

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**RESENSIBILIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI RESISTENTE**

**A AMPICILINA MEDIANTE**

**OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO ANCLADOS A**

**NANOPARTÍCULAS DE ORO**

**Por**

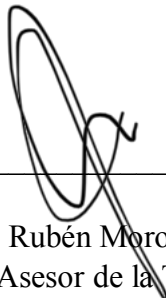
**CÉSAR RODOLFO GARZA CÁRDENAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN  
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Julio del 2022**

**RE-SENSIBILIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI RESISTENTE  
A AMPICILINA MEDIANTE  
OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO ANCLADOS A  
NANOPARTICULAS DE ORO**

Aprobación de la tesis



---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
Asesor de la Tesis

---

Dr. Javier Alberto Garza Cervantes  
Co-asesor de la Tesis

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
Comité tutorial

---

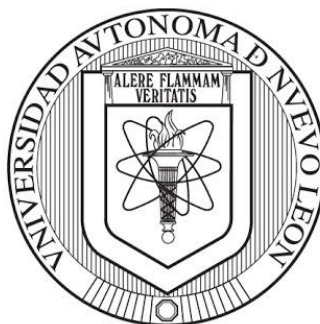
Dr. Carlos Enrique Escárcega González  
Comité tutorial

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Comité tutorial

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**RESENSIBILIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI RESISTENTE**

**A AMPICILINA MEDIANTE**

**OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO ANCLADOS A**

**NANOPARTÍCULAS DE ORO**

**Por**

**CÉSAR RODOLFO GARZA CÁRDENAS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN  
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

**Julio del 2022**

**RE-SENSIBILIZACIÓN DE ESCHERICHIA COLI  
RESISTENTES A AMPICILINA MEDIANTE  
OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO ANCLADOS A  
NANOPARTICULAS DE ORO**

Aprobación de la tesis

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
Asesor de la Tesis

---

Dr. Javier Alberto Garza Cervantes  
Co-asesor de la Tesis

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
Comité tutorial

---

Dr. Carlos Enrique Escárcega González  
Comité tutorial

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Comité tutorial

**Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Rubén Morones Ramírez Asesor de mi tesis y al Dr. Javier Alberto Garza Cervantes como Co-asesor de mi tesis. Así como también al Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, al Dr. Carlos Enrique Escárcega González y a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas, que formaron parte de mi comité tutorial en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN) y a la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) por permitirme el uso de su espacio y equipos en el desarrollo de este estudio.

A todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de este trabajo por el apoyo moral que me brindaron.

## **Dedicación**

*A todos aquellos que me brindaron su apoyo moral y emocional a lo largo de la realización de este proyecto.*

*Especialmente a ti, que creíste en mí y que lo lograría.*

# Índice

Lista de figuras .....	8
Lista de Tablas .....	9
Abreviaturas .....	10
Resumen .....	12
Capítulo 1 .....	14
1.....	Introducción ..... 14
1.1.....	La crisis de salud ..... 14
1.2. Mecanismos de resistencia .....	15
1.2.1. Modificación enzimática .....	16
1.2.1.1 Degradación del antibiótico.....	16
1.2.1.1 Transferencia de grupos funcionales.....	17
1.2.2 Modificación de la membrana.....	18
1.2.2.1 Porinas.....	19
1.2.2.2 Bombas de eflujo.....	19
1.2.3 Modificación del sitio de unión.....	20
1.3 Desarrollo de nuevos tratamientos .....	21
1.3.1 Oligonucleótidos antisentido.....	21
1.3.1.1 Transportadores de ASO .....	23
1.3.1.1.1 Nanopartículas de oro.....	23
Capítulo 2.....	25
2.....	Antecedentes ..... 25
Capítulo 3 .....	29
3.....	Hipótesis y objetivos ..... 29
3.1 Hipótesis.....	29
3.2 Objetivo general .....	29
3.3 Objetivos específicos.....	29

3.4 Metas .....	30
Capítulo 4 .....	31
4.....	31
4.1 Materiales y equipos.....	31
4.2 Cepas bacterianas .....	32
4.3 Metodología .....	32
4.3.1 Diseño de secuencias.....	32
4.3.1.1 Diseño de los ASO .....	32
4.3.1.1.1 Secuencias de ASO utilizadas .....	33
4.3.2 Obtención de cepas resistentes .....	33
4.3.2.1 Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes .....	33
4.3.2.2 Selección de bacterias transformadas .....	34
4.3.2.3 Extracción de ADN plasmídico.....	34
4.3.2.4 Análisis del ADN plasmídico por restricción enzimática y electroforesis .....	34
4.3.3 Síntesis de AuNPs .....	35
4.3.4 Anclaje de los ASO a las AuNPs .....	35
4.3.4.1 Reducción y purificación de los ASO .....	35
4.3.4.2 Conjugación de los ASO a las AuNPs mediante envejecimiento con sal .....	36
4.3.5 Purificación y caracterización de las AuNPs y ASO-AuNPs.....	37
4.3.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	38
4.3.7 Ensayo de Combinatorias.....	38
Capítulo 5 .....	40
5.....	40
5.1 Caracterización de AuNPs y ASO-AuNPs.....	40
5.1.1 Espectro de absorbancia UV-Visible de AuNPs .....	40
5.1.2 Caracterización por TEM de AuNPs.....	41
5.1.3 Espectro de absorbancia UV-Visible de AuNPs y ASO-AuNPs.....	42
5.2 Propagación del plásmido pSK9065 .....	44
5.3 Caracterización del plásmido pSK9065 .....	45
5.3 Ensayos antimicrobianos.....	46
5.3.1 Determinación de la MIC de ampicilina en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y PSK .....	46



5.3.2 Combinatoria entre Ampicilina y ASO-AuNPs .....	48
Capítulo 6 .....	49
6.....Discusión y conclusiones	49
6.1 Discusiones.....	49
Capítulo 7 .....	57
7.....Conclusiones	57
Capítulo 7 .....	59
8.....Anexos	59
Anexo 1: Plásmidos diseñados y utilizados.....	59
Capítulo 8 .....	60
8.....Referencias	60

## Lista de figuras

Figura 1: Clasificación de los mecanismos de resistencia a antibióticos .....	16
Figura 2: Modificaciones estructurales de aminoglucósidos causados por las EMAs. ....	18
Figura 3: Mecanismo de acción de los ASO .....	22
Figura 4: Esquema general del sistema propuesto.....	28
Figura 5: Reducción del enlace disulfuro para activar los ASO.....	36
Figura 6: Anclaje de los ASO a las AuNPs.....	37
Figura 7 Solución de AuNPs y espectro de absorbancia UV-vis. ....	40
Figura 8: Micrografías TEM de AuNPs y Curva de distribución del tamaño de AuNPs.....	41
Figura 9 Soluciones de AuNPs, ASO-AuNPs y espectro de absorbancia UV-vis .....	42
Figura 10: Micrografías TEM de ASO-AuNPs y Curva de distribución del tamaño de ASO- AuNPs.....	43
Figura 11: Colonias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ en agar LB.....	44
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa para el plásmido pSK9065 en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . ....	45
Figura 13: Concentración mínima inhibitoria de ampicilina <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	46
Figura 14: Concentración mínima inhibitoria de ampicilina en <i>E. coli</i> PSK .....	47
Figura 15: Espectro de absorbancia UV-vis de AuNPs, ASO-AuNPs.....	48

## Lista de Tablas

Tabla 1: Lista de patógenos con resistencia antibiótica y sus características .....	15
Tabla 2: Oligonucleótidos antisentido y sus características .....	33
Tabla 3: Longitud de fragmentos de corte por BamHI.....	45

## Abreviaturas

AAC: *N*-acetiltransferasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANT: *O*-nucleotidiltransferasa

APH: *O*-fosfotransferasas

ARN: Ácido ribonucleico

ARN-m: ARN mensajero

ASO: Oligonucleótidos antisentido

AuCl<sub>3</sub>: Cloruro de oro (III)

AuNPs: Nanopartículas de oro

BVDV: Virus de la diarrea viral bovina,

CACT: Translocasa de carnitina-acilcarnitina

DTT: Ditioneitol

EMA: Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

EPS: Exopolisacárido

ESBL: β-lactamasas de amplio espectro

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato dipotásico

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monopotásico

LBSS: Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas

LSPR: Resonancia del plasmón de superficie localizado

MDR: Multidrogo resistente

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato disódico

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monosódico

OD<sub>600</sub>: Densidad óptica a 600 nm

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: Proteína fijadora de penicilina

ppm: Partes por millón

rpm: Revoluciones por minuto.

ssDNA: Cadenas de ADN sencillas

t-FNA: Ácido nucleico de marco tetraédrico

V: Volts

## Resumen

El uso irracional de los antibióticos, prescripciones inapropiadas, aplicación extensiva en la agricultura, la falta de innovación y obstáculos en las aprobaciones regulatorias, ha favorecido el surgimiento de bacterias patógenas con uno o más mecanismos capaces de resistir y sobrevivir a los tratamientos convencionales con antibióticos y, a su vez, transmitir esta capacidad de resistir a otras bacterias, propiciando la capacidad de generar múltiples resistencias hacia los antibióticos. Esto ha llevado a la comunidad científica a desarrollar nuevos tratamientos para combatir de manera más eficiente a las cepas de bacterias multirresistentes.

En el presente trabajo, se decidió utilizar oligonucleótidos antisentido, modificados con un extremo tiol, anclados a nanopartículas de oro ayudarlos a llegar hacia el interior de la célula blanco. Este sistema se pretendió utilizar para la re-sensibilización de bacterias resistentes a antibióticos.

Mediante el uso de diferentes metodologías, se sintetizaron AuNPs con una morfología esférica y un tamaño promedio de 19 nm. Posteriormente los ASO lograron adsorberse sobre la superficie de las AuNPs, manteniendo una morfología esférica y aumentando su tamaño aparente a 21 nm. Aunado a eso, los ASO-AuNPs logran mantenerse estables en solución a una concentración de 0.1 M de NaCl.

Utilizando el plásmido pSK9065, se transformó la *E. coli* DH5 $\alpha$  y se obtuvo una cepa transformada con la capacidad de resistir ampicilina. Se determinó la concentración mínima inhibitoria de esta cepa y se obtuvo un valor de 32,768 ppm de ampicilina.

Posterior a la obtención de los ASO-AuNPs y la concentración mínima inhibitoria de ampicilina, se probaron diferentes combinaciones de concentraciones de ASO-AuNPs con ampicilina y ver el efecto que poseía en el crecimiento de nuestra cepa transformada. Los ASO-

AuNPs, en concentraciones de 0.125 - 0.5  $\mu$ M de ASO y 0.05 - 0.2 nM de AuNPs, en combinación con 10,000 ppm de ampicilina, no lograron inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* PSK. De acuerdo con la literatura, estos resultados pueden atribuirse a diferentes causas: La cantidad de oligonucleótidos adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula y la estabilidad coloidal de las nanopartículas.

A pesar de los resultados obtenidos, se espera poder mejorar las diferentes metodologías utilizadas y poder conseguir una nueva arma en el combate contra la resistencia a antibióticos.

# Capítulo 1

## 1. Introducción

### 1.1 La crisis de salud

Desde su descubrimiento, los antibióticos han sido una de las mejores armas para combatir las infecciones bacterianas, salvando millones de vidas en el proceso. Lamentablemente, el uso irracional de los antibióticos, prescripciones inapropiadas, aplicación extensiva en la agricultura, la falta de innovación y obstáculos en las aprobaciones regulatorias, ha favorecido el surgimiento de bacterias patógenas con uno o más mecanismos capaces de resistir y sobrevivir a los tratamientos convencionales con antibióticos y, a su vez, transmitir esta capacidad de resistir a otras bacterias (Medina & Pieper, 2016; Ventola, 2015).

Con el aumento en casos de infecciones con bacterias multirresistentes a antibióticos, el mundo se encuentra en una crisis de salud. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos con diferentes resistencias a antibióticos que son prioritarios por su capacidad de encontrar nuevos mecanismos para resistir a más antibióticos (Tabla 1) (World Health Organization [WHO], 2017).



**Tabla 1: Lista de patógenos con resistencia antibiótica y sus características**

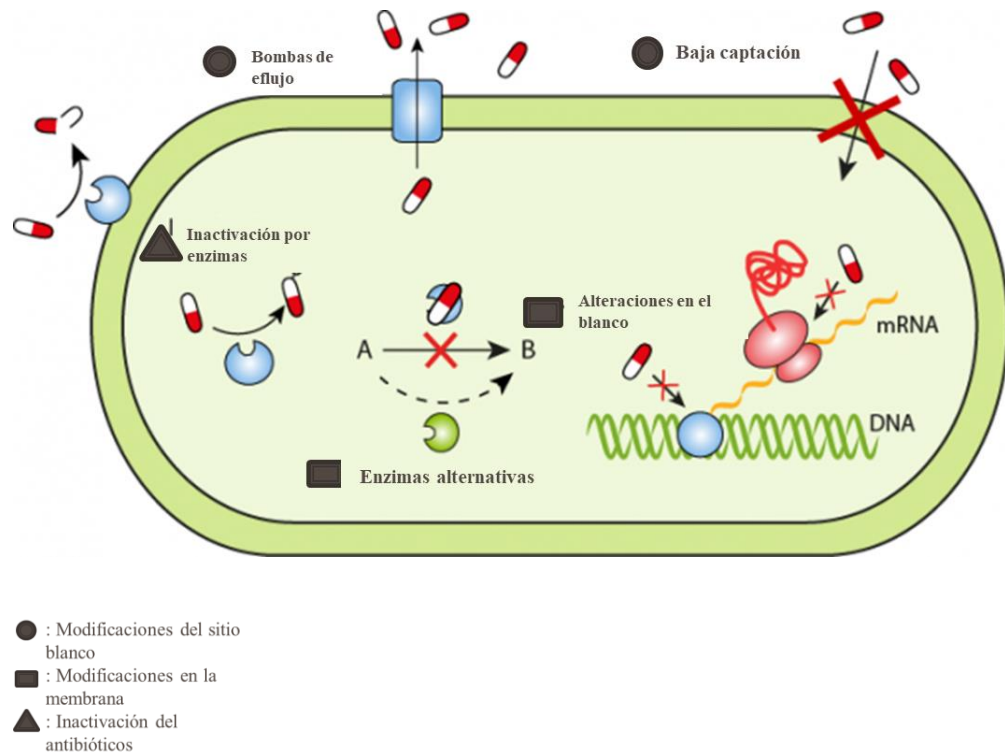
Prioridad	Bacteria	Característica
Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistente a carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Resistente a carbapenémicos
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Resistente a carbapenémicos y productoras de “ESBL”
Alta	<i>Enterococcus faecium</i>	Resistente a vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistente a meticilina y vancomicina
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas
Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No susceptible a penicilinas
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Resistente a ampicilina

ESBL:  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro

## 1.2. Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia a antibióticos más comunes son: las modificaciones mediante enzimas al antibiótico; alteraciones en la permeabilidad de la membrana, como transportadores de eflujo y porinas; y modificaciones en sitio de unión (figura 1) (Blair,

Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015; Kapoor, Saigal, & Elongavan, 2017; Mulani, Kamble, Kumkar, Tawre, & Pardesi, 2019).



