-144.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera- a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., Jerala, R., 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306, 530-536.
- Ponnusamy, K., Kappachery, S., Thekeettle, M., Song, J., Kweon, J., 2013. Anti-biofouling property of vanillin on *Aeromonas hydrophila* initial biofilm on various membrane surfaces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29, 1695-1703.

- Porterfield, J.Z., Zlotnick, A., 2010. A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology* 407, 281-288.
- Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M.V., Plescia, F., Daidone, G., 2017. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* 142, 213-228.
- Raimann, E., Schmid, B., Stephan, R., Tasara, T., 2009. The alternative sigma factor σ^L of *L. monocytogenes* promotes growth under diverse environmental stresses. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 583-591.
- Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K., Stehle, T., 2012. Structural analysis of *Staphylococcus aureus* Serine/Threonine kinase PknB. *PLoS One* 7, e39136.
- Rasko, D.A., Sperandio, V., 2010. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 117.
- Rauch, M., Luo, Q., Müller-Altrock, S., Goebel, W., 2005. SigB-Dependent *in vitro* transcription of *prfA* and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA *in vivo*. *Journal of Bacteriology* 187, 800-804.
- Rauf, A., Imran, M., Khan, I.A., Ur-Rehman, M., Gilani, S.A., Mehmood, Z., Mubarak, M.S., 2018. Anticancer potential of quercetin: a comprehensive review. *Phytotherapy Research* 32, 2109-2130.
- Reis-Teixeira, F.B.d., Alves, V.F., Martinis, E.C.P.d., 2017. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 587-591.
- Ryu, J.-H., Beuchat, L.R., 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 247-254.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M., 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 50, 30-35.
- Sarno, S., de Moliner, E., Ruzzene, M., Pagano, M.A., Battistutta, R., Bain, J., Fabbro, D., Schoepfer, J., Elliott, M., Furet, P., Meggio, F., Zanotti, G., Pinna, L.A., 2003. Biochemical and three-dimensional-structural study of the specific inhibition of protein kinase CK2 by [5-oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)quinazolin-7-yl]acetic acid (IQA). *The Biochemical journal* 374, 639-646.
- Scotti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., Vázquez-Boland, J.A., 2007. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection* 9, 1196-1207.
- Schaenzer, A.J., Wlodarchak, N., Drewry, D.H., Zuercher, W.J., Rose, W.E., Striker, R., Sauer, J.-D., 2017. A screen for kinase inhibitors identifies antimicrobial imidazopyridine aminofurazans as specific inhibitors of the *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA. *Journal of Biological Chemistry* 292, 17037-17045.
- Schlisselberg, D.B., Kler, E., Kisluk, G., Shachar, D., Yaron, S., 2015. Biofilm formation ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *acrAB* mutants. *International Journal of Antimicrobial Agents* 46, 456-459.

- Shen, C., Luo, Y., Nou, X., Bauchan, G., Zhou, B., Wang, Q., Millner, P., 2012. Enhanced inactivation of *Salmonella* and *Pseudomonas* biofilms on stainless steel by use of T-128, a fresh-produce washing aid, in chlorinated wash solutions. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6789-6798.
- Shen, Y., Boulos, S., Sumrall, E., Gerber, B., Julian-Rodero, A., Eugster, M.R., Fieseler, L., Nyström, L., Ebert, M.-O., Loessner, M.J., 2017. Structural and functional diversity in *Listeria* cell wall teichoic acids. *Journal of Biological Chemistry* 292, 17832-17844.
- Shin, J.-H., Brody, M.S., Price, C.W., 2010. Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 156, 2660-2669.
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M., Hudson, J.A., 2002. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in Applied Microbiology* 35, 409-413.
- Sivaranjani, M., Gowrishankar, S., Kamaladevi, A., Pandian, S.K., Balamurugan, K., Ravi, A.V., 2016. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes*—An in vitro and in vivo approach. *International journal of food microbiology* 237, 73-82.
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572-585.
- Stavru, F., Archambaud, C., Cossart, P., 2011. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunological Reviews* 240, 160-184.
- Suo, Y., Liu, Y., Zhou, X., Huang, Y., Shi, C., Matthews, K., Shi, X., 2014. Impact of Sod on the expression of stress-related genes in *Listeria monocytogenes* 4b G with/without paraquat treatment. *Journal of Food Science* 79, M1745-M1749.
- Taunton, J., Cohen, M., Shokat, K., Zhang, C., 2014. Selective serine/threonine kinase inhibitors. Google Patents.
- Torres-Vitela, M., Mendoza-Bernardo, M., Castro-Rosas, J., Gomez-Aldapa, C., Garay-Martinez, L., Navarro-Hidalgo, V., Villarruel-López, A., 2012. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and staphylococcal enterotoxin in two types of Mexican fresh cheeses. *Journal of food protection* 75, 79-84.
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N., 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 80, 7-12.
- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, P., Olivo-Marin, J.-C., Ghigo, J.-M., Disson, O., Lecuit, M., 2013. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog* 9, e1003131.
- Travier, L., Lecuit, M., 2014. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a ‘classic’ virulence factor. *Current Opinion in Microbiology* 17, 53-60.
- Tremoulet, F., Duche, O., Namane, A., Martinie, B., Consortium, E.L.G., Labadie, J., 2002. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. *FEMS Microbiology Letters* 210, 25-31.

- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455-461.
- Tsuchiya, H., 2010. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food chemistry* 120, 1089-1096.
- Tuson, H.H., Weibel, D.B., 2013. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter* 9, 4368-4380.
- van der Veen, S., Abee, T., 2010. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7854-7860.
- Vazquez-Armenta, F., Bernal-Mercado, A., Lizardi-Mendoza, J., Silva-Espinoza, B., Cruz-Valenzuela, M., Gonzalez-Aguilar, G., Nazzaro, F., Fratianni, F., Ayala-Zavala, J., 2018. Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *Journal of adhesion science and Technology* 32, 889-907.
- Vera, A., González, G., Domínguez, M., Bello, H., 2013. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología* 30, 407-416.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P.R., Pillai, S.D., Patil, B.S., 2010. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of applied microbiology* 109, 515-527.
- Vlamakis, H., Kolter, R., 2015. Division of labor in biofilms: the ecology of cell differentiation. *Microbiology spectrum* 3, MB-0002-2014.
- Wang, J., Liu, B., Teng, Z., Zhou, X., Wang, X., Zhang, B., Lu, G., Niu, X., Yang, Y., Deng, X., 2017. Phloretin attenuates *Listeria monocytogenes* virulence both *in vitro* and *in vivo* by simultaneously targeting Listeriolysin O and Sortase A. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 9.
- Wang, J., Qiu, J., Tan, W., Zhang, Y., Wang, H., Zhou, X., Liu, S., Feng, H., Li, W., Niu, X., Deng, X., 2015. Fisetin inhibits *Listeria monocytogenes* virulence by interfering with the oligomerization of Listeriolysin O. *The Journal of Infectious Diseases* 211, 1376-1387.
- Wang, T., Li, Q., Bi K., 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 31, 12-23.
- Wu, D., Kong, Y., Han, C., Chen, J., Hu, L., Jiang, H., Shen, X., 2008. d-Alanine:d-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32, 421-426.
- Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., Xu, X., 2013. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 8185-8190.
- Wu, P., Nielsen, T.E., Clausen, M.H., 2015. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* 36, 422-439.
- Xue, Z., Hessler, C.M., Seo, Y., Hasset, D.J., Panmanee, W., 2013. *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 101-111.

- Yang, H., 2012. Evaluating the antimicrobial mechanism of neutral electrochemically activated water on foodborne pathogens and their biofilms. University of Minnesota.
- Yang, L., Hu, Y., Liu, Y., Zhang, J., Ulstrup, J., Molin, S., 2011. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology* 13, 1705-1717.
- Yang, Y., Bai, L., Li, X., Xiong, J., Xu, P., Guo, C., Xue, M., 2014. Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood–brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicology in Vitro* 28, 388-396.
- Zhang, X., Zhang, Q., Yan, T., Jiang, Z., Zhang, X., Zuo, Y.Y., 2015. Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environmental science & technology* 49, 6164-6171.
- Zhao, R., Song, Y., Dai, Q., Kang, Y., Pan, J., Zhu, L., Zhang, L., Wang, Y., Shen, X., 2017. A starvation-induced regulator, RovM, acts as a switch for planktonic/biofilm state transition in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Scientific Reports* 7, 639.