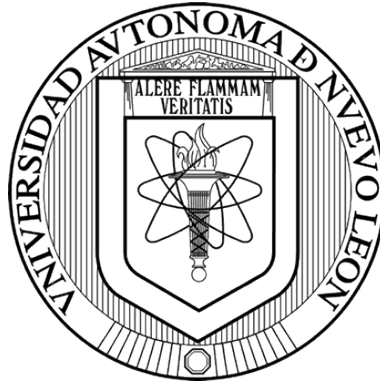


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFECTO DE UNA FORMULACIÓN A BASE DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS DE BISMUTO/PLATA SOBRE MODELOS DE INFECCIÓN
BACTERIANOS

POR

M.C. BEATRIZ ELENA CASTRO VALENZUELA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2025

EFFECTO DE UNA FORMULACIÓN A BASE DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS DE BISMUTO/PLATA SOBRE MODELOS DE INFECCIÓN
BACTERIANOS

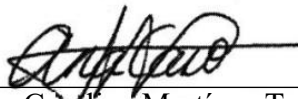
Comité de tesis



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Presidente



Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario



Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Vocal



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

EFFECTO DE UNA FORMULACIÓN A BASE DE NANOPARTÍCULAS
METÁLICAS DE BISMUTO/PLATA SOBRE MODELOS DE INFECCIÓN
BACTERIANOS

Dirección de tesis



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director



Dr. Moisés Armides Franco Molina
Codirector de tesis

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

AGRADECIMIENTO ESPECIAL



Brindo un especial agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Jefe del Laboratorio de Inmunología y Virología por las facilidades otorgadas, tanto económicas así como de infraestructura, para la realización de este proyecto de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por la confianza depositada en mí, por su amor y apoyo incondicional, por la paciencia que me han proporcionado, por estar presentes y ser partícipes en todas y cada una de las etapas de mi vida, por siempre brindarme el soporte que he necesitado. Gracias mami y papi, gracias Alvaro, mi compañero de vida, gracias a mis hermanos: Lupita y Miguel; los amo inmensamente.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla le agradezco enormemente el haberme aceptado como su tesista, así como su valiosa participación en este proyecto. Gracias por hacer hasta lo imposible por proporcionarme las instalaciones y herramientas necesarias para poder contribuir a este maravilloso mundo de la ciencia.

A todos mis maestros a lo largo de mi Programa Doctoral les agradezco todas las lecciones brindadas, el valioso tiempo que invirtieron en transferirme sus conocimientos, tanto académicos, así como lecciones de vida.

A todos los miembros de mi Comité de Tesis les estaré siempre agradecida por ser una guía en este proceso, por su incansable acompañamiento, por siempre mostrarme la luz al final del camino, por tener la sabiduría necesaria para que todo esto saliera a flote, sin ustedes esto no sería posible.

A mis amigos de laboratorio, que se convirtieron en amigos del corazón: Jenni y Silvia; Kenia, David, Gus, Nato, Paola, Pedro, muchas gracias por sostenerme, por ser ese apoyo que necesite en mis momentos más oscuros, por ser mis cómplices y confidentes. ¡Los quiero!

Agradezco a la Universidad Autónoma de Chihuahua, por las facilidades brindadas para que yo pudiera estar aquí, sin su apoyo este camino hubiera sido imposible de andar. Agradezco a la SEP, que mediante el programa PRODEP, me apoyo económicamente los

primeros años de mi estancia en este Programa Doctoral, fueron parte fundamental para mi formación.

Agradezco al CONAHCyT por la beca que me fue otorgada para mis estudios de doctorado, ya que sin este apoyo económico no me hubiera sido posible llevar a término esta investigación.

A todos los que participaron directa o indirectamente en este proyecto ¡Muchas Gracias!

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia: Alvaro, Lupita y Miguel, son mi mayor fortaleza. Esta etapa de nuestras vidas representó un reto muy grande para todos nosotros, no fue nada fácil estar separados, pero a pesar de eso hemos logrado salir adelante, sin su apoyo nada de esto sería posible. Todos mis logros, tanto en mi vida personal como profesional, se los dedico a mi familia, en especial a mi mami y a mi papi, siempre los llevo conmigo, siempre están presentes en mi alma y en mi corazón, viven en mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
LISTAS DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Impacto global de las infecciones bacterianas	3
2.2.- Resistencia antimicrobiana	4
2.3.- Nanopartículas como alternativa para combatir infecciones bacterianas	7
2.3.1.- <i>Mecanismo de acción de nanopartículas metálicas</i>	<i>8</i>
2.3.2.- <i>Nanopartículas de bismuto</i>	<i>11</i>
2.3.3.- <i>Nanopartículas de plata</i>	<i>13</i>
2.3.4.- <i>Nanopartículas bimetálicas</i>	<i>15</i>
2.4.- Modelos de infección	16
2.4.1.- <i>Factor de virulencia: Formación de biopelícula</i>	<i>16</i>
2.4.2.- <i>Heridas infectadas</i>	<i>17</i>
2.4.3.- <i>Mastitis bovina</i>	<i>19</i>
2.4.4.- <i>Sepsis</i>	<i>20</i>
3.- JUSTIFICACIÓN	22
4.- HIPÓTESIS	23
5.- OBJETIVOS	24
6.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Síntesis de nanopartículas.....	25
6.2 Caracterización de nanopartículas de bismuto/plata.....	25
6.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	26
6.4 Integridad de membrana	27

6.5 Ensayo de formación de biopelícula	28
6.6 Ensayo de viabilidad celular.....	29
6.7 Determinación de citocinas	31
6.8 Fagocitosis en PBMC bovinas	32
6.9 Modelo de infección.....	33
6.9.1 Animales.....	33
6.9.2 Modelo de herida infectada	34
6.9.3 Modelo de sepsis	35
6.9.4 Modelo de mastitis <i>in vitro</i>	35
6.9 Análisis estadístico	36
7.- RESULTADOS	37
7.1 Caracterización de nanopartículas de bismuto/plata.....	37
7.2 Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos	42
7.3 Integridad de la membrana	43
7.4 Ensayo de formación de biopelículas.....	44
7.5 Ensayo de viabilidad celular.....	45
7.6 Producción de citocinas inflamatorias.....	47
7.7 Actividad fagocítica de PBMC bovinas	48
7.8 Modelo de herida infectada	50
7.9 Modelo de sepsis	51
7.10 Modelo de mastitis <i>in vitro</i>	52
8.- DISCUSIÓN	54
9.- CONCLUSIONES	58
10.- PERSPECTIVAS	59
11.- REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas Bi/Ag.....	38
Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de nanopartículas de Bi/Ag para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	43
Cuadro 3. Efecto de CMB de nanopartículas Bi/Ag (1.72 y 3.44 µg/mL para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , respectivamente) sobre la producción de citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en la línea celular de epitelio mamario (MCF7).....	47
Cuadro 4. Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre ratones con sepsis ocasionada por <i>E. coli</i>	52
Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en leche cruda contaminada con <i>S. aureus</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Probables mecanismos de acción de nanopartículas metálicas sobre células procariotas.....	9
Figura 2. Estabilidad de las nanopartículas Bi/Ag	37
Figura 3. Micrografía electrónica de las nanopartículas Bi/Ag	39
Figura 4. Análisis elemental de las nanopartículas Bi/Ag	40
Figura 5. Espectro EDS determinado por TEM de las nanopartículas Bi/Ag.....	41
Figura 6. Espectro XPS de las nanopartículas Bi/Ag.....	42
Figura 7. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag sobre el crecimiento bacteriano.....	43
Figura 8. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag sobre la liberación de LDH en cepas bacterianas.....	44
Figura 9. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag después de diferentes días de haber sido sintetizadas sobre la inhibición en la formación de biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 10. Efecto de la CMB de las nanopartículas Bi/Ag para <i>S. aureus</i> (1.72µg/mL) y <i>E. coli</i> (3.44 µg7mL) sobre la viabilidad relativa en HUVEC, NIH/3T3 y MCF7.....	45
Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la viabilidad relativa en la línea celular de epitelio mamario diferenciado (MCF7).....	46
Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la viabilidad celular relativa en la línea celular HUVEC.....	47
Figura 13. Viabilidad celular de PBMC bovinas tratadas con nanopartículas Bi/Ag.....	48
Figura 14. Actividad fagocítica de PBMC bovinas estimuladas con nanopartículas Bi/Ag.....	49