**Figura 1: Clasificación de los mecanismos de resistencia a antibióticos.** Los mecanismos de resistencia a antibióticos más comunes son la modificación enzimática del antibiótico, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, y la modificación del sitio de unión

### 1.2.1. Modificación enzimática

Debido a que muchas bacterias producen enzimas que modifican irreversiblemente los antibióticos, este mecanismo es uno de los más importantes a combatir. Existen dos caminos para inactivar antibióticos mediante enzimas: degradación del fármaco y transferencia de grupos funcionales (Reygaert, 2018; Santajit & Indrawattana, 2016).

#### 1.2.1.1 Degradación del antibiótico

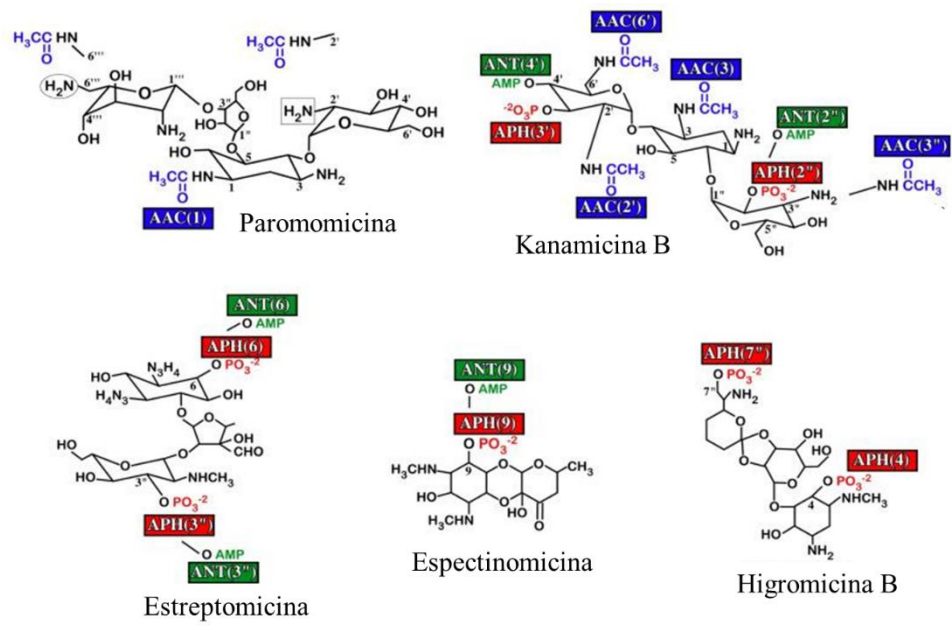
Uno de los ejemplos más recurrentes en la literatura sobre enzimas degradadoras de antibióticos son las  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas tienen la capacidad de degradar el anillo  $\beta$ -

lactámico mediante una hidrólisis y evitar así que el antibiótico cumpla su función (Fisher & Mobashery, 2014; Rice, 2012).

Las metalo- $\beta$ -lactamasas (en especial la enzima metalo- $\beta$ -lactamasa (NDM-1)) son una sub-clasificación de las  $\beta$ -lactamasas que preocupan a la comunidad científica, ya que tienen la capacidad de hidrolizar a los antibióticos carbapenémicos, siendo estos considerados antibióticos de último recurso. Estas enzimas se caracterizan por estar presentes en bacterias que poseen resistencia a “todo tipo de antibióticos”, limitando las posibilidades de supervivencia de los pacientes que lleguen a infectarse con estos microorganismos patógenos (Boyd, Livermore, Hooper, & Hope, 2020; Ventola, 2015; Z. Wang, Fast, Valentine, & Benkovic, 1999).

#### 1.2.1.2 Transferencia de grupos funcionales

Otro de los diferentes mecanismos que han encontrado los microorganismos para inactivar antibióticos, es mediante la transferencia de grupos funcionales. Uno de los ejemplos más interesantes, presentes en la literatura es la llamada familia “enzimas modificadoras de aminoglucósidos” (EMA). Las EMA se clasifican dependiendo del grupo funcional que se transfiera sobre los diferentes aminoglucósidos: un grupo acetyl (AAC), un grupo monofosfato de adenosina (ANT) o un grupo fosfato (APH) (figura 2)(Garneau-Tsodikova & Labby, 2016; Ramirez & Tolmasky, 2010; Wright, 1999).



**Figura 2: Las modificaciones estructurales de aminoglucósidos causados por las EMAs.** Las EMAs se clasifican y nombran dependiendo de: 1) la estructura del aminoglucósido y 2) la modificación realizada. En la imagen, los recuadros de colores representan a las EMAs. Adaptado de: Ramirez & Tolmasky, 2010.

Dentro de la familia de las EMAs, la enzima bifuncional AAC (6'')-Ie/APH (2'') es aquella que más atención ha recibido por parte de la comunidad científica ya que es capaz de conferir resistencia a un amplio espectro de aminoglucósidos (Goudarzi et al., 2019; Mahdiyoun, Kazemian, Ahanjan, Hourri, & Goudarzi, 2016; Rouch, Byrne, Kong, & Skurray, 1987; Schwarz, Kadlec, & Strommenger, 2008).

1.2.2 Modificación de la membrana

Otro mecanismo que utilizan las bacterias para resistir el efecto antibacteriano de algunos fármacos es reducir la acumulación de fármacos en su interior a través de modificaciones de la membrana, como alteraciones en las porinas o bombas de eflujo.

### 1.2.2.1 Porinas

Las porinas son proteínas que, naturalmente, se encuentran en la membrana de muchos microorganismos, siendo más comunes en bacterias Gram negativas. Su función es ser canales que permitan la difusión pasiva de nutrientes para el microorganismo y moléculas con un rango de tamaño específico. Pueden ser clasificadas, dependiendo de su actividad en la regulación intracelular, en específicas y no específicas. Una modificación en la estructura o la regulación de su expresión de las porinas puede conferir resistencia a una gran cantidad de antibióticos (Blair et al., 2015; Choi & Lee, 2019; Impey, Hawkins, Sutton, & Soares da Costa, 2020; Lucía & W., 2012; Santajit & Indrawattana, 2016; Vergalli et al., 2020).

En los últimos años, diferentes aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* han presentado una alta resistencia a la familia de los carbapenémicos ( $\beta$ -lactámicos de último recurso) mediante una disminución de la expresión de la porina OprD (Chalhoub et al., 2016; Noori et al., 2019; Uppalapati, Sett, & Pathania, 2020).

### 1.2.2.2 Bombas de eflujo

Al igual que las porinas, las bombas de eflujo son otro tipo de proteínas de membrana utilizadas para la regulación del contenido intracelular mediante la expulsión de compuestos tóxicos para la célula, incluyendo a diferentes compuestos antimicrobianos y antibióticos. (Santajit & Indrawattana, 2016). Existen seis grandes familias de bombas de eflujo: “ATP-binding cassette” (ABC), “major facilitator superfamily” (MFS), “small multidrug resistance” (SMR), “resistance nodulation division” (RND), “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) y “proteobacterial antimicrobial compound efflux” (PACE). (Blair, Richmond, & Piddock, 2014; Sun, Deng, & Yan, 2014).

Algunos de los patógenos prioritarios listados por la OMS, han encontrado formas de resistir a los antibióticos mediante bombas de eflujo, tales como: NorA, perteneciente a la familia de las MFS en *Staphylococcus aureus*; el sistema de eflujo MexAB-OprM, de la familia

RND, que se encuentra en *Pseudomonas aeruginosa*; y el sistema de eflujo AcrAB–TolC, perteneciente a la familia RND, normalmente encontrado en *Escherichia coli* (Lamut, Peterlin Mašič, Kikelj, & Tomašič, 2019; Spengler, Kincses, Gajdács, & Amaral, 2017). Dada su naturaleza, estos sistemas de eflujo atraen la atención de la comunidad científica ya que contribuyen al desarrollo de multirresistencias a varias familias de antibióticos, incluyendo: tetraciclinas, puromicina,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, macrólidos, quinolonas y rifampicina (Fayyazi, Halaji, Sadeghi, & Havaei, 2020; Hassanzadeh, ganjloo, Pourmand, Mashhadi, & Ghazvini, 2020; Hassuna, Darwish, Sayed, & Ibrahim, 2020; Nobuhisa et al., 2000; Schuldiner, 2018).

### 1.2.3 Modificación del sitio de unión

Para sobrevivir, algunas bacterias pueden desarrollar resistencia al modificar el sitio al que se dirige el antibiótico (Munita & Arias, 2016; Reygaert, 2018). Uno de los ejemplos más importantes y reconocidos por la comunidad científica es la resistencia a la meticilina presente en cepas de MRSA. Esta resistencia está dada por el gen *mecA*, que consiste en la síntesis de proteínas de unión que poseen baja afinidad a las penicilinas (PBP 2a), impidiendo la inhibición en la síntesis de peptidoglicanos de la pared celular provocada por la meticilina, dándole además, inmunidad a un amplio espectro de la familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Munita & Arias, 2016; Sauvage, Kerff, Terrak, Ayala, & Charlier, 2008).

De manera similar, diferentes cepas del género *Enterococcus* han desarrollado mecanismos de resistencia a glicopéptidos, especialmente a vancomicina. Uno de los operones más reconocidos es *vanA*. Este operón consta de un grupo de genes que reemplazan el residuo D-Ala D-Ala, que posee afinidad con la vancomicina, por el residuo D-Ala D-Lac, impidiendo la inhibición en la síntesis del peptidoglicano provocado por este fármaco (Cetinkaya, Falk, & Mayhall, 2000; García-Solache & Rice, 2019).

Retomando el problema planteado al principio de este capítulo, el uso inapropiado de los antibióticos ha propiciado el surgimiento de microorganismos con la capacidad de resistir a los tratamientos con antibióticos, estos microorganismos son conocidos como: bacterias multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pan-resistentes (PDR), siendo estas últimas las más peligrosas porque poseen resistencia a todo tipo de antibióticos, llevando a los antibióticos lentamente hacia la obsolescencia. Esto ha llevado a la comunidad científica al desarrollo de nuevos tratamientos para combatir de manera más eficiente a las cepas de bacterias multirresistentes.

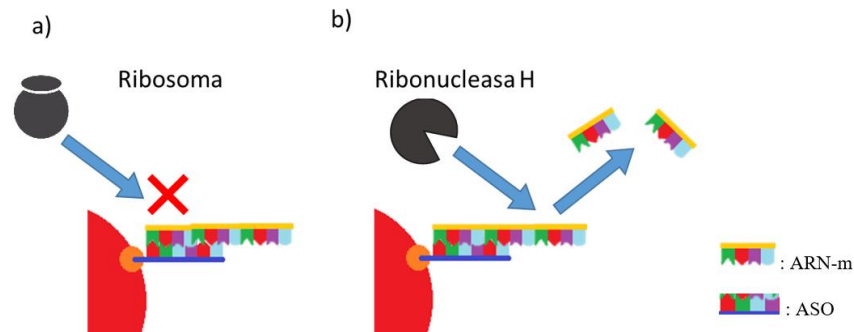
### 1.3 Desarrollo de nuevos tratamientos

Dentro de las nuevas estrategias de tratamientos antibacterianos más prometedoras se encuentran los péptidos antimicrobianos, nanopartículas orgánicas (micelas, liposomas) y metálicas (Ag, Cu, Ni y Zn), tratamientos combinatorios entre antibióticos con nanotecnologías (nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas, etc.), terapia de fagos y oligonucleótidos antisentido (Aslam et al., 2018; Cheng, Williamson, & Zheng, 2019; Laws, Shaaban, & Rahman, 2019; León-Buitimea, Garza-Cárdenas, Garza-Cervantes, Lerma-Escalera, & Morones-Ramírez, 2020; Petchiappan & Chatterji, 2017; Rodrigues, McBride, Hullahalli, Palmer, & Duerkop, 2019; Rojas-Aguirre, Aguado-Castrejón, & González-Méndez, 2016; X.-Y. Xue et al., 2018).

#### 1.3.1 Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido (ASO) son ácidos nucleicos cortos de cadena sencilla (longitud entre 13-30 pares de bases) que tienen complementariedad con moléculas de ARN-m (Hegarty & Stewart, 2018; Meng et al., 2015). En bacterias, los ASO se presentan como un mecanismo natural para la regulación de proteínas metabólicas y factores de virulencia (X.-Y. Xue et al., 2018).

El mecanismo de acción de los ASO consiste en apareamiento específico de bases vía Watson-Crick con un ARN-m complementario. Este apareamiento conlleva a la inhibición de los procesos de traducción por el impedimento estérico con el ribosoma; además, induce la degradación de la cadena de ARN-m por ribonucleasa H, que degrada solo el ARN-m del complejo ARN-m-ASO (figura 3) (Chan, Lim, & Wong, 2006; Hegarty & Stewart, 2018; Z. Liu & Corey, 2019).



**Figura 3: Mecanismo de acción de los ASO.** Los ASO poseen 2 mecanismos de acción en la inhibición de la traducción de proteínas: a) Impedimento estérico con el ribosoma y b) Inducción de la degradación del ARN-m del complejo ARN-m-ASO.

Esta tecnología tiene el potencial de aplicarse en tratamientos para evitar la replicación de virus, tratamientos contra cáncer, biomarcadores, y destacando su uso en la regulación de genes de resistencia a antibióticos en bacterias patógenas para re-sensibilizarlos a estos (Kapoor, 2019; Meng et al., 2015; H. Wang et al., 2010; Xu, Zhang, & Zhang, 2018).

Utilizar los ASO para la regulación de genes y re-sensibilización a resistencias trae varias ventajas contra los tratamientos convencionales con antibióticos, incluyendo: 1) facilidad de diseño, 2) sitios blanco específicos y 3) baja probabilidad de generar resistencia a los ASO (Meng et al., 2015; X.-Y. Xue et al., 2018). A pesar del gran potencial de los ASO, aún hay dificultades para la aplicación práctica de este sistema, siendo la internalización a la célula blanco, la principal de estas (Chopra, 1999; Hegarty & Stewart, 2018; Stach & Good, 2011; X.-Y. Xue et al., 2018).



Diferentes estrategias se han utilizado para mejorar la internalización intercelular de los ASO, incluyendo la modificación química de: el esqueleto de los oligonucleótidos, el anillo de ribosa y las bases nitrogenadas que lo componen; por otro lado, utilizar moléculas como transportadores es una de las estrategias más prometedoras (DeLong et al., 2010; Hegarty & Stewart, 2018; Z. Liu & Corey, 2019; Riley & Vermerris, 2017; Roberts, Langer, & Wood, 2020; Stach & Good, 2011; Valsamatzi-Panagiotou, Popova, & Penchovsky, 2020).

### 1.3.1.1 Transportadores de ASO

De los nanomateriales más prometedores como transportadores de ASO, se encuentran los nanotubos de carbono, “quantum dots”, péptidos, nanopartículas magnéticas y metálicas, siendo las nanopartículas de oro (AuNPs) las que atraen el mayor interés (DeLong et al., 2010; Giljohann et al., 2010; Jamdagni, Khatri, & Rana, 2016; Loh & Lee, 2012; Riley & Vermerris, 2017; Tiwari, Vig, Dennis, & Singh, 2011a).

#### 1.3.1.1.1 Nanopartículas de oro

Las AuNPs atraen la atención de la comunidad científica por su gran variedad de características físicas y químicas. Ventajas como, baja toxicidad y biocompatibilidad, la facilidad en su producción y anclaje de moléculas a su superficie por interacciones electrostáticas o covalentes, es lo que las hace atractivas como transporte de distintos compuestos de interés farmacéutico (Han, Ghosh, & Rotello, 2007; Okkeh et al., 2021). Una particularidad de las AuNPs es que poseen una bien establecida química de adsorción con compuestos alcanotiolados, especialmente los grupos tiol. Es por esto que es posible aprovechar el enlace covalente “S-Au”, resultante de la adsorción química de un compuesto modificado con un grupo tiol, para el anclaje de moléculas sintéticas y/o biológicas a las AuNPs (Hurst, Lytton-Jean, & Mirkin, 2006; H. Wang et al., 2010; Y. Xue, Li, Li, & Zhang, 2014). De esta forma, agregando un grupo tiol a uno de los extremos de la cadena de ASO, es posible anclarlos a las nanopartículas de oro y ayudarlos a llegar hacia el interior de la célula blanco.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se buscará re-sensibilizar a bacterias resistentes a antibióticos mediante oligonucleótidos antisentido anclados, mediante un grupo tiol, a nanopartículas de oro.

## Capítulo 2

### 2. Antecedentes

Desde la primera aplicación en 1978, los ASO aun enfrentan complicaciones para su aplicación práctica; sin embargo, hasta la fecha, muchos estudios se han publicado demostrando la efectividad de los ASO para controlar la expresión génica. Como primer ejemplo, se encuentra el trabajo de Good y colaboradores, quienes sintetizaron un péptido anclado a un PNA antisentido (ácido peptidonucleico) para impedir la síntesis de la proteína Acp (proteína esencial en la biosíntesis de ácidos grasos), logrando inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* K-12. Además, determinaron que el sistema no presenta toxicidad a concentraciones menores a 2  $\mu$ M de PNA en células HeLa infectadas con *E. coli* K12 (Good, Awasthi, Dryselius, Larsson, & Nielsen, 2001).

Recientemente, Zhang y colaboradores utilizaron un PNAs antisentido, anclado a nanoestructuras tetraédricas de ADN como sistema de entrega, para la inhibición del crecimiento de MRSA mediante el silenciamiento génico de la proteína FtsZ, proteína esencial para la división y viabilidad bacteriana. Este sistema logró disminuir la expresión de la proteína FtsZ en una concentración dependiente de la presencia de los PNAs. Además, estos autores sugieren que el uso de estos sistemas podría ser la base para el desarrollo de nuevos tratamientos contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Yuxin Zhang et al., 2018). Años más tarde, Zhang y colaboradores lograron disminuir la producción de biopelícula en *Streptococcus mutans*. Para esto utilizaron un sistema de ASO, anclado a una estructura de t-FNA (ácido nucleico de marco tetraédrico), dirigido a genes involucrados en la producción de exopolisacárido (EPS), que es un precursor en la síntesis de biopelícula. Con una

concentración de 750 nM de ASO-tFNA, estos investigadores lograron reducir significativamente la síntesis del EPS, y por defecto la calidad de la biopelícula generada por *S. mutans* (Yuxin Zhang et al., 2020).

Por otra parte, diferentes estudios se han publicado en donde se aprovechan de las propiedades fisicoquímicas de las AuNPs para utilizarse como nanovehículos para la entrega de ASO. Por ejemplo, Ekin y colaboradores desarrollaron un sistema de entrega de AuNPs funcionalizadas con el micro ARN Hsa-miR-145 (supresor tumoral que se encuentra inhibido en ciertas células cancerígenas). La transfección del sistema en las líneas celulares PC3 (células de cáncer de próstata) y MCF-7 (células de cáncer de mama) conlleva a un incremento en la expresión del supresor tumoral (Ekin, Karatas, Culha, & Ozen, 2014).

De manera similar, Ghaffari y colaboradores sintetizaron un PNA antisentido anclado a AuNPs para inhibir la replicación del BVDV (virus de la diarrea viral bovina, el cual es similar a Hepatitis C), en células MDBK (células de riñón de ganado). Determinaron que las nanopartículas de oro lograron internalizar de manera eficiente el PNA y evitar la replicación del BVDV en células MDBK (Ghaffari, Rezatofighi, Ardakani, & Rastegarzadeh, 2019). Además, concluyen que este sistema puede ser extrapolado para el tratamiento de la Hepatitis C debido a que está relacionado al virus MDBK.

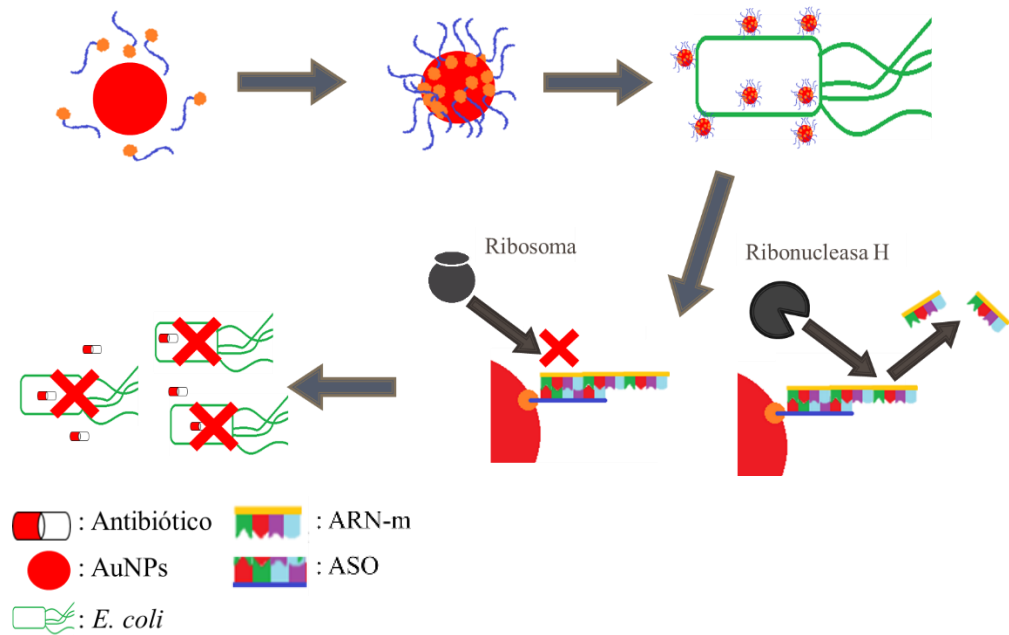
Más recientemente, en nuestro grupo de investigación, Alishah Aratboni desarrolló un sistema de control de silenciamiento génico mediante ASO conjugados a un nanovehículo conformado por cadenas de ADN sencillas (ssDNA) ancladas mediante extremos tioles a AuNPs. Este sistema fue aplicado en *Chlamydomonas reinhardtii* para estimular la acumulación de ácidos grasos, mediante el silenciamiento de la proteína CACT (Translocasa de carnitina-acilcarnitina), proteína involucrada en el transporte de los ácidos grasos hacia la mitocondria, para que los ácidos grasos sean convertidos en energía para la célula. El silenciamiento génico de la proteína CACT lleva a una acumulación de ácidos grasos dentro

de la célula que pueden ser extraídos y usarse como precursores para biocombustibles (Alishah Aratboni, 2020).

Finalmente, es posible encontrar en la literatura científica la aplicación de los ASO para el control de expresión de genes de resistencia, como el caso de Morse y colaboradores quienes desarrollaron un conjunto de ASO para evitar el crecimiento de *Pichia pastoris* y *Pseudomonas putida*, silenciando genes de resistencia a zeocina y kanamicina para su posible tratamiento en la desinfección de agua industrial y potable (Morse, Morey, & Gunsch, 2010). Por otro lado, Wang y colaboradores sintetizaron un liposoma para encapsular y transportar ASO para inhibir la expresión del gen *oprM* en *Pseudomonas aeruginosa*. *oprM* es un gen que codifica una bomba de eflujo contra múltiples antibióticos. Este tratamiento redujo significativamente la MIC (Concentración mínima inhibitoria) de las cepas contra los 5 antibióticos más comúnmente utilizados contra esta bacteria desde un rango entre 4-1024  $\mu\text{g/mL}$  hasta 0.5-64  $\mu\text{g/mL}$  (H. Wang et al., 2010). De manera similar, Meng y colaboradores diseñaron un sistema de entrega de ASO mediante liposomas aniónicos dirigidos contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina. Estos ASO estaban dirigidos al gen *mecA*. El tratamiento de los ASO encapsulados en el liposoma mostró una reducción en las MICs de distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (oxacilina, flucloxacilina, piperacilina, cefalotina, cefoxitina y cefoperazona) desde 16 – 1024  $\mu\text{g/mL}$  hasta 0.13 - 64  $\mu\text{g/mL}$  (Meng et al., 2015). Además, estos tratamientos logran aumentar el porcentaje de supervivencia en un modelo de infección en ratones hasta en un 60%.

Finalmente, Beha y colaboradores, utilizan AuNPs como un vehículo para transportar ASO dirigidos al gen *mecA* en MRSA. La administración de este sistema en MRSA resultó en un silenciamiento de hasta el 74 % del gen *mecA*. El tratamiento a MRSA, en presencia de oxacilina, un antibiótico  $\beta$ -lactámico, mostró una disminución en el crecimiento bacteriano de hasta 71% (Beha, Ryu, Kim, & Chung, 2021).

Con el panorama presentado en la introducción y antecedentes, es posible asumir que el sistema que se pretende utilizar en este proyecto conformado por oligonucleótidos antisentido, dirigidos a genes de resistencia, y nanopartículas de oro, podrá ser utilizado para resensibilizar bacterias resistentes a antibióticos y, una vez que estas bacterias vuelvan a ser sensibles, serán susceptibles a estos antibióticos. A continuación, se presenta un esquema general del proyecto y como funcionará el sistema propuesto (figura 4).



**Figura 4: Esquema general del sistema propuesto.** Agregando un extremo tiol a los ASO, estos pueden anclarse a AuNPs y dirigirse hacia *E. coli* para resensibilizarla hacia antibióticos. Finalmente, cuando el antibiótico se ponga en contacto con *E. coli* tratada con el sistema propuesto, *E. coli* no podrá resistir al antibiótico.

## Capítulo 3

### 3. Hipótesis y objetivos

#### 3.1 Hipótesis

La combinación del oligonucleótido antisentido, dirigido al gen *ampR*, y nanopartículas de oro, dirigidos a *Escherichia coli* resistente, re-sensibilizarán la cepa a ampicilina.

#### 3.2 Objetivo general

Anclar oligonucleótidos antisentido, dirigidos al gen *ampR*, a nanopartículas de oro, dirigirlos a *Escherichia coli* resistente a ampicilina y cuantificar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina en presencia y ausencia del tratamiento propuesto.

#### 3.3 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar AuNPs .
2. Diseñar la secuencia de ASO dirigida al gen *ampR*.
3. Recubrir las AuNPs con los ASO y caracterizarlos.
4. Transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pSK9065, que contiene el gen *ampR*, para generar resistencia a ampicilina
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria de ampicilina en *E. coli* resistente en presencia y ausencia del sistema ASO-AuNPs.

### 3.4 Metas

- Terminar la maestría en tiempo y forma.



## Capítulo 4

### 4. Materiales y metodología

#### 4.1 Materiales y equipos

El material y los equipos que se emplearon se encuentran disponibles en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología: micropipetas de volumen variable (0.1-10, 2 – 20, 10 – 100, 20 – 200 y 100 – 1000  $\mu\text{L}$ , Eppendorf); incubadora con agitación (Lab. companion); incubadora estática (Lab companion); centrífuga de piso (Thermo Scientific) equipada con un rotor para tubos de 1.6, 5 y 50 mL (Fiberlite); microcentrífuga (Ohaus), microondas (Everstar), horno de secado (Shield Lab), espectrofotómetro (Opizen PLUS, Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer), autoclave (All american), campana de flujo laminar (Labconco), refrigerador 4°C/Congelador -20°C (Norlake scientific), equipo de electroforesis (miniPCR), balanza analítica (AND), y balanza granataria (Ohaus). El material de vidrio utilizado fue el siguiente: Matraz Erlenmeyer de vidrio 125, 250, 500 y 1000 mL (Kimax), vaso de precipitado de 250, 500, 1000 y 2000 mL (Pyrex).

Los siguientes consumibles fueron empleados en el presente proyecto: tubos de 0.2, 0.6 y 1.6 mL (SSI), tubos para centrífuga de 15 y 50 mL (Corning), puntillas para micropipetas de volumen variables 0.1-20  $\mu\text{L}$ , 1-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  (SSI) (Corning), columnas NAP<sup>TM</sup>-5 Sephadex (cytiva).

Los reactivos necesarios que se utilizaron en el proyecto fueron: medios de cultivo LB Miller(Difco), agar bacteriológico (BD, Bioxon), secuencias de ASO, plásmidos, solución

salina tamponada con fosfato (PBS), agua ultrapura (18 MΩ), fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cloruro de oro (III) (AuCl<sub>3</sub>), citrato de sodio, fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), fosfato monosódico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ditiotreitól (DDT), ampicilina. Todos los reactivos fueron proporcionados por las empresas: Proveedores CTR, Biobasic y Addgene.

## 4.2 Cepas bacterianas

La cepa de *Escherichia coli* DH5α se obtuvo por cortesía del Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas (LBSS). Para la obtención de la cepa resistente a ampicilina de *E. coli*, se utilizó *E. coli* DH5α y se transformó con el plásmido pSK9065 (anexo 1). Todas las pruebas realizadas con *E. coli* DH5α y *E. coli* resistente a ampicilina se realizaron en medio LB Miller (Difco).

## 4.3 Metodología

### 4.3.1 Diseño de secuencias

Las secuencias de ASO se diseñó usando los programas: SnapGene viewer (<http://www.snapgene.com/>), IDT OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>), NUPACK (<http://www.nupack.org/>) UCSC In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Todas las secuencias necesarias fueron consultadas en las bases de datos del “genbank” del NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). La compañía donde se mandaron a sintetizar el ASO, dirigido al gen *ampR*, fue en Biobasic (<https://www.biobasic.com/us/>).

#### 4.3.1.1 Diseño de los ASO

Se diseñaron los ASO con una metodología similar al protocolo de Hoynes-O'Connor y colaboradores. A manera de resumen, la metodología consiste en la selección de los primeros 8 codones codificantes de la enzima, para posteriormente, verificar que los ASO tengan un

porcentaje mayor al 85% de hibridación con el ARN-m blanco y menor al 85% en zonas no deseadas (Hoyne-O'Connor & Moon, 2016). Esto último se realizó con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que los ASO no hibriden en zonas no deseadas del ADN genómico y plasmídico de *E. coli*.

#### 4.3.1.1.1 Secuencia de ASO utilizada

El ASO fue adquirido de Biobasic (Canadá) y su secuencia se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Oligonucleótido antisentido y sus características

Oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño (bp)	Modificación
<i>ampR</i>	GACACGGAAATGTTGAATACTCAT	24	5`SH C6, Poly A spacer

#### 4.3.2 Obtención de cepas resistentes

Se utilizó la técnica de electroporación para la transformación de las cepas resistentes y la propagación de los plásmidos. Para esto, se siguió la metodología propuesta por Tu y colaboradores con ligeras modificaciones (Tu et al., 2016).