Figura 15.	Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en heridas contaminadas con 5×10^5 UFC de <i>S. aureus</i> en ratones...	50
Figura 16.	Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en heridas contaminadas con 5×10^5 UFC de <i>E. coli</i> en ratones.....	51

LISTAS DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µJ	Microjoules
µL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Au	Oro
BD	Becton Dickinson
Bi	Bismuto
BiNPs	Nanopartículas de bismuto
Bi(NO ₃) ₃ .5H ₂ O	Nitrato de bismuto pentahidratado
BisBAL	Nanopartículas lipofílicas de bismuto
NPs Bi/Ag	Nanopartículas de bismuto y plata
Bi ₂ O ₃	Óxido de bismuto
CBA	Ensayo de perlas para citometría
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm ²	Centímetro cuadrado
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cu	Cobre
CuO	Óxido de cobre
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMEM	Medio Eagle's modificado por Dulbecco
DO	Densidad óptica
EDS	Espectroscopía dispersiva de rayos X

eV	Electrón voltio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
h	Horas
HUVEC	Línea celular de células endoteliales humanas de vena umbilical
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
Kg	Kilogramo
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
MCF7	Línea celular de epitelio mamario diferenciado
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MSRA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
mV	Milivoltios
NIH/3T3	Línea celular de fibroblastos murinos
Nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
p/v	Peso/volumen
PBS	Amortiguador fosfato salino
PDI	Índice de polidispersidad
ppm	Partes por millón
Pt	Platino
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFB	Suero fetal bovino
Si	Silicio
SRB	Sulforrodamina B

SRP	Plasmón de resonancia superficial
STEM	Microscopía electrónica de transmisión de barrido
TCA	Ácido tricloroacético
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TSB	Caldo tripticasa de soya
UFC	Unidades formadoras de colonias
USD	Dólar estadounidense
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
Vis	Visible
xg	Gravedades
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
ZnO	Óxido de Zinc

RESUMEN

La emergencia de microorganismos resistentes a diversos agentes antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, amenazando el enfoque conocido como “One Health”. Actualmente, la estrategia convencional para tratamiento y prevención contra infecciones microbianas es el uso de antibióticos. Sin embargo, esos fármacos están siendo ineficientes debido al incremento de la resistencia por parte de estos microorganismos. La falta de disponibilidad de antibióticos efectivos resalta la necesidad de descubrir alternativas para combatir infecciones bacterianas. Así, se han desarrollado estrategias para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como el uso de nanopartículas metálicas. Por lo que en el presente trabajo se pretende 1) sintetizar y caracterizar nanopartículas metálicas de bismuto y plata, 2) evaluar la actividad antibacteriana de estas nanopartículas (NPs) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en diversos modelos de infección *in vitro* e *in vivo*, 3) determinar el efecto citotóxico sobre varias líneas celulares representativas de los tejidos a tratar, 4) evaluar su efecto sobre la producción de citocinas proinflamatorias en un modelo *in vitro*, así como 5) determinar su efecto sobre la capacidad fagocítica de PBMC. Los resultados indican que es posible obtener nanopartículas bimetalicas de bismuto y plata en solución acuosa a partir de una única reacción, las nanopartículas son estables al menos durante 28 días, presentan una morfología cuasi-esférica con un diámetro individual promedio de 18.39 ± 7.49 nm y un valor de potencial zeta de 39.3 mV con una carga neta positiva. Además, tienen efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CMB de $1.72 \mu\text{g/mL}$) y *Escherichia coli* ATCC 11229 (CMB de $3.44 \mu\text{g/mL}$), pueden inhibir la formación de biopelículas de *S. aureus*, no tienen efecto

citotóxico sobre líneas celulares representativas de los tejidos a tratar (HUVEC, NIH/3T3 y MCF7) ni sobre PBMC; no afectan la producción de citocinas inflamatorias (IL-6 e IL-8) en la línea celular epitelial mamaria diferenciada evaluada ni el proceso de fagocitosis de PBMC.

ABSTRACT

The emergence of resistant microorganisms to several antimicrobial agents has become one of the main health problems worldwide, threatening the “One Health” approach. Currently, the conventional strategy for treatment and prevention against microbial infections is the use of antibiotics. However, these drugs are proving ineffective due to these microorganisms' increased resistance. The lack of availability of effective antibiotics highlights the need to discover alternatives to combat bacterial infections. Therefore, strategies have been developed for treating infectious diseases, such as using metallic nanoparticles. Thus, in the present work we aim to 1) synthesize and characterize metallic nanoparticles of bismuth and silver, 2) evaluate the antibacterial activity of these nanoparticles (NPs) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in several infection models *in vitro* and *in vivo*, 3) determine the cytotoxic effect on several cell lines representative of the tissues to be treated, 4) evaluate their effect on the production of proinflammatory cytokines *in vitro* model, and 5) determine their effect on the phagocytic activity of PBMC. The results indicate that it is possible to obtain Bi/Ag NPs in aqueous solution from a single reaction, NPs are stable for at least 28 days, and they have a quasi-spherical morphology with an average individual diameter of 18.39 ± 7.49 nm and a zeta potential of 39.3 mv with a net positive charge. In addition, they have an antibacterial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (MBC of $1.72 \mu\text{g/mL}$) and *Escherichia coli* ATCC 11229 (MBC of $3.44 \mu\text{g/mL}$), can inhibit the formation of *S. aureus* biofilms, have no cytotoxic effect on cell lines representative cell lines of the tissue to be treated (HUVEC, NIH/3T3 and MCF7) or PBMC. They do not affect the production of

inflammatory cytokines (IL-6 and IL-8) in the differentiated mammary epithelial cell line evaluated or the phagocytosis process of PBMC.

1.- INTRODUCCIÓN

La emergencia de bacterias multirresistentes es una de las principales preocupaciones en el ámbito de salud pública a nivel mundial dentro del enfoque “One Health”. La estrategia convencional para prevención y tratamiento contra las infecciones microbianas es el empleo de antibióticos (Schrader *et al.*, 2020); sin embargo, estos fármacos están siendo ineficientes debido al incremento de la resistencia antimicrobiana (RAM; Freeland *et al.*, 2023).

Las heridas en piel son sitios comunes de infección bacteriana, tanto en salud humana como animal (Wolcott *et al.*, 2010; Neopane *et al.*, 2018). Las cepas bacterianas aisladas con mayor prevalencia a partir de estas heridas son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Călina *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2018; Vasile *et al.*, 2020). Este tipo de infecciones pueden ser incontrolables e incluso pueden ocasionar otros cuadros clínicos más severos como mastitis bovina (Kateete *et al.*, 2013; Boireau *et al.*, 2018; Saidi *et al.*, 2019) o cuadros de sepsis, el cual puede llegar a poner en riesgo la vida del individuo (Mora-Rillo *et al.*, 2015; Paulsen *et al.*, 2015).

La falta de disponibilidad de antibióticos efectivos resalta la necesidad de descubrir alternativas que puedan ser efectivas para combatir la RAM (Uchil *et al.*, 2014). Una alternativa es el uso de nanopartículas metálicas (NPs), las cuales son tóxicas para algunas bacterias debido a su tamaño nanométrico, entre 1 y 100 nm (Leid *et al.*, 2012). Éstas son capaces de crear poros en la pared celular de la bacteria y así, desorganizar, dañar e incrementar la permeabilidad de la membrana celular. Además, pueden alterar localmente el microambiente que rodea a la bacteria y generar especies reactivas de oxígeno (ROS), ocasionando muerte celular (Bilal *et al.*, 2017). Las nanopartículas de

plata (AgNPs) son las NPs metálicas más estudiadas debido a sus excelentes efectos bacteriostáticos y bactericidas, incluso sobre bacterias multirresistentes como MSRA (Ansari *et al.*, 2015), la cual ha sido encontrada en algunas heridas infectadas (Li *et al.*, 2023). Otras NPs evaluadas sobre estos modelos son las nanopartículas de bismuto (BiNPs), las cuales han demostrado poseer actividad antimicrobiana y baja citotoxicidad sobre células eucariotas (Shakibaie *et al.*, 2019; da Luz *et al.*, 2020; Vázquez-Muñoz *et al.*, 2020; Maliha *et al.*, 2021). NPs de Bi₂O₃ han sido evaluadas sobre 65 cepas de MSRA aisladas de pacientes con quemaduras infectadas y se encontró que poseen actividad bactericida sobre 16% de estas cepas (Dalvand *et al.*, 2018). Algunos reportes indican que la combinación de nanopartículas monometálicas de Bi y Ag poseen efecto antibacteriano contra las bacterias multirresistentes. Sin embargo, esta combinación no mostró un efecto sinérgico al combinarse (Iftikhar *et al.*, 2021). Además, existen estudios que indican que el uso de nanopartículas bimetalicas de Au-Ag, sobre heridas infectadas, aceleran el proceso de sanación, haciéndolo más efectivo y seguro, sin efectos adversos de toxicidad (Kumar *et al.*, 2019). Así, nosotros proponemos que las nanopartículas bimetalicas de bismuto y plata tienen un mayor efecto antimicrobiano sobre *S. aureus* y *E. coli* cuando se aplican en dosis más bajas que las reportadas como nanopartículas monometálicas, teniendo menor toxicidad en células eucariotas. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo son 1) sintetizar y caracterizar nanopartículas metálicas de bismuto y plata (NPs Bi/Ag), 2) evaluar la actividad antibacteriana de NPs Bi/Ag contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en diversos modelos de infección *in vitro* e *in vivo*, 3) determinar el efecto citotóxico sobre varias líneas celulares representativas de los tejidos a tratar, 4) evaluar su efecto sobre la producción de citocinas proinflamatorias en un modelo *in vitro*, así como 5) determinar su efecto sobre la capacidad fagocítica de PBMC.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Impacto global de las infecciones bacterianas

La población mundial sigue en constante aumento, de acuerdo con la FAO se espera que para el año 2050 haya 9.8 mil millones de habitantes en el mundo (FAO, 2022). Bajo estas condiciones se requiere más espacio para la producción de comida, y se necesitan más animales para alimentar a esta población. Asimismo, las enfermedades infecciosas están incrementando, causando pérdidas en vidas humanas y animales, así como grandes costos a la sociedad (Lindahl *et al.*, 2015). A pesar, de la adquisición de varios métodos preventivos, de control y tratamiento, las enfermedades infecciosas permanecen siendo una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial que resultan en millones de muertes al año (Qadri *et al.*, 2023). El Banco Mundial estima que el costo de los brotes de enfermedades infecciosas durante el último siglo es mayor de 20 billones de USD (Lindahl *et al.*, 2015).

Los antibióticos han hecho posible tratar infecciones bacterianas como meningitis y sepsis que, antes eran intratables y mortales. Desafortunadamente, en décadas recientes debido al uso indebido y excesivo de los antibióticos, así como a factores sociales y económicos han acelerado la diseminación de bacterias multirresistentes, haciendo inefectivo el tratamiento con estos fármacos. Sin tratamientos nuevos y mejores, la OMS predice que la cifra de personas muertas debido a infecciones por bacterias multirresistentes será de 10 millones en 2050 (Mancuso *et al.*, 2021).

Los cuadros patológicos por infecciones bacterianas son un fuerte contribuyente a las morbilidades y mortalidades a nivel mundial, así como una constante amenaza a la salud y economía global (Qadri *et al.*, 2023). Desafortunadamente, los ensayos clínicos

para esas enfermedades infecciosas están retrasados en comparación con enfermedades como cáncer o cardiovasculares y por lo tanto existe una necesidad urgente para identificar estrategias prácticas que permitan un mejor tratamiento para las enfermedades infecciosas (Kirtane *et al.*, 2021).

2.2.- Resistencia antimicrobiana

Globalmente una porción significativa de antimicrobianos es empleada en el sector animal para producción de alimentos como profiláctico o para promover un rápido desarrollo del animal, especialmente en países de bajos y medianos ingresos. Los antimicrobianos utilizados en la agricultura, acuicultura, veterinaria, y salud humana en ocasiones son los mismos, así el uso excesivo o indebido de éstos en medicina humana, ganadería, pesca y producción agrícola ha provocado una alta aparición de resistencia antimicrobiana (RAM) y ha contribuido al desarrollo de resistencia en los seres humanos (Samtiya *et al.*, 2022).

La RAM se define como la capacidad de los patógenos a sobrevivir a la exposición de compuestos que se esperaba los eliminara (Freeland *et al.*, 2023; Schrader *et al.*, 2020). La RAM ha llegado a ser una crisis de salud pública internacional severa y un tópico frecuente de discusión en reuniones políticas de orden mundial (Xia y Li, 2016), debido a que las opciones terapéuticas para infecciones comunes son cada vez más limitadas o no disponibles cuando éstas son ocasionadas por bacterias resistentes (Paphitou, 2013), por lo que eventualmente se encuentra en riesgo la vida. De acuerdo con la OMS, las enfermedades infecciosas son la tercera causa de mortalidad en todo el mundo (Leung *et al.*, 2011), se estima que para el año 2050 la región de Asia-Pacífico pierda 4.73 millones de vidas al año a causa de infecciones ocasionada por microorganismos con RAM y el

impacto económico global puede ser tal alto como de 100 trillones de dólares estadounidenses (O'Neill, 2015).

A partir del año 2007 se ha observado un inevitable aumento tanto en la proporción como en el número de patógenos bacterianos con resistencia a múltiples fármacos, es por ello que organizaciones como el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de E.U.A., el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) y la OMS han realizado recomendaciones e iniciativas tanto a nivel nacional como internacional para combatir esta situación, las cuales son: restringir el uso de antimicrobianos en casos que realmente necesiten ser tratados con estas sustancias, mejorar los diagnósticos para orientar el uso de antimicrobianos, establecer sistemas de vigilancia eficaces para la detección temprana de RAM y promover esfuerzos de investigación para desarrollar nuevos antimicrobianos con lo cual se pueda ofrecer una terapia efectiva a los pacientes. Resaltando que es crucial descubrir algunas alternativas que puedan ser potencialmente efectivas para combatir la RAM (Uchil *et al.*, 2014; Bilal *et al.*, 2017; Hozyen *et al.*, 2019).

La RAM es una realidad que se vive día con día en todo el mundo. En 2014 la prevalencia estimada en China de bacterias resistentes fue de: 44.6%, 62% y 10.5% para MSRA, *Escherichia coli* productora de β -lactamasa y *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapemen, respectivamente (Zhang *et al.*, 2016), por lo que el desarrollo de nuevos compuestos eficaces con propiedades antimicrobianas se ha vuelto una necesidad de primer orden a nivel mundial (Uchil *et al.*, 2014).

Hoy en día se han logrado aislar varias cepas de bacterias multidrogarresistentes a partir de animales con enfermedades infecciosas como *Staphylococcus coagulasa negativa* (Saidi *et al.*, 2019; Boireau *et al.*, 2018; Gentilini *et al.*, 2002); *Streptococcus dysgalactiae*

(Zhang *et al.*, 2018); *Streptococcus uberis* (Tomazi *et al.*, 2019; Boireau *et al.*, 2018); *Escherichia coli* (Boireau *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018; Ahmed y Shimamoto, 2011; Nam *et al.*, 2009); *Staphylococcus aureus* (Saidi *et al.*, 2019; Elemo *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2017; Días *et al.*, 2013) y *Streptococcus agalactiae* (Abd *et al.*, 2021). Todas estas cepas pueden llegar a ocasionar cuadros de infecciones severas, pero en el caso particular de *S. aureus* esto se debe a su capacidad de formar biopelícula sobre las superficies de su hospedador, ya que también es un mecanismo de evasión del sistema inmune (Alghararib *et al.*, 2020; Brouillette y Malouin, 2005).

Los patógenos utilizan diferentes mecanismos para adquirir resistencia a los antibióticos. Estos mecanismos incluyen: salida activa de los antibióticos de las bacterias por medio de una sobreexpresión de bombas de salida, adquisición de rutas metabólicas alternas a las inhibidas por los fármacos, disminución de la permeabilidad de la pared celular bacteriana que restringe el acceso de los antimicrobianos a los sitios diana, degradación del antibiótico, modificación enzimática de éste, modificación de la molécula diana del antibiótico, sobreproducción de la enzima diana y, transferencia de genes de resistencia a los antimicrobianos mediante detección vía quórum dentro de los miembros de los consorcios de biopelículas (Bilal *et al.*, 2017).

Algunos de los tratamientos alternativos sugeridos al uso de antibióticos incluyen la medicina herbal tradicional, péptidos antimicrobianos, extractos de plantas, inmunoterapia (Li *et al.*, 2023; Tashakkori *et al.*, 2020; Freick *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2007; Landin *et al.*, 2015; Bradley *et al.*, 2015; Nickerson y Ryman, 2019). Así como suplementación con vitaminas y minerales, probióticos, bacteriófagos, mejores prácticas en el manejo de los animales zootécnicos, (Coppock, 2019; Rainard y Foucras, 2018;

Dego *et al.*, 2020; Bronzo *et al.*, 2020) y nanopartículas (Gomes y Henriques, 2016, Cabral-Romero y Chellam, 2014).