##### 4.3.2.1 Preparación y transformación de bacterias electrocompetentes

Para la preparación de células electrocompetentes se obtuvo un cultivo “overnight”, haciendo un inóculo de 5 mL de medio LB con 20 µL *E. coli* DH5α a 37°C, 150 rpm durante 20 horas. A partir del cultivo “overnight”, se prepararon 5 nuevos inóculos con 1.4 mL de medio LB y 100 µL del cultivo overnight, para después ser depositados en tubos de 1.6mL (2 de los tubos se utilizaron para medir la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) y 2 se utilizaron como control de viabilidad) se cultivó de nuevo a 37 °C a 900 rpm en la incubadora de piso. Después de 2 horas de incubación, cuando la OD<sub>600</sub> alcanzó el valor de 0.6, las células se centrifugaron

a 9000 rpm a 24 °C por 2 min para después descartar el sobrenadante y re-suspender las células en 1 mL de agua ultrapura. Este último paso, se repitió una vez más. Posterior al segundo lavado, las células se centrifugaron a 9000 rpm a 24 °C por 2 min para después descartar el sobrenadante y re-suspender las células en 30 µL de agua ultrapura y los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente. Después, se agregaron máximo 300 ng del plásmido pSK9065 para obtener un volumen final de máximo 40 µL. La mezcla de células y ADN se transfirió a una celda de electroporación de 1 mL con separación de 2 mm y se electroporó a 2500 V. Posteriormente, la cubeta se enjuagó con 1 mL de medio fresco para permitir que las células se recuperen mediante incubación a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, el cultivo con células transformadas se sembró en agar LB que contenía una concentración de ampicilina de 100 ppm.

#### 4.3.2.2 Selección de bacterias transformadas

Después del tiempo de incubación, se seleccionaron las colonias aisladas que crecieron en el agar con el ampicilina y se transfirieron, con una asada, a un tubo con 5 mL de medio LB con ampicilina, para su almacenamiento y preservación.

#### 4.3.2.3 Extracción de ADN plasmídico

Después de seleccionar las colonias que crecieron en el agar con antibiótico, se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico mediante el kit de extracción PureLink™ Quick Plasmid Miniprep, siguiendo las indicaciones del fabricante, con el fin de corroborar la integración de éste.

#### 4.3.2.4 Análisis del ADN plasmídico por restricción enzimática y electroforesis

Para caracterizar el plásmido utilizado (pSK9065), se decidió realizar un análisis mediante restricción enzimática utilizando la enzima BamHI, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor de la enzima (Thermo Scientific). Brevemente, se agregaron 16 µL de agua ultrapura, 2 µL buffer 10X BamHI, 1 µL de ADN plasmídico (0,5-1 µg/µL) y BamHI 0,5-2

$\mu\text{L}$ , a un tubo de 0.6 mL; para después incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se inactivó la enzima incubando nuevamente a  $80^{\circ}\text{C}$  por 20 min (“BamHI (10 U/ $\mu\text{L}$ ),” n.d.).

Los plásmidos y sus fragmentos fueron analizados mediante electroforesis en el equipo de miniPCR. Se analizaron empleando un gel de agarosa al 0.7% utilizando buffer TAE 1X para correr la electroforesis, usando una mezcla de 1.5  $\mu\text{L}$  de jugo azul, 1.5  $\mu\text{L}$  de GelRed y 3-5  $\mu\text{L}$  de cada muestra, para ser observado en el quipo donde, sometido a luz ultravioleta, se espera observar la banda correspondiente al plásmido incorporado.

#### 4.3.3 Síntesis de AuNPs

Para la síntesis de AuNPs se siguió una metodología similar a la reportada por Ghaffari y colaboradores. Brevemente, 10 mL de una solución de cloruro de oro (III) ( $\text{AuCl}_3$ ) al 0.01% se lleva a punto de ebullición para, posteriormente, agregar 100  $\mu\text{L}$  de citrato de sodio 10%. La solución cambia de amarillo pálido a un color violeta-rojizo después de 15 min; posteriormente, se deja enfriar a temperatura ambiente y se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$  para su uso futuro. (Ghaffari et al., 2019).

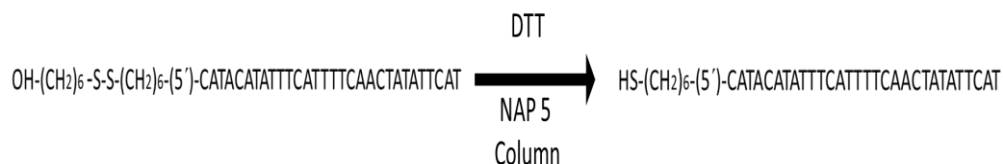
#### 4.3.4 Anclaje de ASO a las AuNPs

Los ASO fueron anclados a las AuNPs mediante una modificación alcanotiol en el extremo 5' del ASO.

##### 4.3.4.1 Reducción y purificación de los ASO

Previo a el anclaje a las AuNPs, se debe reducir el enlace disulfuro, para mantener la forma de tiol activa, presente en la estructura del ASO (figura 5). Para esto, se siguió una metodología similar a la de Hurst y colaboradores con ligeras modificaciones. Brevemente, en un tubo de 0.5 mL se mezclan 52  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, 10  $\mu\text{L}$  de una solución de ASO (100  $\mu\text{M}$ ), 20  $\mu\text{L}$  de DTT (0.5M), 18  $\mu\text{L}$  de PBS (1 M, pH 8). La mezcla resultante se dejó incubar

a temperatura ambiente por 1 h. Pasado el tiempo de reacción, se utilizó una columna NAP5 para purificar los ASO. Una vez obtenida la solución de ASO purificada, se almacenó a -20 °C

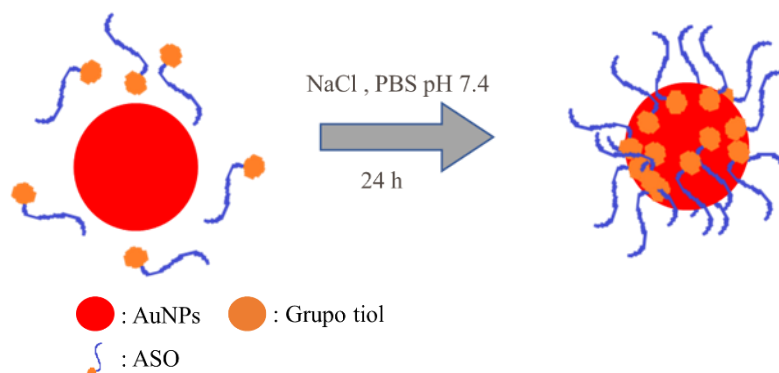


(Hurst et al., 2006).

**Figura 5: Reducción del enlace disulfuro para activar los ASO.** Una vez que se lleve a cabo la reducción del enlace disulfuro, el ASO con el grupo tiol quedarán activos.

#### 4.3.4.2 Conjugación de los ASO a las AuNPs mediante envejecimiento con sal

Para conjugar ASO a la superficie de las AuNP, se siguió una metodología similar a la de Hurst y colaboradores con ligeras modificaciones. La metodología consistió en agregar en un tubo de 15 mL: 60 µL de ASO (concentración final de 2.15 µM), 7000 µL de AuNP (concentración final 2.15 nM). La mezcla resultante se dejó incubar por 16 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se agregaron, por goteo, PBS hasta una concentración de 10 mM (pH 7.4) y NaCl hasta una concentración 50 mM. La mezcla resultante se dejó incubar por 1 hora. Pasado el tiempo de incubación, se incrementó la concentración de sal hasta 100 mM e incubó por 24 h (Hurst et al., 2006). Finalmente se almacenaron las mezclas resultantes a 4 °C para su uso futuro (figura 6).



**Figura 6: Anclaje de los ASO a las AuNPs.** Al mezclar las soluciones de ASO y AuNPs, los ASO se quimisorben sobre las AuNPs mediante la formación de un enlace “S-Au”. Este enlace está formado por el azufre del grupo tiol en el ASO y los átomos de oro en la superficie de la AuNP.

#### 4.3.5 Purificación y caracterización de las AuNPs y ASO-AuNPs

Para el proceso de purificación de AuNPs, se optó por seguir una metodología similar a la de Balasubramanian y colaboradores. Brevemente, 1mL de la solución recién sintetizada de AuNPs se transfirió a un tubo de 1.6 mL para después pasar por varios ciclos de centrifugación. En el primer ciclo, se centrifugó a 7000g por 20 min, pasado ese tiempo un pellet aceitoso de color rojizo de forma, que pasara a llamarse P1, se separa del sobrenadante (S1) y se re-suspende nuevamente en agua ultrapura. S1 se transfiere a un nuevo tubo de 1.6 mL y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones, a partir de ahí se obtendrá un nuevo pellet (P1a) y se descarta el sobrenadante. P1a y P1, se combinarán y comenzará un nuevo ciclo de centrifugación (Balasubramanian et al., 2010). Para el conjugado ASO-AuNPs, se purifica mediante centrifugación a 14,000 g por 20 min. El sobrenadante se separa y se analiza para cuantificar la cantidad de ASO remanente.

Se utilizaron las técnicas de espectroscopia UV-vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar el tamaño y morfología de las AuNPs. A su vez, la conjugación de los ASO sobre las AuNPs, la morfología y el tamaño del ASO-AuNPs se

caracterizó mediante espectroscopia UV-vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM). (Verma, Singh, & Chavan, 2014).

#### 4.3.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MICs) de ampicilina fue determinada de acuerdo con la metodología de dilución en microplaca reportada por la NCCLS. Para la solución de ampicilina se utilizó agua destilada como vehículo en un rango de concentración de 100 – 34,000 ppm. Para la obtención del inóculo se realizó un cultivo “overnight” (20 h de cultivo a 37°C y 150 rpm) para las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y PSK , posteriormente se realizó una dilución 1:250 en medio fresco y se incubó nuevamente hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.2  $\pm$  0.02. El ajuste se realizó con medio LB fresco para obtener un rango de concentración de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> células/mL. A partir de este ajuste, se preparó una dilución 1:100 y se agregaron 100  $\mu$ L a cada uno de los pozos para alcanzar una concentración final de 10<sup>5</sup> células/mL. Después de agregar las células, se adiciono al pozo diferentes cantidades de ampicilina y se aforo el volumen con medio LB hasta completar 200  $\mu$ L. Las microplacas se incubaron por 24 h a 37°C y 150 rpm. Posterior a la incubación se leyó la OD<sub>600</sub> en un lector de microplacas a 600 nm (Garza-Cervantes et al., 2017). La MIC de ampicilina para las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y PSK será aquel valor de concentración del antibiótico en donde se vea suspendido o no sea apreciable el crecimiento de la bacteria en contraste al crecimiento sin antibiótico.

#### 4.3.7 Ensayo de Combinatorias

Este ensayo se utilizó para determinar si el tratamiento de ampicilina, ASO-AuNPs y sus combinaciones tienen algún efecto en el crecimiento de la cepa *E. coli* PSK. Para esta metodología se optó por seguir el protocolo de Meng y colaboradores con ligeras modificaciones. Para la obtención del inóculo se realizó un cultivo “overnight” (20 h de cultivo a 37°C y 150 rpm) para *E. coli* PSK, posteriormente se realizó una dilución 1:250 en medio fresco y se incubó nuevamente hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.2  $\pm$  0.02. El ajuste se realizó con



medio LB fresco para obtener un rango de concentración de  $10^7$  -  $10^8$  células/mL. A partir de este ajuste, se preparó una dilución 1:20 y se agregaron 20  $\mu$ L a cada uno de los pozos para alcanzar una concentración final de  $\sim 10^5$  células/mL, para posteriormente ser mezclados con diferentes concentraciones de ampicilina (10,000 ppm – 34,000 ppm), ASO-AuNPs (0.05 nM – 0.2 nM) y sus combinaciones a una placa de 96 pocillos. Finalmente, se incubaron a 37 °C con una agitación de 150 rpm. El crecimiento de la bacteria fue monitoreado midiendo la OD<sub>600</sub> en el lector de microplaca en distintos tiempos (Meng et al., 2015). ). La mejor combinación entre ampicilina y ASO-AuNPs para las cepa de *E coli* PSK será aquella en la que, con las menores concentraciones posibles de ampicilina y ASO- AuNPs, se observe un crecimiento menor a los tratamientos individuales y al crecimiento máximo de la bacteria

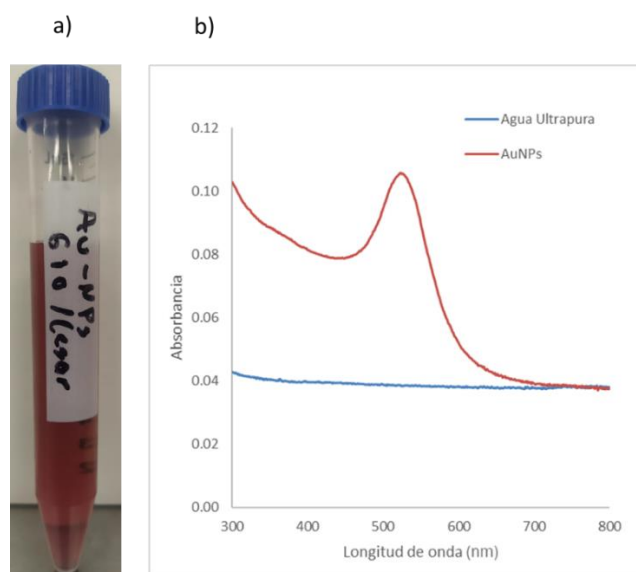
# Capítulo 5

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterización de AuNPs y ASO-AuNPs

#### 5.1.1 Espectro de absorción UV-Visible de AuNPs

Siguiendo el procedimiento descrito en la metodología, se llevó a cabo la reacción de síntesis de AuNPs y se obtuvo la solución mostrada en la figura 7 a). La solución obtenida fue de un color violeta rojizo, lo que es una de las características de las AuNPs. Posterior a la síntesis, se procedió a correr un espectro de absorción en el rango de UV-visible, que se muestra en la figura 7 b). De acuerdo con los datos obtenidos del espectro UV-vis, la solución posee una absorción máxima cerca de los 523 nm.