Sin embargo, bien cabe mencionar que el gran reto contra la RAM incluye encontrar compuestos con suficientemente bajas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), baja toxicidad y fácil biodisponibilidad para su uso eficiente y seguro en humanos y animales (Bilal *et al.*, 2017). Es por esto que, de todas las opciones propuestas, la más prometedora es el uso de nanopartículas, ya que, debido a su tamaño nanométrico poseen una mayor relación área:volumen y propiedades únicas tanto químicas como físicas que les permiten penetrar más profundo en el interior de las estructuras celulares, pudiendo penetrar libremente las barreras de los organismos y su elaboración es económicamente viable (Lange *et al.*, 2021; Hozyen *et al.*, 2019; Kalinska *et al.*, 2019; Taifa *et al.*, 2022).

2.3.- Nanopartículas como alternativa para combatir infecciones bacterianas

La nanotecnología está abriendo nuevos caminos en la ciencia y la tecnología, prometiendo cambios revolucionarios en diferentes disciplinas como alimentos, farmacología, medicina y producción animal. Mediante la nanotecnología es posible desarrollar materiales o dispositivos con propiedades físicas, químicas y biológicas únicas, diferentes a las de sus materiales precursores, tal es el caso de las nanopartículas (Anselmo y Mitragotri, 2016).

El tamaño, el área superficial, morfología, carga neta y los parámetros físicoquímicos de las nanopartículas (NPs) son parámetros importantes que cambian las propiedades antimicrobianas a través de sus múltiples mecanismos de acción. Entre más pequeñas son las NPs, la proporción superficie-volumen aumenta. Grandes áreas superficiales de NPs proveen una mejor interacción con los microorganismos e influye enormemente sobre su efecto antimicrobiano (Bilal *et al.*, 2017).

El tamaño nanométrico de esas partículas permite su comunicación con varias biomoléculas de la superficie celular bacteriana, así como del interior (Mody *et al.*, 2010). Las NPs muestran capacidad para desorganizar y dañar la membrana celular e incrementar su permeabilidad. Es decir, esas NPs pueden alterar localmente el microambiente que rodea a la bacteria y generar especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual, finalmente lleva a la destrucción de la bacteria (Bilal *et al.*, 2017).

Actualmente existen reportes que indican que las NPs metálicas son tóxicas para algunas bacterias como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *S. aureus* resistente a meticilina, *Acinetobacter baumannii* y *K. pneumoniae* (Leid *et al.*, 2012).

2.3.1.- Mecanismo de acción de nanopartículas metálicas

Las NPs metálicas son usualmente sintetizadas por reducción química de cualquier sal metálica (aluminio, oro, plata, bismuto, etc.) con un agente reductor y, sus características fisicoquímicas, ópticas y biológicas pueden ser manipuladas dependiendo de la aplicación deseada (Bilal *et al.*, 2017). Las NPs inorgánicas poseen algunas ventajas sobre los medicamentos debido a que poseen funciones de respuesta a estímulos que surgen de su resonancia de superficie plasmónica o capacidad de respuesta magnética, que otras moléculas no ofrecen (Anselmo y Mitragotri, 2016). Comparadas con las NPs orgánicas (liposomas, NPs poliméricas, micelas poliméricas y NPs de lípidos sólidos), las NPs metálicas pueden ser más pequeñas (con un tamaño entre 1 y 100 nm), y su eficiencia de carga es mucho mayor. Además, poseen propiedades antimicrobianas potenciales debido a ese tamaño, ya que pueden crear poros sobre la pared celular bacteriana, y como resultado, el contenido citoplasmático se descarga en el medio ambiente extracelular, lo que resulta en muerte celular (Bilal *et al.*, 2017).

El mecanismo de actividad antimicrobiana de las NPs aún no ha sido dilucidado, pero, se propone que, al igual que los antibióticos comerciales, pueden actuar a través de uno o más mecanismos para inhibir el crecimiento microbiano o matar a los organismos invasores (Mitchell *et al.*, 2021; Muzammil *et al.*, 2018). Estos mecanismos se enfocan principalmente en aspectos moleculares (Figura 1), incluyendo moléculas que son dañadas, tales como el ADN, proteínas, membrana celular, disrupción física de estructuras celulares (pared celular, membrana plasmática, ribosomas, etc.), disrupción de la cadena transportadora de electrones; daño a la bomba de eflujo de protones; así como por la generación de nuevas moléculas tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y alteración de la transducción de señales (Slavin *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2016). Todo esto contribuyen a daño en el citoplasma, a plásmidos y contenido de ADN, así como a la síntesis de proteínas (Makvandi *et al.*, 2020; Ozdal y Gurkok, 2022).

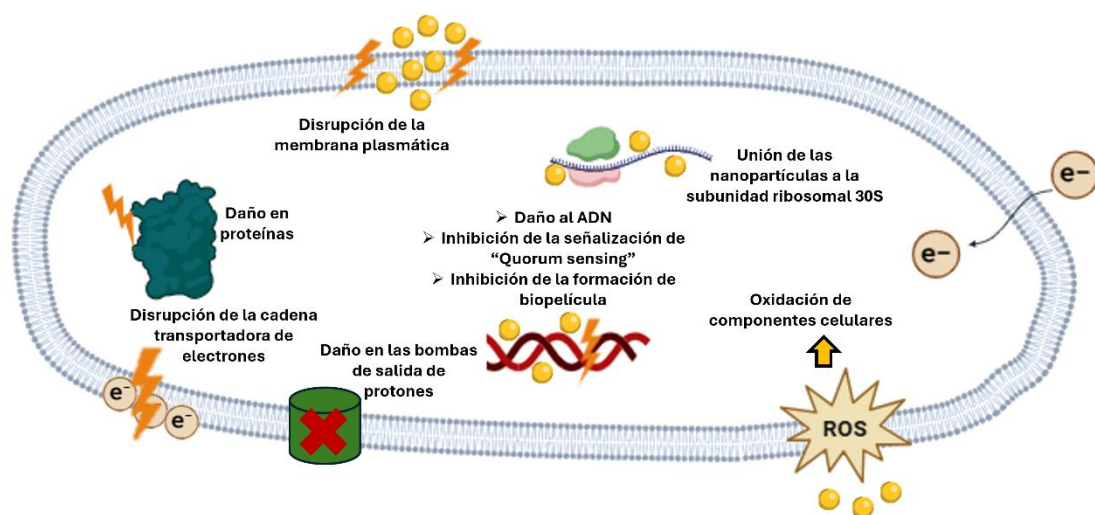


Figura 1. Probables mecanismos de acción de nanopartículas metálicas sobre células procariotas. Adaptado de Makvandi *et al.*, 2020.

Los nanomateriales poseen una ventaja sobre otras moléculas antibacterianas, para atacar microorganismos capaces de formar biopelículas debido a que su área superficial excede en gran medida a su tamaño y puede penetrar fácilmente esta estructura (Zhang *et al.*, 2014). Una vía por medio de la cual se inhibe la producción de biopelícula es mediante la inhibición de la señalización de “Quorum sensing”, donde, en bacterias Gram negativas, autoinductores pequeños difusibles, como las N-acil homoserinas lactonas se combinan con receptores afines para producir complejos que actúan como moléculas de señalización y son identificados por cinasas intracelulares. En el caso de bacterias Gram positivas, oligopéptidos modificados o péptidos autoinducidos actúan como las lactonas. Estos complejos activan cascadas de fosforilación para inducir la fosforilación de una proteína reguladora de respuesta y se unen a una región promotora del ADN encargada de activar factores de transcripción de ciertos factores de virulencia, como los genes necesarios para la producción de biopelícula. La inhibición del “quorum sensing” involucra inactivación de señales moleculares para la formación de biopelícula bacteriana (Du *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2018; Makvandi *et al.*, 2020).

Otro mecanismo de acción elucidado es que las ROS producidas por las NPs metálicas pueden dañar directamente a los constituyentes dentro del citoplasma de la bacteria; un buen ejemplo es el daño al ADN ocasionado por la presencia de ROS en el nucleolo. Un daño al ADN también puede ser ocasionado por la liberación de iones de plata, los cuales activan la disrupción de los enlaces de puentes de hidrógeno entre las cadenas antiparalelas de polinucleótidos. La desnaturalización del ADN puede ser ocasionado por intercalación entre bases purínicas y pirimídicas (Lemire *et al.*, 2013). Asimismo, se ha encontrado que las NPs pueden desfosforilar los residuos de tirosina, lo

que ocasiona inhibición en la transducción de señales y arresto del crecimiento y progresión celular.

Uno de los mecanismos de acción, muy particular en el caso de las nanopartículas, es mediante la liberación de iones metálicos. En el caso de la plata (Ag), hay reportes que indican que las NPs esféricas muestran mayor actividad antimicrobiana, comparada con las que poseen otra forma como discoidal o triangular, esto es debido a que la cantidad de iones Ag que se liberan es dependiente del área superficial de cada NP. Como las NPs esféricas poseen una mayor área superficial, pueden liberar una mayor cantidad de iones y así poseen mayor actividad antimicrobiana (Cheon *et al.*, 2019).

2.3.2.- Nanopartículas de bismuto

El bismuto es un elemento metálico que en combinación ha sido utilizado en tratamientos por más de 200 años. Varias combinaciones del bismuto muestran actividad antibacteriana y son capaces de actuar mejor que la actividad inhibitoria de los antibióticos (Sadeghi *et al.*, 2022). El bismuto (Bi) posee una baja citotoxicidad y recientemente se ha reportado que posee actividad antimicrobiana (da Luz *et al.*, 2020). Se ha evaluado su efecto bactericida, fungicida, antiparasitario y antibiopelícula cuando se sintetiza en forma de NPs, ya sea en combinación con citrato, subnitrito de bismuto, subsalicilato de bismuto, PVP, y BisBAL (Gómez *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Shakibaie *et al.* (2019) se demostró que administrar Bi en forma de NPs aumenta su actividad antimicrobiana, aquí se comparó la actividad antimicrobiana de NPs de bismuto contra el subnitrito de Bi y encontraron que hay un aumento significativo de actividad antibacterial cuando el Bi se administra en NPs. De hecho, actualmente se han elaborado dispositivos médicos con NPs de Bi en el ámbito de salud humana, ya que gracias a sus propiedades antimicrobianas se tiene un bajo riesgo

de infección al emplear este tipo de instrumentos (Arvidsson *et al.*, 2013). La actividad antimicrobial de las NPs de Bi también se ha demostrado *in vitro* contra los siguientes microorganismos: *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Mycoplasma argini*, *Acholeplasma laidlawii*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira Pomona* (Maliha *et al.*, 2021; Rieznichenko *et al.*, 2015), *S. aureus*, y contra *Candida albicans* (Vázquez-Muñoz *et al.*, 2020). Además, estas NPs son capaces de reducir la formación de biopelículas (Rostamifar *et al.*, 2021; Azad *et al.*, 2020; Hernández-Delgadillo *et al.*, 2012) y exhiben actividad antiviral (Cabral-Romero y Chellam, 2014). En 2019, Martínez *et al.*, demostraron que el uso de membranas basadas en quitosano complementadas con NPs lipofílicas de Bi causan una inhibición completa de formación de biopelícula y una inhibición de crecimiento del 90 al 98% de seis diferentes patógenos orales: *Poryphyromonas gingivalis*, *S. aureus* meticilina resistente, *Candida albicans*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, y *Streptococcus gordonii*. Asimismo, en un estudio donde se sintetizaron NPs de Bi con un diámetro de 40.4 a 57.8 nm reducidas con extracto de hojas de *Moringa oleifera* se encontró que estas NPs tienen una CMI para *E. coli* y *S. aureus* de 500 µg/mL (Das *et al.*, 2020).

Las BiNPs han sido ampliamente evaluadas en el campo de la odontología, donde se ha comparado su actividad antimicrobiana contra la clorhexidina y se ha encontrado que las BiNPs muestran una actividad antimicrobiana más efectiva contra *Enterococcus faecalis*, ya que la CMI y la CMB fue 8 veces menor que la empleada de clorhexidina (Azad *et al.*, 2020) para inhibir el crecimiento de dichos microorganismos. En otro estudio con pacientes odontológicos las BiNPs demostraron poseer actividad antibacteriana contra *Streptococcus salivarius* y *Enterococcus faecalis*, en este estudio se encontró que la CMI de las BiNPs fue de 2.5 y 5 µg/mL respectivamente, 21 veces menos que la necesaria por

clorhexidina y la CMB fue de 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$, 11 veces menor que la de clorhexidina (Rostamifar *et al.*, 2021).

Bien cabe mencionar que además de poseer efecto antimicrobiano, las NPs de Bi pueden actuar en efecto sinérgico con otros antibióticos, como lo demostró Jawad *et al.* (2022) al evaluar nanopartículas de óxido de bismuto (Bi_2O_3) elaboradas por ablación láser con un tamaño promedio de 20.8 nm y observar mediante la técnica de difusión en placa que al combinar las NPs de Bi_2O_3 a una concentración de 32 $\mu\text{g/mL}$ con amikacina había una zona de inhibición mayor del crecimiento de las bacterias *Acinetobacter baumannii* y *Staphylococcus aureus* a comparación del halo de inhibición generado por la administración independiente de cada uno de los compuestos.

También se ha demostrado que las NPs de Bi_2O_3 sintetizada por biosíntesis dopadas con Ag y Cu poseen efecto antibacteriano e inhiben la formación de biopelícula por parte de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Sarani *et al.*, 2024).

2.3.3.- Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son las NPs metálicas más estudiadas debido a sus excelentes efectos bacteriostáticos y bactericidas, su actividad ha sido evaluada sobre algunos microorganismos patógenos causantes de procesos infecciosos como *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *S. aureus*, *Candida albicans* y *Candida krusei*; teniendo excelentes resultados (Wernicki *et al.*, 2014).

Las NPs de Ag tiene poca afinidad a varias superficies, pero con la adición de algunas matrices o soportes sólidos elaborados con sustancias poliméricas se puede resolver este inconveniente y con ello es viable utilizarlo en aplicaciones prácticas (Sharma *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2015). En lo que respecta a la sanación de heridas, se

ha visto que al emplear las NPs de Ag, éstas pueden efectivamente aumentar la sanación (Venkatesan *et al.*, 2017). Sin embargo, la aplicación de las NPs de Ag tiene un inconveniente, su alta toxicidad.

A pesar de los estudios limitados *in vivo* sobre la administración de NPs metálicas, se sabe que algunos dispositivos médicos que contiene AgNPs son capaces de liberar iones de plata hacia el torrente sanguíneo, y que estos iones se acumulan en diferentes órganos como el hígado, bazo y riñón lo cual puede causar toxicidad severa y finalmente la muerte (Sardari *et al.*, 2012). En ratas tratadas con AgNPs, se ha reportado que las NPs se pueden acumular en tejidos específicos como bazo, hígado, pulmones y riñones, donde se pueden generar iones Ag. Estos iones pueden ocasionar daño cromosómico, lo que implica una posible genotoxicidad ocasionada por estas NPs (Wen *et al.*, 2017; Taifa *et al.*, 2022). Además, bien cabe mencionar que se ha demostrado que la administración de NPs metálicas son citotóxicas en ratas Wistar. Existen reportes que indican que AgNPs son biocidas para 198 cepas diferentes de *S. aureus* con una CMI de 14.70 ± 1.19 $\mu\text{g/mL}$ (AgNPs con 10 nm de diámetro) y 9.15 ± 0.13 $\mu\text{g/mL}$ (AgNPs de 20 nm de diámetro). Sin embargo, la histopatología en órganos reveló que la dosis de 2 mg/kg de NPs dañó cerebro, hígado, riñón, corazón, bazo y pulmón; además, se observó que la mayoría de las cepas desarrollaron fuerte resistencia al tratamiento con AgNPs (Elbehiry *et al.*, 2019).

Con la finalidad de disminuir el riesgo de toxicidad hacia células sanas, las AgNPs han sido estudiadas en combinación con otras NPs metálicas, así como también se han evaluado NPs sintetizadas con extractos vegetales. De esta manera se logró demostrar su efecto antimicrobiano al combinarse con CuNPs de manera independiente y combinadas sobre los microorganismos *S. aureus* y *E. coli* (Kalinska *et al.*, 2019). También se determinó que AgNPs y CuNPs evaluadas individualmente y en combinación inhiben la

formación de biopelículas de bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Salmonella spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *E. coli* y *S. aureus*; y que la combinación de NPs genera resultados más efectivos, reduciendo la biopelícula en 100% en una concentración de 200 ppm con una CMI de 12.5 ppm para *S. aureus*, 3.125 ppm para *S. agalactiae* y 6.5 ppm para todos los demás microorganismos (Lange *et al.*, 2012; Hamida *et al.*, 2020). Esto se debe a que, las AgNP son capaces de disminuir la actividad transcripcional de los genes que codifican para la formación de la biopelícula: bcs A, csgA, fliC, motA, wcaF, fimA (Yu *et al.*, 2018).