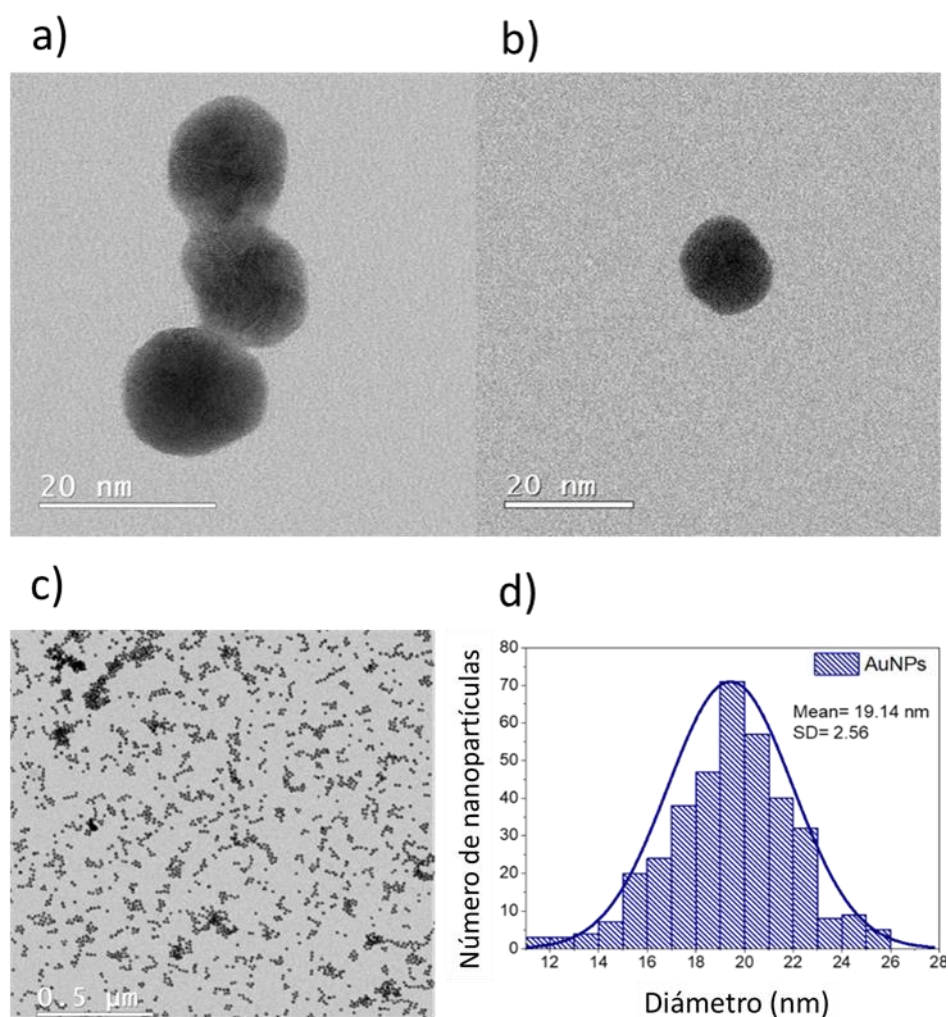


**Figura 7 Solución de AuNPs y espectro de absorción UV-vis.** a) Solución obtenida posterior a la síntesis de AuNPs. b) Espectro de absorción UV-vis de la solución de AuNPs. De acuerdo con la

literatura, el color rojizo de la solución a), posterior a la reacción, es indicador de la presencia de nanopartículas de oro. En la gráfica del espectro de absorbancia, se observa un pico cerca de los 520 nm, indicador de la presencia de AuNPs.

### 5.1.2 Caracterización por TEM de AuNPs

Pasando a la siguiente metodología de caracterización, se obtuvieron imágenes TEM de las nanopartículas de oro (figura 8 a), b) y c) ). A partir de las imágenes, se observó que la morfología de las nanopartículas es esférica; además, se realizó un gráfico sobre distribución de tamaño de las AuNPs (figura 8 d) y se obtuvo que el tamaño promedio de las nanopartículas es  $19.14 \pm 2.56$  nm.

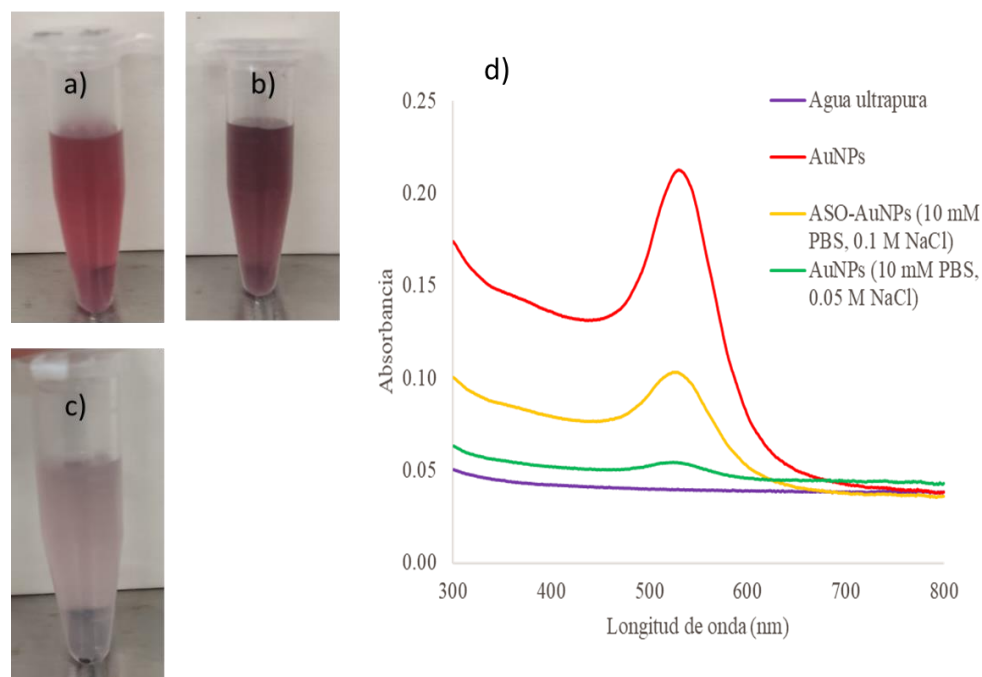


**Figura 8: Micrografías TEM de AuNPs y curva de distribución del tamaño de AuNPs.** Micrografías de las AuNPs previamente sintetizadas a escala de: a) y b) 20 nm, y c) 0.5 μm.; d) histograma de la

distribución de tamaño de AuNPs. A partir de las imágenes 8a y 8b, se puede apreciar la morfología esférica de las nanopartículas.

### 5.1.3 Espectro de absorbanza UV-Visible de AuNPs y ASO-AuNPs

Siguiendo el procedimiento descrito en la metodología, la mezcla resultante de los ASO y las AuNPs (ASO-AuNPs, figura 9 a) y b)) se caracterizó mediante un espectro de absorbanza en el rango de UV-visible (figura 9 d)). A comparación de las AuNPs, se observa una disminución en la absorbanza máxima cuando se forma el conjugado ASO-AuNPs.

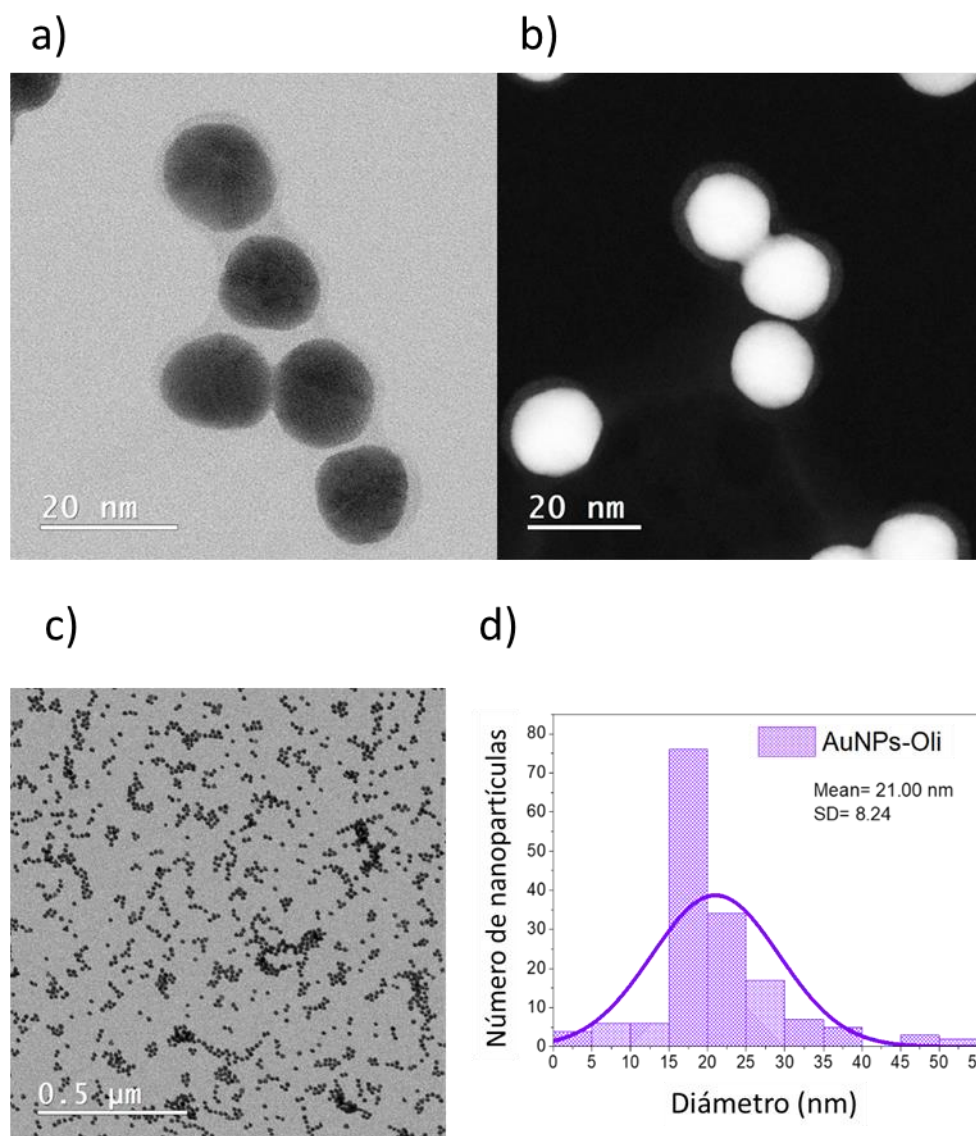


**Figura 9 Soluciones de AuNPs, ASO-AuNPs y espectro de absorbanza UV-vis.** a) Solución de AuNPs sin tratamiento salino, b) Solución de ASO-AuNPs con tratamiento salino, c) Solución de AuNPs con el tratamiento salino y d) Espectro de absorbanza UV-vis de las diferentes soluciones. Después de someter la solución de AuNPs (figura 9 a) al tratamiento salino en presencia de los ASO (figura 9b), se observa un cambio en la coloración y una disminución en la intensidad de la señal en el espectro UV vis, indicador de que la conjugación ha sucedido. Contrario a lo que sucede en la figura 9b), si la solución de AuNPs se somete al tratamiento salino sin los ASO, la solución pierde su color, se forma un precipitado y la señal en el espectro UV-vis disminuye drásticamente, indicando que esta solución ya no es viable para usarse.

### 5.1.4 Caracterización por TEM de ASO-AuNPs

Se obtuvieron imágenes TEM del sistema ASO-AuNPs (figura 10 a), b) y c)). A partir de las imágenes, se observó que la morfología de las ASO-AuNPs se mantiene esférica y aparece un halo alrededor de las nanopartículas, lo que indica la presencia de los ASO y su

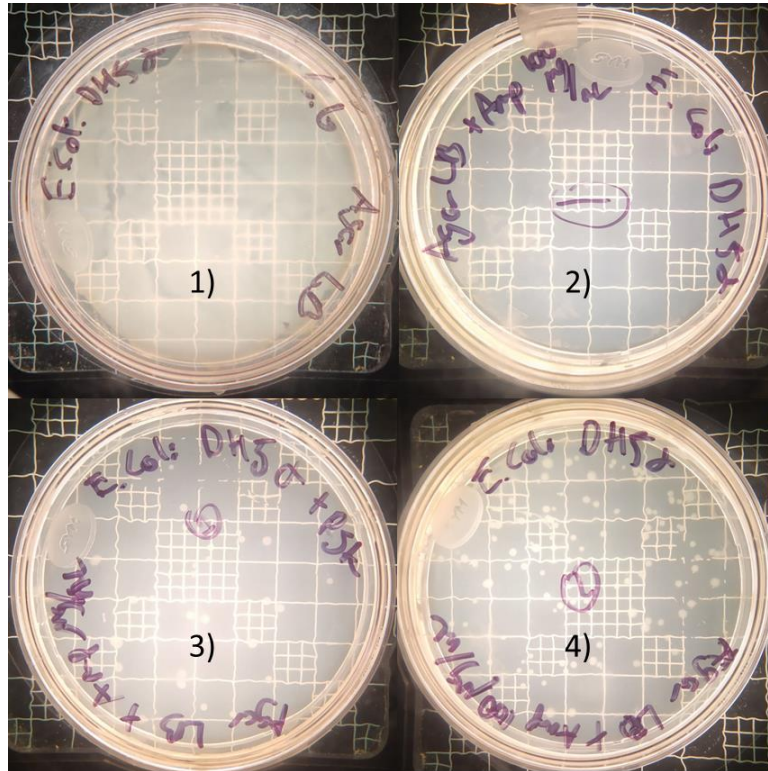
respectiva conjugación sobre la superficie de las AuNPs; además, se realizó un gráfico sobre distribución de tamaño de los ASO-AuNPs (figura 10 d) y se obtuvo que el tamaño promedio de las nanopartículas aumentó a  $21 \pm 8.24$  nm.



**Figura 10: Micrografías TEM de ASO-AuNPs y curva de distribución del tamaño de ASO-AuNPs.** Micrografías de los ASO-AuNPs previamente conjugados a escala de: a) y b) 20 nm, y c) 0.5 μm. d) histograma de la distribución de tamaño de ASO-AuNPs. A partir de las imágenes 10a y 10b se puede apreciar la morfología esférica de las nanopartículas y la aparición de un halo tenue alrededor de las nanopartículas, indicando la presencia de los ASO.

## 5.2 Propagación del plásmido pSK9065

Se procedió a transformar el plásmido pSK9065 (Anexo 1) en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Una vez transformado, se procedió a incubar en placas de agar LB, con ampicilina a 100 ppm, para la obtención de colonias transformadas (figura 11) y, posteriormente, extraer el plásmido pSK9065 y caracterizarlo.



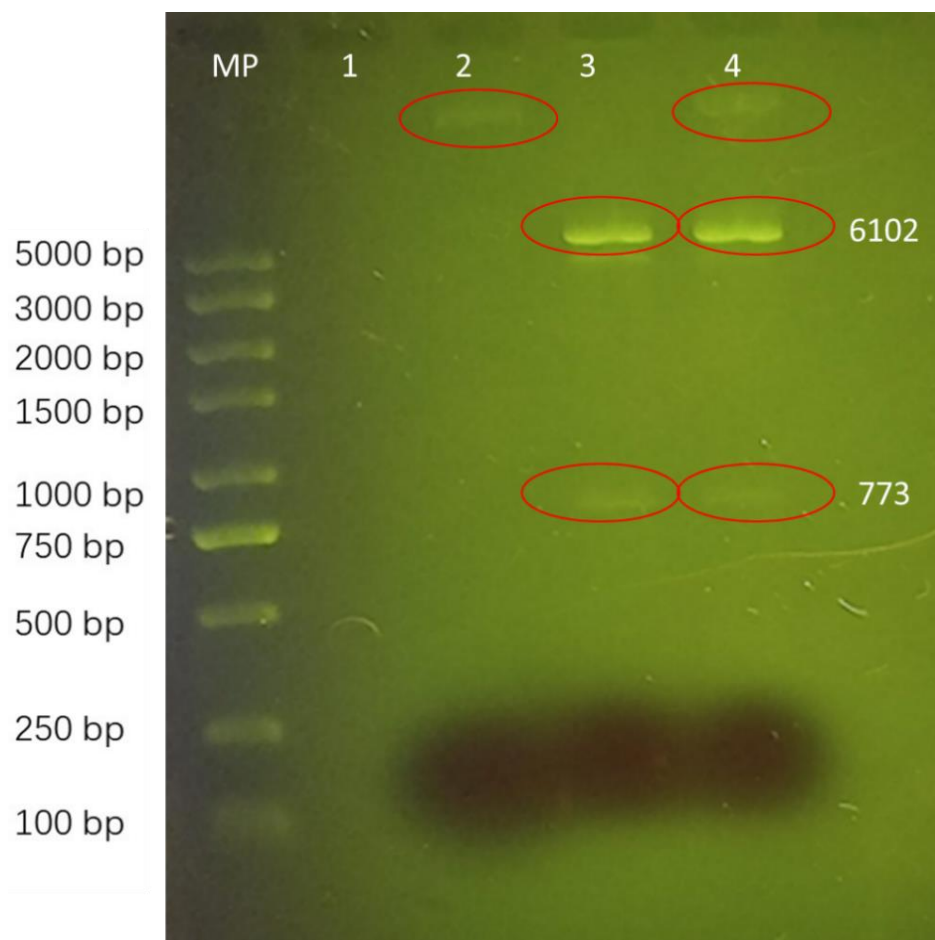
**Figura 11: Colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  en agar LB.** Placas de agar LB con colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$ . 1) *E. coli* DH5 $\alpha$ , 2) *E. coli* DH5 $\alpha$  + ampicilina 100 ppm, 3) y 4) *E. coli* DH5 $\alpha$  + ampicilina 100 ppm + pSK9065. En las figuras 3 y 4 se pueden observar varias colonias de *E. coli* en presencia de ampicilina, indicando que la bacteria se transformó exitosamente.