Asimismo, se ha demostrado que al combinar tratamientos de antibióticos capaces de inhibir síntesis de proteínas con AgNPs, éstas tienen un efecto sinérgico contra *S. aureus* aislado de casos de mastitis bovina (Kazemi *et al.*, 2014).

2.3.4.- Nanopartículas bimetálicas

En la actualidad, las NPs bimetálicas han emergido como una alternativa para mejorar la actividad antimicrobiana de NPs monometálicas con el objetivo de ampliar el espectro de acción y reducción de la toxicidad (Tokonami *et al.*, 2010). Debido a que se componen de dos elementos metálicos en una partícula y exhiben efectos sinérgicos de los metales que las componen, lo que ocasiona la aparición de propiedades biológicas interesantes (Arora *et al.*, 2020).

Diversos estudios han reportado que NPs bimetálicas de Ag y Pt poseen una actividad antimicrobiana satisfactoria contra *S. aureus* y *E. coli*, más baja que la de Ag NPs. Sin embargo, con menor citotoxicidad *in vivo* que estas últimas (Formaggio *et al.*, 2019; Breisch *et al.*, 2019). Así como también se ha evidenciado una propiedad antibacterial incrementada tremendamente con NPs de Ag y Cu contra *Bacillus subtilis*, ya que estos dos metales juntos tienen efecto sinérgico contra bacterias Gram positivas

(Nazerudin *et al.*, 2014). NPs de Ag y Au también han demostrado ser efectivas contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* en vez de las NPs monometálicas (Ramakritinan *et al.*, 2013). Este efecto sinérgico antibacteriano ha sido demostrado en las NPs bimetálicas de Ag-Au, Ag-Cu, Fe-Ag y Cu-Ni (Markova *et al.*, 2013; Argueta-Figueroa *et al.*, 2014; Nazerudin *et al.*, 2014; Perdikaki *et al.*, 2016).

2.4.- Modelos de infección

2.4.1.- Factor de virulencia: Formación de biopelícula

Los microorganismos poseen factores de virulencia que les permiten sobrevivir cuando se encuentran en situaciones adversas, uno de ellos es la formación de biopelículas (Mah *et al.*, 2001). Una biopelícula es una estructura multicelular con composición específica, conformada por agua y sustancia polimérica extracelular que consiste principalmente de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y surfactantes (Zhang *et al.*, 2020). Esto permite que los microorganismos se adhieran fuertemente a superficies bióticas y abióticas, y así la formación de biopelícula es reconocida como protección contra el daño. La matriz de exopolisacárido puede también ser impermeable a antimicrobianos e inhibir su penetración hacia la biopelícula (Mah *et al.*, 2001).

Debido a que las biopelículas son agrupaciones de microorganismos embebidos en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos producida por estos mismos microorganismos, dicha matriz se encuentra irreversiblemente asociada con la superficie a la cual está adherida, que puede ser el tejido de su hospedador. Esto ocasiona la presencia de infecciones crónicas, ya que protege a las bacterias contra los antibióticos, así mismo los microorganismos son más efectivos para invadir cualquier superficie ya sea biótica o abiótica (Zaatout *et al.*, 2020).

2.4.2.- Heridas infectadas

La piel conforma una sexta parte del peso corporal humano y cubre alrededor de 2000 cm² de superficie. Así, es el órgano humano más expuesto a varias amenazas externas. La piel desempeña una función clave para el monitoreo medio ambiental, el mantenimiento térmico y homeostasis físicoquímica, ya que provee defensa activa y pasiva, actuando como un contenedor de nutrientes, y respondiendo a lesiones y golpes. El mantenimiento de las principales funciones de la piel es necesario no sólo para prevenir traumas, pero también para la reparación efectiva de heridas. La diversidad de la microbiota de la piel y el microambiente de la herida puede favorecer la ocurrencia de las infecciones en este tejido, contribuyendo a un nivel incrementado de morbilidad y eventual mortalidad (Vivcharenko *et al.*, 2023).

Cuando la piel es dañada las bacterias pueden infiltrarse fácilmente hasta los tejidos más profundos pudiendo ocasionar infecciones que atenten contra la vida. Una herida puede representar una simple o varias alteraciones de un órgano o tejido y puede diseminarse a otros tejidos y estructuras anatómicas. La causa más común e impedimento inevitable para la sanación de heridas es la instalación de una infección (Negut *et al.*, 2018).

El objetivo final del proceso de sanación de una herida es eliminar al microorganismo invasor y limpiar la herida de las células dañadas, las cuales permiten la restauración de la función más importante de la piel, actuar como una barrera que proteja al cuerpo contra el ambiente externo (Vivcharenko *et al.*, 2023). El proceso de regulación fisiológica de la sanación de heridas en la piel requiere de sincronización intrincada de diferentes mediadores y tipos celulares. La interacción entre citocinas, quimiocinas, matrices extracelulares, factores de crecimiento celulares, y otras moléculas regulatorias

son cruciales en el proceso de eliminación de la infección en heridas (Vivcharenko *et al.*, 2023).

La incidencia de heridas infectadas aumenta constantemente, así como el interés clínico y económico en encontrar terapias efectivas. La prevalencia de todas las heridas crónicas se asume que va del 1 al 2% de la población en el 2018, y que los cuidados de salud van hasta los 96.8 mil millones de dólares en EUA. Las heridas crónicas impactan en la calidad de vida de los pacientes disminuyéndola. Una de las causas que impiden la sanación de la herida es la formación de biopelícula, que tiene una prevalencia del 75% (Kaiser *et al.*, 2023).

Microorganismos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son las principales bacterias responsables de ocasionar infecciones en heridas (Vivcharenko *et al.*, 2023; Kaiser *et al.*, 2023). *Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positiva que tiene una gran repercusión sobre la salud humana y animal causando varias enfermedades. *S. aureus* está presente como microbiota normal de la piel y membranas mucosas de humanos y animales, pero puede causar enfermedad cuando alcanza la oportunidad de invadir, ya sea debido a un trauma o a un deterioro de la respuesta inmune del huésped. Diferentes factores de virulencia están involucrados en el mecanismo de patogénesis de *S. aureus*, los cuales incluyen proteínas de superficie, formación de biopelícula, enzimas, toxinas y otros. Esos factores de virulencia juegan un importante rol en invasión, colonización y supervivencia de *S. aureus* en el huésped para ocasionar enfermedades estafilocócicas. Infecciones por *S. aureus* son una importante amenaza a la salud pública debido a su capacidad de causar enfermedades leves a graves o potencialmente mortales (Pal *et al.*, 2020).

2.4.3.- Mastitis bovina

La mastitis es una enfermedad caracterizada por infección e inflamación de la glándula mamaria causada por múltiples factores, que se pueden clasificar en dos grupos: el primero es el que contempla a la mastitis ocasionada por microorganismos y el segundo a la ocasionada por procedimientos tecnológicos aplicados incorrectamente durante la ordeña, desórdenes metabólicos, heridas en la ubre y varios factores de estrés (Adkins y Middleton, 2018; Holko *et al.*, 2019). Es más común la mastitis ocasionada por uno o varios potenciales patógenos (Dias *et al.*, 2013), ya que la leche es un excelente medio de cultivo para muchos microorganismos (Coppock, 2019). Sea cual sea la causa de la mastitis, ésta se caracteriza por el daño que sufre el tejido parenquimal de la ubre, lo que trae como consecuencia una reducción sobre el número y actividad de las células epiteliales, que ocasiona una disminución en la producción de leche (Zhao y Lacasse, 2008).

Hoy en día se han identificado 137 microorganismos diferentes causantes de mastitis bovina, incluyendo bacterias, virus, levaduras y algas, siendo las bacterias los principales agentes causales de la enfermedad (95 %; Watts, 1988). Las bacterias que ocasionan las formas más comunes de mastitis son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma spp.* y *Klebsiella spp.* (Bradley *et al.*, 2002; Heikkilä *et al.*, 2018; Dalanezi *et al.*, 2020; El-Sayed-Kamel 2021).

Varias nanopartículas metálicas han sido evaluadas para demostrar su actividad antimicrobiana contra patógenos causantes de mastitis, al menos de manera *in vitro*, tal es el caso de NPs de ZnO (Hozyen *et al.*, 2019); oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), platino (Pt) y CuO (Wernicki *et al.*, 2014; Kalinska *et al.*, 2019; Ul-Hamid *et al.*, 2022). Sin

embargo, no todos los resultados obtenidos han sido alentadores, ya que existen algunos microorganismos que no han logrado ser lisados por estas NPs. Además, la toxicidad de algunas NPs metálicas como las de Ag y Cu es demasiado alta y genera efectos secundarios adversos al administrarlas (Shakibaie *et al.*, 2019; Elbehiry *et al.*, 2019; Wen *et al.*, 2017; Taifa *et al.*, 2022), por lo que es necesario llevar a cabo más experimentos para demostrar la seguridad de la aplicación de las NPs en organismos vivos.

2.4.4.- Sepsis

La sepsis es un síndrome clínico que resulta de una interacción compleja entre el huésped y los agentes infecciosos que se caracteriza por la presencia de una respuesta inflamatoria sistémica descontrolada, incluidas la red de citocinas y la coagulación. Es decir, es una complicación grave de una infección bacteriana que pone en riesgo la vida (Thamphiwatana *et al.*, 2017; Poli-de-Figueiredo *et al.*, 2008). Es la principal causa de muerte en pacientes críticos y la tasa de mortalidad es muy alta, hasta un 70% (Doi *et al.*, 2009). Afecta principalmente a pacientes quirúrgicos y víctimas de traumatismos, a pesar de todas las mejoras técnicas y los avances en los tratamientos de apoyo. Este cuadro clínico afecta aproximadamente a 700, 000 personas al año y es responsable de unas 210, 000 muertes al año en E.U.A., lo que contribuye a un gasto sanitario anual de 16, 700 mil millones de USD (Garrido *et al.*, 2004).

No obstante, a pesar de los avances en dispositivos de monitorización, herramientas de diagnóstico y nuevas opciones terapéuticas la sepsis sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, este cuadro clínico culmina con un colapso de la función cardiovascular, llevando a falla multiorgánica, que es la vía final de los cambios hemodinámicos sistémicos y regionales provocando alteraciones generalizadas que conducen a un desacoplamiento entre el flujo sanguíneo y

los requisitos metabólicos (Poli-de-Figueiredo *et al.*, 2008; Thamphiwatana *et al.*, 2017), lo que finalmente ocasiona la muerte del individuo.

Actualmente, se han llevado a cabo extensas investigaciones clínicas en animales para abordar la fisiopatología y el tratamiento de la sepsis grave y el choque séptico. Sin embargo, a diferencia de muchos estudios preclínicos, la mayoría de los ensayos clínicos de nuevas estrategias de tratamiento prometedoras para la sepsis no han logrado demostrar eficacia (Poli-de-Figueiredo *et al.*, 2008). Aunque muchas razones podrían explicar esta discrepancia, la realidad es que hoy en día no se cuenta con una herramienta adecuada para combatir este cuadro clínico, es por esto por lo que, es necesario seguir indagando sobre el tema en cuestión.

Con base en estos antecedentes ha surgido la hipótesis de que la elaboración de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto y plata posee efecto antimicrobiano contra diversos modelos de infección sin ocasionar daño en el tejido a tratar.

3.- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los antibióticos son la principal terapia para combatir las enfermedades infecciosas. Sin embargo, debido al aumento de la resistencia a los antimicrobianos (RAM), su empleo se ha vuelto ineficiente. Debido a la RAM las opciones terapéuticas para infecciones comunes son cada vez más limitadas o no disponibles cuando éstas son ocasionadas por bacterias multirresistentes, por lo que eventualmente se encuentra en riesgo la vida. En el campo de la salud humana y animal es preponderante el desarrollo de nuevos compuestos con actividad microbica que eviten la aparición de nuevas cepas resistentes a diversos antimicrobianos y, que ayuden a combatir de manera eficiente las infecciones ocasionadas por patógenos. Por lo tanto, se propone evaluar el efecto bactericida de nanopartículas metálicas de bismuto y plata sobre diversos modelos de infección y su efecto sobre el sistema inmune.

4.- HIPÓTESIS

La formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto y plata posee efecto antibacteriano sobre diversos modelos de infección.

5.- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto/plata sobre diversos modelos de infección bacterianos.

Objetivos específicos

- 1.- Sintetizar y caracterizar nanopartículas metálicas de bismuto y plata.
- 2.- Determinar la actividad antimicrobiana de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto/plata sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en modelos de infección *in vitro* e *in vivo*.
- 3.- Determinar el efecto citotóxico de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto/plata sobre líneas celulares representativas de los tejidos a tratar.
- 4.- Evaluar el efecto de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto y plata sobre la producción de citocinas proinflamatorias en un modelo *in vitro*.
- 5.- Evaluar el efecto de una formulación a base de nanopartículas metálicas de bismuto y plata sobre la capacidad fagocítica de PBMC.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Síntesis de nanopartículas

Las nanopartículas metálicas fueron sintetizadas en una relación molar $\text{Bi}_{0.8}\text{Ag}_{0.2}$ mediante reducción química. Los reactivos empleados para la síntesis fueron grado analítico, se utilizaron soluciones de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (número de catálogo NBP100 de Chemika reagents) y AgNO_3 (número de catálogo NIPL50 de Chemika reagents) como precursores metálicos y como agente reductor fue utilizado ácido ascórbico (1% p/v; número de catálogo A7506 de Sigma, St Louis, MO, USA). Además, ácido cítrico (10% p/v, número de catálogo C-0759 de Sigma, St Louis, Mo, USA), ácido tartárico (0.6% p/v, número de catálogo A3125 de Jalmek, San Nicolás de los Garza, México) y, quitosano de peso molecular medio (0.5% p/v, número de catálogo 448877 de Sigma, St Louis, MO, USA) fueron adicionados. Estas soluciones se colocaron juntas en una caja Petri de poliestireno desechable. La reacción en solución acuosa se realizó utilizando como fuente de energía radiación UV con una intensidad de $900,000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ durante 20 min en un equipo UV Crosslinker (modelo CL-1000, UVP, Cambridge, UK).

6.2 Caracterización de nanopartículas de bismuto/plata

El plasmón de resonancia superficial (SRP, por sus siglas en inglés) de las nanopartículas de bismuto/plata (Bi/Ag NPs) fue analizado mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis). Las mediciones se realizaron en un espectrómetro NanoDropTM2000 en cubetas de poliestireno desechables, en el rango de 200 a 700 nm de longitud de onda. La técnica de dispersión de luz dinámica fue utilizada para determinar el diámetro hidrodinámico promedio en una dilución de la muestra 1:10,000 (NPs:agua); la carga eléctrica y el potencial zeta fueron establecidos utilizando el instrumento

ZetaSizer Nano ZS90. El tamaño individual promedio de las nanopartículas metálicas fue evaluado por un histograma de distribución de tamaños de las mediciones del diámetro de 100 NPs Bi/Ag a partir de microscopías electrónicas de barrido (SEM) con 100,000 magnificaciones. La morfología de las nanopartículas fue determinada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) con 500,000 magnificaciones. La composición elemental de las nanopartículas fue determinada con un TEM equipado con un aparato de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) y el análisis composicional fue determinado mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) (Ultra DLD, Shimadzu, Ltd., Kyoto, Japan).

6.3 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de NPs Bi/Ag para *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fue determinada mediante el método de microdilución en caldo, de acuerdo con Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013). Brevemente, una placa estéril, de poliestireno desechable de 96 pozos con fondo curvo fue inoculada con 10^5 UFC/mL de cada cepa bacteriana en caldo Mueller-Hinton con diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.86, 1.2, 1.5, 1.72, 2.3, 2.9, 3.44, 6.88, 13.76, 27.52 y 55.05 $\mu\text{g/mL}$). La placa fue incubada a 37°C durante 24 horas. Posteriormente fue registrada la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm. La CMI fue considerada como la concentración en la cual no se observó crecimiento bacteriano. El inóculo con el mismo número de UFC con gentamicina (10 $\mu\text{g/mL}$) pero sin tratamiento de NPs Bi/Ag fue usado como control de inhibición del crecimiento de microorganismos. Este ensayo fue realizado por triplicado. Para determinar la CMB, de

cada pozo tratado con NPs Bi/Ag sin aparente crecimiento bacteriano (basado en turbidimetría) se tomó una alícuota de 10µL y se inoculó en una caja Petri con agar Mueller-Hinton mediante el método de extendido en placa. La caja fue incubada a 37°C por 24 horas, y la concentración a la cual no hubo crecimiento de UFC fue tomada como CMB.