### 5.3 Caracterización del plásmido pSK9065

Una vez que se obtuvieron suficientes copias del plásmido, se procedió a hacer una restricción enzimática y obtener los fragmentos de pSK9065 (tabla 3) para, posteriormente, ser analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa (figura 12).

**Tabla 3: Longitud de fragmentos de corte por BamHI**

Nucleótido de inicio – Nucleótido Final	Longitud (bp)	Enzima
710 - 6811	6102	BamHI
6812 - 709	773	BamHI

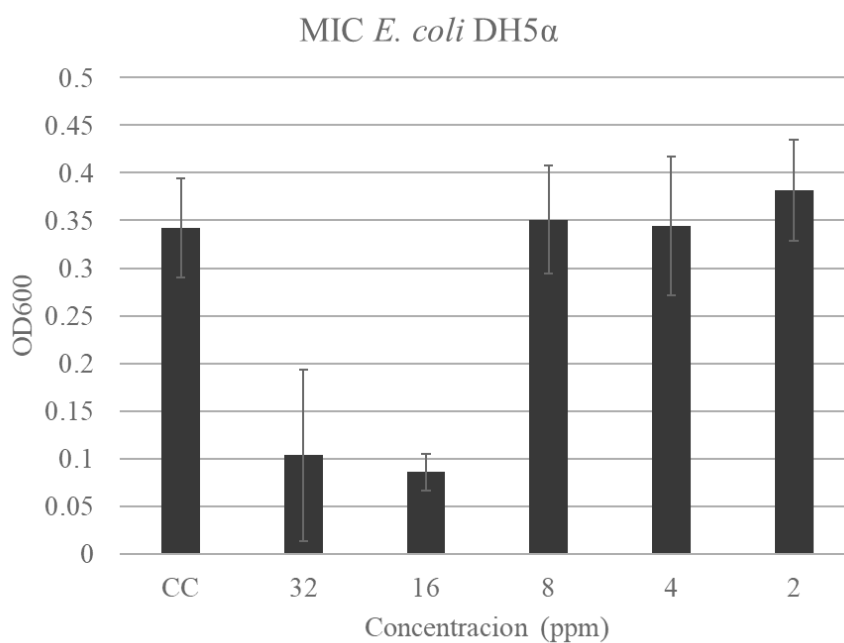


**Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa para el plásmido pSK9065 en *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Gel de electroforesis de la extracción del plásmido pSK9065 en *E. coli* DH5 $\alpha$  y los fragmentos obtenidos por la restricción enzimática. Carriles: MP. - Marcador de peso molecular, 1.- *E. coli* DH5 $\alpha$ , 2.- *E. coli* DH5 $\alpha$  + pSK9065, 3.- Fragmentos de pSK9065 después de la restricción enzimática 4.- Fragmentos de pSK9065 después de la restricción enzimática

### 5.3 Ensayos antimicrobianos

#### 5.3.1 Determinación de la MIC de ampicilina en *E. coli* DH5 $\alpha$ y PSK

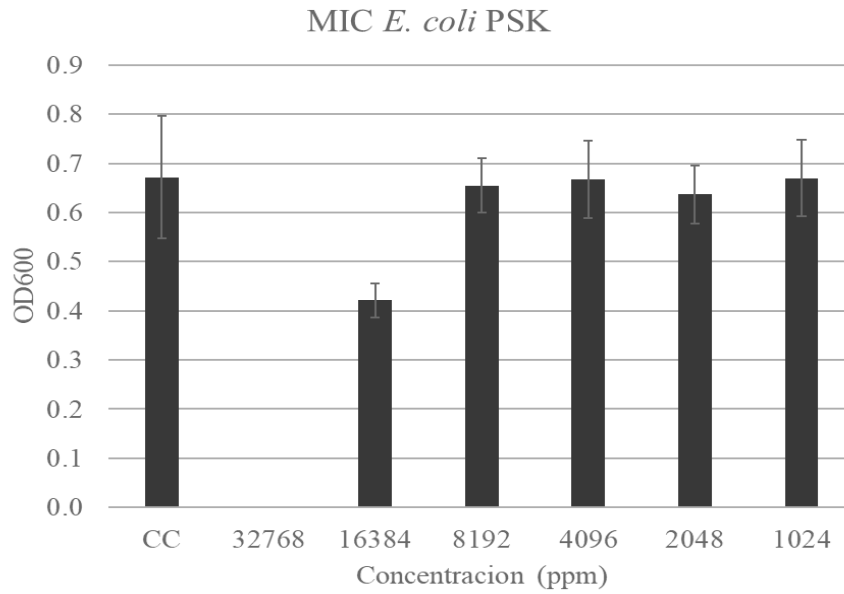
Una vez que se obtuvieron las cepas de *E. coli* resistente (*E. coli* PSK), se procedió a determinar la MIC de ampicilina en *E. coli* DH5 $\alpha$  (figura 13) y PSK (figura 14), obteniendo valores de concentración de 16 ppm y 32,768 ppm de ampicilina, respectivamente.



**Figura 13: Gráfico de concentración mínima inhibitoria de ampicilina *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Se observa que el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  se estanca cuando se expone a una concentración de 16 ppm de ampicilina, con este dato podemos asumir que la MIC de ampicilina para esta cepa es de 16 ppm

CC: Control de crecimiento.





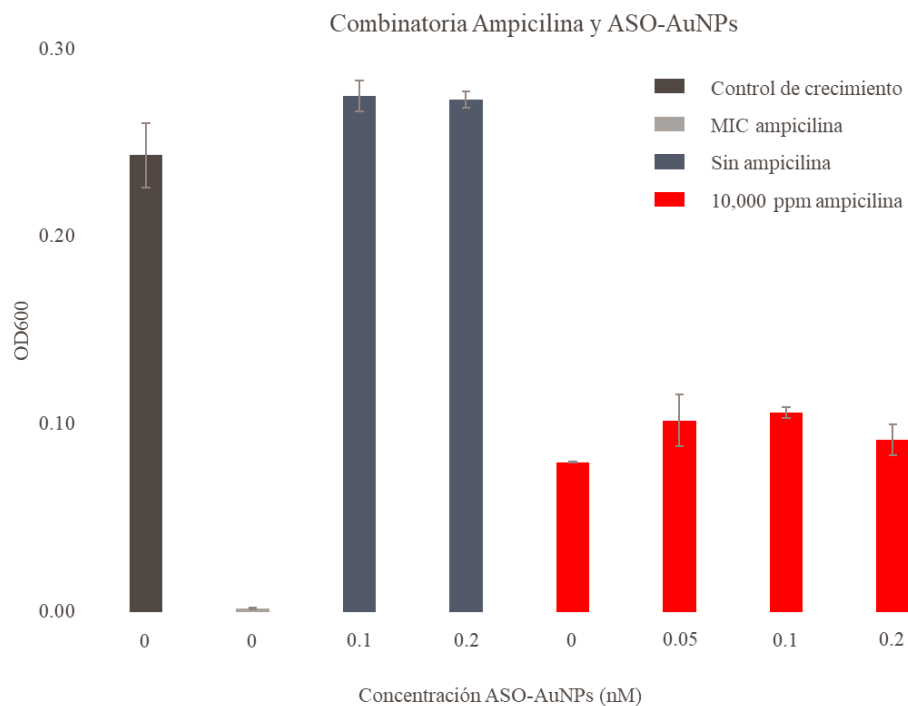
**Figura 14: Gráfico de concentración mínima inhibitoria de ampicilina en *E. coli* PSK.** No se observa crecimiento de *E. coli* PSK cuando se expone a una concentración de 32,768 ppm de ampicilina. Con este dato podemos asumir que la MIC de ampicilina para esta cepa es de aproximadamente 32,768 ppm

CC: Control de crecimiento.

\*MIC: Concentración mínima inhibitoria

### 5.3.2 Combinatoria entre Ampicilina y ASO-AuNPs

Una vez que se obtuvo la MIC de ampicilina en *E. coli* PSK, se procedieron a probar distintas concentraciones de ASO-AuNPs (0.05 - 0.2 nM) y observar el efecto en la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la cepa resistente, obteniendo la figura 15.



**Figura 15: Combinatoria entre diferentes concentraciones de ampicilina y ASO-AuNPs en *E. coli* PSK.** De este gráfico se puede observar que: 1) el conjugado ASO-AuNPs no presenta ningún tipo de actividad antimicrobiana en la cepa *E. coli* PSK y 2) Los ASO-AuNPs, combinados con una concentración sub-inhibitoria de ampicilina, no presenta efecto a comparación de la concentración del antibiótico por si solo

\*MIC: Concentración mínima inhibitoria

\*Amp: Ampicilina

## Capítulo 6

### 6. Discusión y conclusiones

#### 6.1 Discusiones

Como ya se había mencionado con anterioridad, el surgimiento de bacterias patógenas con múltiples resistencias ha puesto al mundo en una crisis de salud, esto ha llevado a la comunidad científica a la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir de manera más eficiente a estos microorganismos. En el presente proyecto se propuso el uso de oligonucleótidos antisentido anclados a nanopartículas de oro como un agente para re-sensibilizar a cepas de *E. coli* resistente.

Para lograr los objetivos propuestos en el presente trabajo, primeramente, se realizaron experimentos para obtener nanopartículas de oro. Como se observó en la figura 7 a), la solución obtenida fue de un color violeta rojizo. De acuerdo con diferentes autores, como Doremus y colaboradores, muestran que, pasado el tiempo de reacción entre  $\text{AuCl}_3$  y citrato de sodio, los tonos de color violetas y rojizos indican la presencia de nanopartículas de oro esféricas con un tamaño superior a los 20 nm (Doremus, 1964). De manera similar, Tyagi y colaboradores reportan que, a diferentes pH y relaciones molares entre  $\text{AuCl}_3$  y citrato de sodio, al finalizar la reacción de síntesis, se observan cambios de tono, pasando de amarillo pálido a rojos o violetas, dependiendo de las condiciones utilizadas (Tyagi, Kushwaha, Kumar, & Aslam, 2016). Con lo anteriormente mencionado, podemos asumir que las soluciones obtenidas contienen nanopartículas de oro, siendo el tamaño la siguiente incógnita.

Una de las formas de poder caracterizar el tamaño y morfología de las nanopartículas de oro, es observar el valor máximo obtenido de un espectro de absorbancia en el rango de UV-visible (Haiss, Thanh, Aveyard, & Fernig, 2007; Pissuwan, Cortie, Valenzuela, & Cortie, 2010). El valor máximo obtenido del espectro de absorbancia es una de las características más interesantes de las nanopartículas, también conocido como resonancia del plasmón de superficie localizado (LSPR). Un plasmón es una oscilación colectiva con cierta frecuencia de los electrones libres presentes en la superficie de los metales. Dado que el tamaño de las nanopartículas es mucho menor que la longitud de onda incidente, ocurre un acoplamiento entre la luz y las oscilaciones de los electrones libres presentes en la nanopartícula, y a ciertas longitudes de onda se obtiene una fuerte banda de absorbancia que es característica para el material, morfología, tamaño de nanopartículas. Esta banda de absorbancia, en nanopartículas metálicas, está localizada en la región del espectro UV-Vis y puede observarse como un pico en este mismo (Amendola, Pilot, Frasconi, Maragò, & Iatì, 2017). En los experimentos presentados se encontró que el LSPR en aproximadamente 524 nm de longitud de onda, confirmando así la presencia de las AuNPs. De acuerdo con Nath y colaboradores, el pico de absorbancia de 524 nm es característico de nanopartículas de oro esféricas con un diámetro de 25 nm (Nath & Chilkoti, 2004). Por otro lado, Haiss y colaboradores, reportan una lista con diferentes tamaños de nanopartículas de oro esféricas asociadas a un valor de LSPR. En esta lista, se encuentra reportado que, para un LSPR localizado a 524 nm, las AuNPs poseen un diámetro de 18 nm (Haiss et al., 2007). Con lo anterior, podemos asumir que el diámetro real de nuestras nanopartículas, se encuentra entre 18 y 25 nm; sin embargo, tanto el tamaño real y la morfología de las AuNPs debe ser confirmado por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La figura 8 nos presenta la morfología y el tamaño promedio de las nanopartículas de oro. De acuerdo con lo obtenido, nuestras nanopartículas presentan una morfología esférica y

un tamaño promedio de  $19.14 \pm 2.56$  nm. Este resultado concuerda con la literatura citada anteriormente y los resultados obtenidos con los espectros de absorbancia UV-vis.

Continuando con los objetivos del presente proyecto, de acuerdo con la literatura, el anclaje de los oligonucleótidos antisentido a las nanopartículas de oro fue monitoreado mediante espectroscopia UV-visible. Observando la figura 9 a), es posible notar que, después del tratamiento con los oligonucleótidos, el color de la solución pasa de un tono violeta rojizo a morado. Aunado a lo anterior, en los resultados mostrados en la figura 9 b) se aprecia cómo la intensidad del pico de absorbancia del espectro UV-Vis, disminuye. Esto último era esperado ya que autores como Alishah, reportan el cambio en el color de la solución de AuNPs y una disminución en la intensidad del pico de absorbancia del espectro UV-Vis cuando los oligonucleótidos son anclados a las AuNPs (Alishah Aratboni, 2020). De manera similar Storhoff y colaboradores, reportan que, después de anclar oligonucleótidos modificados con grupo tiol, se puede observar una disminución en la intensidad del pico de absorbancia de la solución de AuNPs (Storhoff, Elghanian, Mucic, Mirkin, & Letsinger, 1998).

Otro resultado interesante de analizar es la concentración de NaCl presente en nuestra solución. De acuerdo con la literatura, para lograr la mayor adsorción de los oligonucleótidos en la superficie de las AuNPs, es necesario agregar NaCl; sin embargo, el agregar esta sal, trae problemas a la estabilidad de la solución de AuNPs. por lo que es necesario utilizar el método de “salt agging” para lograr la funcionalización de las AuNPs con los ASO y que mantengan su estabilidad hasta una concentración de 0.3 M NaCl (B. Liu & Liu, 2017). De acuerdo con nuestros resultados, al alcanzar 0.05 M de NaCl, la solución de las AuNPs comienza a aglomerarse y precipitar; sin embargo, el conjugado de ASO y AuNPs mantiene su estabilidad hasta 0.1 M de NaCl. Este último resultado se le atribuye a la propiedad estabilizante del ASO. La estabilidad coloidal las AuNPs depende de su agente estabilizante, que en nuestro caso es el ion citrato remanente de la reacción de síntesis de las nanopartículas. El ion citrato estabiliza

a la AuNPs, pero es fácilmente desplazado por otros agentes estabilizantes (Javed et al., 2020). El grupo tiol presente en el ASO tiene una fuerte afinidad por la AuNPs, por lo que ASO desplaza al ion citrato presente en la superficie de la AuNP y funciona como agente estabilizante (Giljohann et al., 2010). Sin embargo, nuestro resultado sobre estabilidad del conjugado ASO-AuNPs es contrario a lo que se presenta en la literatura. De acuerdo con Mirkin y colaboradores, aún en concentraciones muy altas de NaCl (hasta 0.3 M), la estabilidad de los conjugados entre oligonucleótidos y AuNPs se mantenía aun después de 3 meses (Mirkin, Letsinger, Mucic, & Storhoff, 1996). De manera similar, Li y colaboradores, quienes establecieron un sistema de unión de AuNPs con oligonucleótidos modificados con un grupo tiol, concluyeron que la unión del oligonucleótido incrementó la estabilidad de las nanopartículas (Li, Jin, Mirkin, & Letsinger, 2002). Nuestro resultado, que difiere de la literatura, puede deberse a errores en la metodología llevada a cabo, como el periodo de incubación previo o posterior a agregar el NaCl (16 h y 1.5 h, respectivamente); o la velocidad a la que se agrega el NaCl. De acuerdo con Gill y colaboradores, los periodos de incubación previos y posteriores a la adición de NaCl, son de aproximadamente 16 y 8 h, respectivamente (Gill et al., 2008). Por otro lado, Hurst y colaboradores utilizan un periodo de incubación en la adición de NaCl de 20 min entre cada incremento (Hurst et al., 2006). A pesar de que solo se alcanza una concentración de 0.1 M de NaCl, aún es posible utilizar estos conjugados ya que, como se discutirá más adelante, la adsorción se llevó a cabo. Continuando con la caracterización de las ASO-AuNPs, se tomaron imágenes con TEM para poder observar la morfología y el diámetro de los conjugados. De la figura 10 a) y b), es posible observar que se mantiene la morfología esférica, pero aumenta el diámetro promedio a  $21 \pm 8.24$  nm. Un detalle interesante que se puede observar en las imágenes TEM cercanas es que, comparado con las AuNPs solas, en los ASO-AuNPs aparece un halo alrededor de las nanopartículas, indicando que los oligonucleótidos han sido adsorbidos sobre la superficie de las AuNPs. De manera similar a nuestros resultados, Gill y colaboradores, realizan conjugados de

oligonucleótidos con nanopartículas de oro y, en las micrografías con TEM, es posible observar un halo alrededor de las AuNPs posterior a la conjugación (Gill et al., 2008). Con la información recopilada por la literatura y la evidencia presentada, es posible concluir que fue posible conjugar los ASO y las AuNPs.

Continuando con los experimentos realizados en el presente proyecto, el siguiente paso fue la propagación y caracterización del plásmido pSK9065. Este plásmido posee la característica de conferir resistencia a ampicilina, de tal manera que, aquellas cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  que lograran transformarse en el proceso de electroporación, lograrían crecer en un ambiente donde se encuentre el antibiótico anteriormente mencionado. En la figura 11 se tienen diferentes placas de agar LB donde se cultivaron las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  con y sin el plásmido. Las placas de agar LB 1) y 2) corresponden a *E. coli* DH5 $\alpha$  sin pSK9065, la diferencia entre estas 2 placas es que la 2) posee ampicilina, por lo tanto *E. coli* DH5 $\alpha$  no desarrolla colonias; por otro lado, las placas de agar LB 3) y 4) contienen *E. coli* DH5 $\alpha$  con pSK9065 y ampicilina, por lo tanto, era de esperarse que se obtuviera crecimiento.

A partir de la placa 3) y 4) se seleccionaron colonias para extraer el plásmido pSK9065 y hacer una restricción enzimática. Haciendo un análisis *in silico* se esperaban observar 2 fragmentos de pSK9065 (un fragmento de 6102 y otro de 773), después de la restricción enzimática con BamHI, lo cual fue confirmado mediante el gel de agarosa presentado en la figura 12. Una vez que se tuvo caracterizado el plásmido pSK9065 y se confirmó su presencia en las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se procedió a determinar la MIC de ampicilina en esta cepa transformada.

De acuerdo con la literatura, *Escherichia coli* no resistente posee una MIC a ampicilina entre 8 – 32 ppm (Briñas, Zarazaga, Sáenz, Ruiz-Larrea, & Torres, 2002; de Boer, Heuer, Hussein, & McDougall, 2015; Garza-Cervantes, 2016; Salmon & Watts, 2000). En la figura 13 se compara el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin y con diferentes concentraciones de antibiótico.

De acuerdo con lo que se observa nuestro gráfico, la concentración mínima necesaria de ampicilina en donde el crecimiento de *E. coli* DH5 $\alpha$  se ve limitado es de 16 ppm, entrando en el rango reportado en la literatura.

Pasando a los resultados de la MIC en *Escherichia coli* resistente, la literatura nos indica que una cepa que se considera resistente a ampicilina, de esta bacteria, posee una MIC  $\geq$  32 ppm (Briñas et al., 2002; Lamp & Vickers, 1998; Olesen, Hasman, & Møller Aarestrup, 2004). Siguiendo con los resultados obtenidos, de la figura 14, nos indica que la concentración mínima necesaria de ampicilina para inhibir el crecimiento de nuestra cepa transformada de *E. coli* PSK es de 32,768 ppm. Una vez obtenidos este dato, se utilizaron menores concentraciones de ampicilina, en combinación con nuestro sistema, para analizar si es posible re-sensibilizar nuestra cepa resistente.

Avanzando con la metodología propuesta, se probaron diferentes combinaciones de concentración de los ASO-AuNPs (0.05 - 0.2 nM), con ampicilina (10,000 ppm), para determinar si este rango de concentraciones logra resensibilizar a *E. coli* PSK a ampicilina. Analizando la figura 15, se observa que las concentraciones probadas del sistema ASO-AuNPs, no presentan ninguna actividad antimicrobiana. Esto era de esperarse debido a 2 grandes razones: 1) Los ASO no están dirigidos a ningún gen esencial para el desarrollo de nuestra cepa, por lo que no pueden inhibir su crecimiento silenciando genes; y 2) Las AuNPs no poseen, por si solas, actividad antibacteriana (Bagga et al., 2017; Payne et al., 2016; Shamaila et al., 2016; Tiwari, Vig, Dennis, & Singh, 2011b; Ying Zhang, Shareena Dasari, Deng, & Yu, 2015). Continuando con los resultados de la figura 15, se puede observar que los ASO-AuNPs, en combinación con la ampicilina no logran inhibir el crecimiento de la cepa resistente. Este último resultado puede atribuirse a diferentes causas: La cantidad de oligonucleótidos adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula y la estabilidad coloidal de las nanopartículas.



Diferentes autores prueban diferentes concentraciones de ASO para la inhibición de las resistencias a antibióticos. Como primer ejemplo, Wang y colaboradores sintetizaron un liposoma para encapsular y transportar ASO para inhibir la expresión del gen *oprM* en *Pseudomonas aeruginosa*. *oprM* es un gen que codifica una bomba de eflujo contra múltiples antibióticos. De acuerdo con estos autores, utilizando un rango entre 3 - 100  $\mu\text{g/mL}$  de ASO encapsulados, se logra reducir la MIC de las cepas contra los 5 antibióticos (Piperacilina, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Cefoperazona, Imipenem, Amikacina) más comunes utilizados contra esta bacteria desde entre 4-1024  $\mu\text{g/mL}$  hasta 0.5-64  $\mu\text{g/mL}$ . (H. Wang et al., 2010). De manera similar, Meng y colaboradores diseñaron un sistema de entrega de ASO mediante liposomas dirigidos contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* resistentes a metilina. Estos ASO estaban dirigidos y optimizados para atacar zonas vulnerables del gen *mecA*. Utilizando concentraciones de 0.7 - 18  $\mu\text{M}$  de ASO encapsulados en el liposoma, se mostró una reducción en las MICs de distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos (oxacilina, flucloxacilina, piperacilina, cefalotina, cefoxitina y cefoperazona) desde 16 – 1024  $\mu\text{g/mL}$  hasta 0.13 - 64  $\mu\text{g/mL}$  (Meng et al., 2015). Mientras que, en nuestra metodología, solo se utilizaron concentraciones de ASO entre 0.125- 0.5  $\mu\text{M}$ . Con esto en mente, aún hay un amplio rango de concentraciones que pueden ser probadas para lograr el efecto de re-sensibilización de *E. coli* resistente a nuestro antibiótico.

Uno de los puntos más importantes al analizar las nanopartículas es su estabilidad como coloides. Como se mencionó anteriormente, la cantidad de NaCl afecta la estabilidad de las nanopartículas, de tal forma que, habiendo un ligero desbalance, las AuNPs se agregan y precipitan. En nuestros resultados, se logró mantener la estabilidad hasta una concentración de 0.1 M de NaCl en la solución de ASO-AuNPs. Un detalle interesante a considerar es que el medio de cultivo posee una concentración de NaCl de 0.1 M, por lo que se esperaba que no hubiera problemas. A pesar de que la concentración en el medio de cultivo es idéntica a la que

son estables nuestros conjugados, el caldo LB es un medio complejo que posee más componentes que pueden promover, o facilitar, la agregación y precipitación de los ASO-AuNPs. De acuerdo con la literatura, factores como: los iones, la presencia de macromoléculas (proteínas, lípidos, etc.); complican la interacción de las NP con el entorno del medio de cultivo (Moore et al., 2015). Considerando entonces que, en conjunto, la concentración de NaCl a la que se estabilizan los conjugados y los componentes del medio LB, es posible asumir que estos factores causen la inestabilidad de los ASO-AuNPs, causando que no puedan llevar a cabo su función.

## Capítulo 7

### 7. Conclusiones

Con los resultados y las discusiones presentadas, del presente trabajo podemos concluir que:

- Se lograron sintetizar nanopartículas de oro con morfología esférica y un tamaño promedio de  $19 \pm 2.56$  nm.
- Los oligonucleótidos antisentido, modificados con un extremo tiol, se pudieron anclar a las nanopartículas de oro.
- La adsorción de los ASO a las AuNPs se pudo seguir mediante espectroscopia UV-vis y se confirmó mediante imágenes de TEM
- Se transformó *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con el plásmido pSK9065, dando lugar a la cepa resistente *Escherichia coli* PSK.
- La MIC de ampicilina en la cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  es de 16 ppm
- La MIC de ampicilina en la cepa *Escherichia coli* PSK es de 32,768 ppm
- Los ASO-AuNPs son estables en solución con una concentración de 0.1 M de NaCl
- Los ASO-AuNPs, en concentraciones de 0.125 - 0.5  $\mu$ M de ASO y 0.05 - 0.2 nM de AuNPs no lograron inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* PSK en presencia de ampicilina.

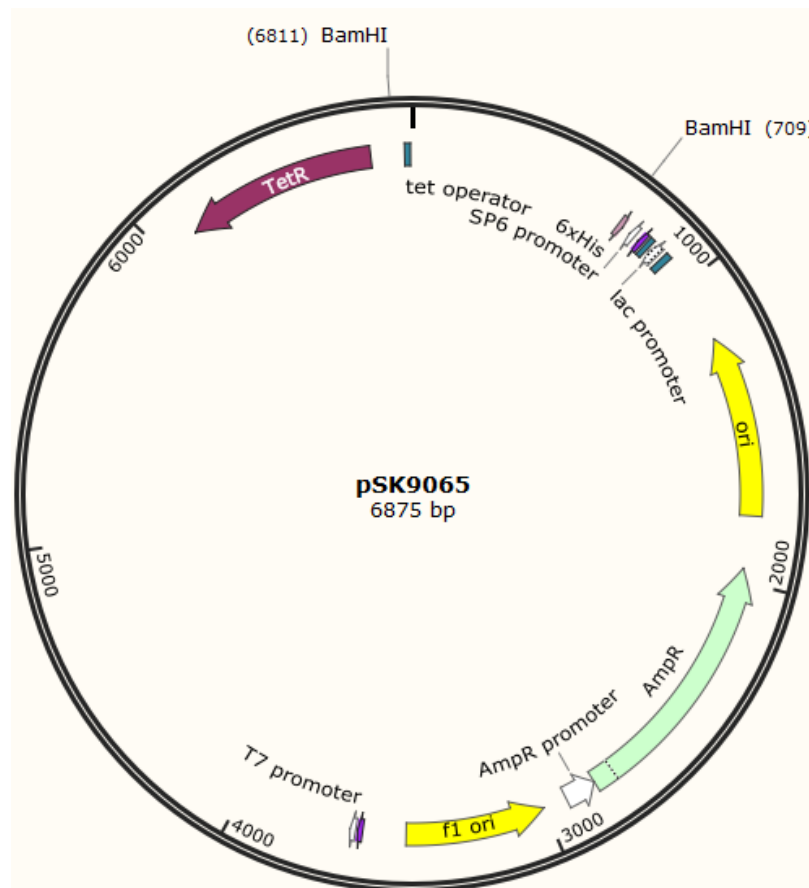
Teniendo en cuenta estas conclusiones, en un futuro, se espera mejorar el procedimiento de conjugación de los ASO en las AuNPs para que se mantengan estables a mayores concentraciones de NaCl; además, se espera que al aumentar la cantidad de ASO para tratar las cepas resistentes, sea posible lograr inhibir la resistencia a antibióticos.

Aún queda mucho trabajo experimental por realizar, pero, con este panorama en mente, se desea que este sistema pueda ser utilizado como un arma más en el combate contra los patógenos resistentes a antibióticos.

# Capítulo 7

## 8. Anexos

Anexo 1: Plásmidos utilizados



Plásmido pSK9065

## Capítulo 8

### 8. Referencias

- Alishah Aratboni, H. (2020). *Optical Control of Gene Expression in Biological Systems Using Gold Nanoparticles: Photothermal Gene Expression in Escherichia coli and Gene Silencing in Chlamydomonas reinhardtii*. Universidad Autónoma de NUEvo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/19198/>
- Amendola, V., Pilot, R., Frascioni, M., Maragò, O. M., & Iatì, M. A. (2017). Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 29(20), 203002. <https://doi.org/10.1088/1361-648x/aa60f3>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., ... Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Bagga, P., Siddiqui, H. H., Akhtar, J., Mahmood, T., Zahera, M., & Khan, M. S. (2017). Gold Nanoparticles Conjugated Levofloxacin: For Improved Antibacterial Activity Over Levofloxacin Alone. *Current Drug Delivery*, 14(8), 1114–1119. <https://doi.org/10.2174/1567201814666170316113432>
- Balasubramanian, S. K., Yang, L., Yung, L.-Y. L., Ong, C.-N., Ong, W.-Y., & Yu, L. E. (2010). Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*,

31(34), 9023–9030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.012>

BamHI (10 U/ $\mu$ L). (n.d.). Retrieved March 28, 2022, from

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0051>

Beha, M. J., Ryu, J. S., Kim, Y. S., & Chung, H. J. (2021). Delivery of antisense oligonucleotides using multi-layer coated gold nanoparticles to methicillin-resistant *S. aureus* for combinatorial treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 112167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112167>

Blair, J. M. A., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. V. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance, 9, 1165–1177.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

Boyd, S. E., Livermore, D. M., Hooper, D. C., & Hope, W. W. (2020). Metallo- $\beta$ -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.00397-20>

Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2002).  $\beta$ -Lactamases in Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Foods, Humans, and Healthy Animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3156–3163. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3156-3163.2002>

Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 686–707. <https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.686-707.2000>

- Chalhoub, H., Sáenz, Y., Rodriguez-Villalobos, H., Denis, O., Kahl, B. C., Tulkens, P. M., & Van Bambeke, F. (2016). High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 740–743.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.012>
- Chan, J. H. P., Lim, S., & Wong, W. S. F. (2006). ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(5-6), 533–540. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04403.x>
- Cheng, Y. S., Williamson, P. R., & Zheng, W. (2019, October). Improving therapy of severe infections through drug repurposing of synergistic combinations. *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.07.006>
- Choi, U., & Lee, C.-R. (2019). Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli* . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00953>
- Chopra, I. (1999). Prospects for antisense agents in the therapy of bacterial infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 8(8), 1203–1208.  
<https://doi.org/10.1517/13543784.8.8.1203>
- de Boer, M., Heuer, C., Hussein, H., & McDougall, S. (2015). Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* of bovine uterine origin. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4427–4438.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2014-8890>
- Delong, R. K., Reynolds, C. M., Malcolm, Y., Schaeffer, A., Severs, T., & Wanekaya, A.



- (2010). Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological macromolecules. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3, 53–63. <https://doi.org/10.2147/NSA.S8984>
- Doremus, R. H. (1964). Optical Properties of Small Gold Particles. *The Journal of Chemical Physics*, 40(8), 2389–2396. <https://doi.org/10.1063/1.1725519>
- Ekin, A., Karatas, O. F., Culha, M., & Ozen, M. (2014). Designing a gold nanoparticle-based nanocarrier for microRNA transfection into the prostate and breast cancer cells. *The Journal of Gene Medicine*, 16(11–12), 331–335. <https://doi.org/10.1002/jgm.2810>
- Fayyazi, A., Halaji, M., Sadeghi, A., & Havaei, S. A. (2020). High frequency of integrons and efflux pump in Uropathogenic Escherichia coli isolated from Iranian kidney and non-kidney transplant patients. *Gene Reports*, 21, 100873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100873>
- Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2014). The sentinel role of peptidoglycan recycling in the  $\beta$ -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *BIOORGANIC CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.05.011>
- García-Solache, M., & Rice, L. B. (2019). The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *MedChemComm*, 7(1), 11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>

- Garza-Cervantes, J. A. (2016). *USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS COMBINATORIOS METAL-ANTIBIÓTICO PARA LA RESENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES*. Universidad Autonoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/13998/1/1080237763.pdf>
- Ghaffari, E., Rezatofighi, S. E., Ardakani, M. R., & Rastegarzadeh, S. (2019). Delivery of antisense peptide nucleic acid by gold nanoparticles for the inhibition of virus replication. *Nanomedicine*, *14*(14), 1827–1840. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0520>
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A. (2010). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition*, *49*(19), 3280–3294. <https://doi.org/10.1002/anie.200904359>
- Gill, P., Ghalami, M., Ghaemi, A., Mosavari, N., Abdul-Tehrani, H., & Sadeghizadeh, M. (2008). Nanodiagnostic Method for Colorimetric Detection of Mycobacterium tuberculosis 16S rRNA. *NanoBiotechnology*, *4*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1007/s12030-009-9021-9>
- Good, L., Awasthi, S. K., Dryselius, R., Larsson, O., & Nielsen, P. E. (2001). Bactericidal antisense effects of peptide–PNA conjugates. *Nature Biotechnology*, *19*(4), 360–364. <https://doi.org/10.1038/86753>
- Goudarzi, M., Razeghi, M., Dadashi, M., Miri, M., Hashemi, A., Amirpour, A., ... Fazeli, M. (2019). Distribution of SCCmec types, tetracycline and aminoglycoside resistance genes in hospital-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *Gene Reports*, *16*, 100454. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100454>
- Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J., & Fernig, D. G. (2007). Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Analytical Chemistry*,

79(11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>

Han, G., Ghosh, P., & Rotello, V. M. (2007). Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. *Nanomedicine*, 2(1), 113–123. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.1.113>

Hassanzadeh, S., ganjloo, S., Pourmand, M. R., Mashhadi, R., & Ghazvini, K. (2020). Epidemiology of efflux pumps genes mediating resistance among *Staphylococcus aureus*; A systematic review. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103850. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103850>

Hassuna, N. A., Darwish, M. K., Sayed, M., & Ibrahem, R. A. (2020). Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 285–293. <https://doi.org/10.2147/IDR.S233808>

Hegarty, J. P., & Stewart, D. B. (2018). Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1055–1065. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8671-0>

Hoynes-O'Connor, A., & Moon, T. S. (2016). Development of Design Rules for Reliable Antisense RNA Behavior in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1441–1454. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00036>

Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K. R., & Mirkin, C. A. (2006). Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8313–8318. <https://doi.org/10.1021/ac0613582>

Impey, R. E., Hawkins, D. A., Sutton, J. M., & Soares da Costa, T. P. (2020). Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-

Negative Bacteria. *Antibiotics*. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090623>

- Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2016). Nanoparticles based DNA conjugates for detection of pathogenic microorganisms. *International Nano Letters*, 6(3), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0177-0>
- Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S. O., Ain, N. ul, & Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00704-4>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15)
- Kapur, S. S. E.-S. S. E.-S. (2019). Antisense Therapy: An Overview (p. Ch. 1). Rijeka: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86867>
- Lamp, K. C., & Vickers, M. K. (1998). Pharmacodynamics of Ampicillin-Sulbactam in an In Vitro Infection Model against Escherichia coli Strains with Various Levels of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 231–235. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.231>
- Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., & Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*, 39(6), 2460–2504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.21591>
- Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490–516.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>

León-Buitimea, A., Garza-Cárdenas, C. R., Garza-Cervantes, J. A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2020). The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1669.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01669>

Li, Z., Jin, R., Mirkin, C. A., & Letsinger, R. L. (2002). Multiple thiol-anchor capped DNA–gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research*, *30*(7), 1558–1562.

<https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1558>

Liu, B., & Liu, J. (2017). Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical Methods*, *9*(18), 2633–2643.

<https://doi.org/10.1039/C7AY00368D>

Liu, Z., & Corey, D. R. (2019). CHAPTER 2: Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. In *RSC Drug Discovery Series* (Vol. 2019-Janua, pp. 22–31). Royal Society of Chemistry.

<https://doi.org/10.1039/9781788015714-00022>

Loh, X. J., & Lee, T.-C. (2012). Gene delivery by functional inorganic nanocarriers. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, *6*(2), 108—114.

<https://doi.org/10.2174/187221512801327361>

Lucía, F., & W., H. R. E. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661–681.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>

Mahdiyoun, S. M., Kazemian, H., Ahanjan, M., Hour, H., & Goudarzi, M. (2016).

- Frequency of Aminoglycoside-Resistance Genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates from Hospitalized Patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(8), e35052–e35052. <https://doi.org/10.5812/jjm.35052>
- Medina, E., & Pieper, D. H. (2016). Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 3–33. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_492](https://doi.org/10.1007/82_2016_492)
- Meng, J., He, G., Wang, H., Jia, M., Ma, X., Da, F., ... Luo, X. (2015). Reversion of antibiotic resistance by inhibiting mecA in clinical methicillin-resistant Staphylococci by antisense phosphorothioate oligonucleotide. *The Journal of Antibiotics*, 68(3), 158–164. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.132>
- Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., & Storhoff, J. J. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382(6592), 607–609. <https://doi.org/10.1038/382607a0>
- Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Hirsch, V., Balog, S., Urban, D., Jud, C., ... Petri-Fink, A. (2015). Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6287–6305. <https://doi.org/10.1039/C4CS00487F>
- Morse, T. O., Morey, S. J., & Gunsch, C. K. (2010). Microbial Inactivation of *Pseudomonas putida* and *Pichia pastoris* Using Gene Silencing. *Environmental Science & Technology*, 44(9), 3293–3297. <https://doi.org/10.1021/es901404a>
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Nath, N., & Chilkoti, A. (2004). Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Analytical Chemistry*, 76(18), 5370–5378. <https://doi.org/10.1021/ac049741z>

Nobuhisa, M., Eiko, S., Satoshi, O., Naomasa, G., Hideto, T., & Takeshi, N. (2000). Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3322–3327. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000>

Noori, M., Mohsenzadeh, B., Bahramian, A., Shahi, F., Mirzaei, H., & Khoshnood, S. (2019). Characterization and frequency of antibiotic resistance related to membrane porin and efflux pump genes among *Acinetobacter baumannii* strains obtained from burn patients in Tehran, Iran. *Journal of Acute Disease*, 8(2), 63–66. <https://doi.org/10.4103/2221-6189.254428>

Okkeh, M., Bloise, N., Restivo, E., De Vita, L., Pallavicini, P., & Visai, L. (2021). Gold Nanoparticles: Can They Be the Next Magic Bullet for Multidrug-Resistant Bacteria? *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11(2), 312. <https://doi.org/10.3390/nano11020312>

Olesen, I., Hasman, H., & Møller Aarestrup, F. (2004). Prevalence of  $\beta$ -Lactamases among Ampicillin-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolated from Food Animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 10(4), 334–340.

<https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.334>

- Payne, J. N., Waghvani, H. K., Connor, M. G., Hamilton, W., Tockstein, S., Moolani, H., ... Dakshinamurthy, R. (2016). Novel Synthesis of Kanamycin Conjugated Gold Nanoparticles with Potent Antibacterial Activity . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00607>
- Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). Antibiotic resistance: Current perspectives. *ACS Omega*, 2(10), 7400–7409. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01368>
- Pissuwan, D., Cortie, C. H., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2010). Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 207–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.004>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Rice, L. B. (2012). Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(2), 198–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2011.12.003>
- Riley, M., & Vermerris, W. (2017). Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery—A Review. *Nanomaterials*, 7(5), 94. <https://doi.org/10.3390/nano7050094>
- Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. J. A. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19(10), 673–694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>



- Rodrigues, M., McBride, S. W., Hullahalli, K., Palmer, K. L., & Duerkop, B. A. (2019). Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e01454-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01454-19>
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educacion Quimica*, 27(4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Rouch, D. A., Byrne, M. E., Kong, Y. C., & Skurray, R. A. (1987). The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *Journal of General Microbiology*, 133(11), 3039–3052. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-11-3039>
- Salmon, S. A., & Watts, J. L. (2000). Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults. *Avian Diseases*, 44(1), 85–98.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234–258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Schuldiner, S. (2018). The Escherichia coli effluxome. *Research in Microbiology*, 169(7), 357–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.02.006>

- Schwarz, S., Kadlec, K., & Strommenger, B. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *61*(2), 282–285. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm487>
- Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., & Naseem, S. (2016). Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen. *Nanomaterials*, *6*(4), 71. <https://doi.org/10.3390/nano6040071>
- Spengler, G., Kincses, A., Gajdács, M., & Amaral, L. (2017). New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22030468>
- Stach, J., & Good, L. (2011). Synthetic RNA Silencing in Bacteria – Antimicrobial Discovery and Resistance Breaking . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00185>
- Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., & Letsinger, R. L. (1998). One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. *Journal of the American Chemical Society*, *120*(9), 1959–1964. <https://doi.org/10.1021/ja972332i>
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Biochemical and Biophysical Research Communications Bacterial multidrug efflux pumps : Mechanisms , physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *453*(2), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V., & Singh, S. (2011a). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, *1*(1), 31–63.

<https://doi.org/10.3390/nano1010031>

Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V., & Singh, S. (2011b). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, *1*(1), 31–63.

<https://doi.org/10.3390/nano1010031>

Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., ... Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific Reports*, *6*(1), 24648. <https://doi.org/10.1038/srep24648>

Tyagi, H., Kushwaha, A., Kumar, A., & Aslam, M. (2016). A Facile pH Controlled Citrate-Based Reduction Method for Gold Nanoparticle Synthesis at Room Temperature. *Nanoscale Research Letters*, *11*(1), 362. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1576-5>

Uppalapati, S. R., Sett, A., & Pathania, R. (2020). The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Frontiers in Microbiology*. Retrieved from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.589234>

Valsamatzi-Panagiotou, A., Popova, K. B., & Penchovsky, R. (2020). Drug Discovery for Targeting Drug Resistant Bacteria BT - Sustainable Agriculture Reviews 46: Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 1 Tools and Targets. In H. Panwar, C. Sharma, & E. Lichtfouse (Eds.) (pp. 205–228). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53024-2_9)

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, *40*(4), 277—283. Retrieved from <https://europepmc.org/articles/PMC4378521>

- Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynié, L., Acosta-Gutiérrez, S., Naismith, J. H., ... Pagès, J.-M. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 164–176.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0294-2>
- Verma, H. N., Singh, P., & Chavan, R. M. (2014). Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Veterinary World*, *7*(2), 72–77.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.72-77>
- Wang, H., Meng, J., Jia, M., Ma, X., He, G., Yu, J., ... Luo, X. (2010). oprM as a new target for reversion of multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *60*(3), 275–282. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00742.x>
- Wang, Z., Fast, W., Valentine, A. M., & Benkovic, S. J. (1999). Metallo- $\beta$ -lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, *3*(5), 614–622.  
[https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00017-4)
- World Health Organization, [WHO]. (2017). Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Retrieved January 30, 2020, from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wright, G. D. (1999). Aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, *2*(5), 499–503. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00007-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00007-7)
- Xu, J., Zhang, J., & Zhang, W. (2018). Antisense RNA: the new favorite in genetic research. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, *19*(10), 739–749.

<https://doi.org/10.1631/jzus.B1700594>

- Xue, X.-Y., Mao, X.-G., Zhou, Y., Chen, Z., Hu, Y., Hou, Z., ... Luo, X.-X. (2018). Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *14*(3), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.12.026>
- Xue, Y., Li, X., Li, H., & Zhang, W. (2014). Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *Nature Communications*, *5*(1), 4348. <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>
- Zhang, Ying, Shareena Dasari, T. P., Deng, H., & Yu, H. (2015). Antimicrobial Activity of Gold Nanoparticles and Ionic Gold. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, *33*(3), 286–327. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1055161>
- Zhang, Yuxin, Ma, W., Zhu, Y., Shi, S., Li, Q., Mao, C., ... Lin, Y. (2018). Inhibiting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Tetrahedral DNA Nanostructure-Enabled Antisense Peptide Nucleic Acid Delivery. *Nano Letters*, *18*(9), 5652–5659. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02166>
- Zhang, Yuxin, Xie, X., Ma, W., Zhan, Y., Mao, C., Shao, X., & Lin, Y. (2020). Multi-targeted Antisense Oligonucleotide Delivery by a Framework Nucleic Acid for Inhibiting Biofilm Formation and Virulence. *Nano-Micro Letters*, *12*(1), 74. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-0409-3>