6.4 Integridad de membrana

La integridad de la membrana fue evaluada mediante liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) utilizando el kit CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (PROMEGA con número de catálogo G1780), siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, 10⁵ UFC/mL de cada cepa bacteriana (*E. coli* ATCC 11229 y *S. aureus* ATCC 29213) fueron inoculadas individualmente en una placa estéril de 96 pozos de poliestireno desechable con fondo curvo con concentraciones sub-inhedoras de NPs Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.86 y 1.72 µg/mL para *S. aureus* y 0.22, 0.43, 0.86, 1.72 y 3.44 µg/mL para *E. coli*) y se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este lapso, la placa se centrifugó a 250xg por 4 min, y se transfirió una alícuota de 50 µL del sobrenadante a una placa nueva de 96 pozos con fondo plano. Entonces, 50 µL del reactivo CytoTox 96 fue adicionado a cada pozo (la placa se colocó a temperatura ambiente y fue protegida de la luz durante 30 min). Luego, 50 µL de solución de paro fue añadida a cada pozo e incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la liberación de LDH fue determinada mediante DO a 490 nm de longitud de onda. Para determinar la máxima liberación de LDH, 10µL de solución de lisis (9% v/v Triton X-100) provista por el kit fue adicionada a 10⁵ UFC/mL de cada cepa bacteriana (*E. coli* ATCC 11229 y *S. aureus* ATCC

29213), la cual fue crecida en caldo Mueller-Hinton por 24 h. Cada medición fue realizada por duplicado.

6.5 Ensayo de formación de biopelícula

La técnica de microplaca estática fue utilizada para la determinación semicuantitativa de formación de biopelícula utilizando *S. aureus* ATCC 29213 por tinción de cristal violeta. El ensayo de biopelícula fue solamente realizado en la cepa de *S. aureus*, debido a que es un fuerte productor de biopelícula, factor de virulencia crucial para el establecimiento de infecciones (Ou *et al.*, 2020); mientras que *E. coli* es considerada como una cepa productora de biopelícula moderada-débil (Risal *et al.*, 2018). Para este ensayo, *S. aureus* fue reactivada después de descongelación en caldo nutritivo e incubada a 37°C durante 24 h, transcurrido este lapso, la bacteria se sembró en placas Petri con agar sangre mediante el método de estría cerrada y se incubó a 37°C por 24 h, dos veces más. La cepa fue ajustada a un estándar de 0.5 en escala de McFarland y diluida 1:100 (1.5×10^6 UFC/mL) en caldo tripticasa de soya (TSB, por sus siglas en inglés) suplementado con 1% de glucosa. Posteriormente, en una placa estéril de poliestireno desechable de 96 pozos de fondo plano (sin adherencia), 100 µL de la dilución bacteriana fueron colocados en cada pozo, así como concentraciones sub-inhedoras de NPs Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.86 y 1.72 µg/mL) con TSB estéril suplementado con 1% de glucosa. Después, la placa fue incubada durante 24 h a 37°C sin agitación. A continuación, el sobrenadante fue removido, y las células adherentes fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril. Luego, la biopelícula formada fue fijada con 200 µL de metanol durante 15 min, transcurrido este tiempo, 200 µL de cristal violeta al 0.1% (p/v) fueron utilizados para teñirla por 15 min. Posteriormente, los pozos fueron lavados de cinco a diez veces con agua destilada estéril

para remover el exceso de cristal violeta. Finalmente, la placa se secó a 60°C, y la biopelícula teñida fue disuelta en 200 µL de una solución de etanol: acetona (30:70), para así, registrar la DO de 595 nm de longitud de onda. Una alícuota de TSB con 1% de glucosa fue utilizada como control de esterilidad, y otra alícuota de inóculo bacteriano con TSB estéril con 1% de glucosa y gentamicina (10 µg/mL) fue utilizada como control negativo. La formación de biopelícula de *S. aureus* en TSB suplementado con 1% de glucosa fue considerada como control positivo (100% formación de biopelícula). La capacidad de inhibición en la formación de biopelícula de las NPs Bi/Ag fue evaluada sobre tres diferentes días, dependiendo del tiempo en el cual las nanopartículas habían sido sintetizadas (7, 14 y 48 días), con la finalidad de establecer el tiempo en el cual las NPs son más efectivas. Cada ensayo (por día) fue realizado por duplicado.

6.6 Ensayo de viabilidad celular

El efecto de las NPs Bi/Ag sobre la viabilidad celular fue determinado mediante el ensayo Alamar Blue. Para esto, líneas celulares endotelial (HUVEC, número de catálogo CRL-1730), de fibroblastos (NIH/3T3, número de catálogo CRL-1658) y epiteliales de glándula mamaria (MCF7, número de catálogo HTB-22) fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, United States). Las líneas celulares fueron mantenidas in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de solución de antibiótico-antimicótico. Las células fueron crecidas hasta un 80% de confluencia en incubadora a 37°C con atmósfera húmeda, 5% de CO₂ y 95% aire. Las células fueron plaqueadas con densidades celulares de 2x10⁴, 1x10⁴ y 5x10³ en placas de 96 pozos con fondo plano e incubadas a las condiciones antes mencionadas durante 24 h. Después de la incubación, el medio de cultivo fue removido,

las células fueron enjuagadas con PBS y tratadas con diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag NPs (1.72 y 3.44 $\mu\text{g/mL}$). El tratamiento fue preparado en medio para cultivo celular DMEM. La línea celular HUVEC también fue evaluada a otras concentraciones de NPs Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.86, 1.72, 3.44, 6.88, 13.76, 19.52 y 27.52 $\mu\text{g/mL}$). La placa fue incubada durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO_2 . Entonces, el sobrenadante fue removido, y las células fueron enjuagadas con PBS estéril. El porcentaje de viabilidad celular relativa fue comparado con células de la misma línea celular sin tratamiento de NPs Bi/Ag. Para obtener este porcentaje, 100 μL de medio DMEM con 20% (v/v) de Alamar Blue fueron adicionados a cada pozo y la placa fue incubada durante 2 h a 37°C en una incubadora humidificada con 5% CO_2 (protegida de la luz). Finalmente, la intensidad de fluorescencia fue leída en un lector de placas utilizando una longitud de onda de excitación de 530nm y de emisión de 590nm. Cada ensayo con diferentes concentraciones se realizó por triplicado. La línea celular sin tratamiento fue considerada como el 100% para obtener la viabilidad relativa. En cada placa se colocó un blanco para sustracción.

Con la finalidad de complementar el estudio se determinó la viabilidad celular en la línea de epitelio mamario diferenciado, MCF7, mediante el método de sulforrodamina B (SRB), debido a que este ensayo permite determinar la densidad celular basado en el contenido de proteína presente. Brevemente, se sembraron 1×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pozos, se trataron con diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag (0.00, 0.22, 0.44, 0.88, 1.72 y 3.44 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Transcurrido este lapso, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) frío (4°C) al 10% y se incubaron durante 60 min a 4°C, posteriormente se lavaron cinco veces con agua

desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. Después se tiñeron con SRB al 0.4% p/v en ácido acético al 1% y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min. Con la finalidad de retirar el exceso de SRB se enjuagaron los pocillos cinco veces con ácido acético al 1% y se permitió secar. Luego, se solubilizó la SRB con una solución de Tris base pH=10.5, agitando la placa por al menos 15 min y se determinó la DO a 540 nm de longitud de onda. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

6.7 Determinación de citocinas

Las citocinas IL-6 e IL-8 se cuantificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo celular de la línea MCF7 tratadas con las CMB de las NPs Bi/Ag para *S. aureus* (1.72 µg/mL) y *E. coli* (3.44 µg/mL). Para esto se cultivaron 1×10^5 células por pozo en una placa de 96 pozos y se trataron durante 5 h con las concentraciones de NPs Bi/Ag antes mencionadas. Como control de inflamación se utilizaron 100 ng de lipopolisacárido (LPS) y como control negativo las células sin tratamiento, únicamente con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico/antimicótico 1X. Una vez transcurridas las 5h los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -20°C hasta su posterior análisis.

Los niveles de citocinas se determinaron con el kit de citocinas inflamatorias humanas BD Cytometric Bead Array (CBA; BD Horizon, California, Estados Unidos, con número de catálogo 551811) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se colocaron 50µL de sobrenadante de cada muestra a analizar en un tubo de poliestireno desechable nuevo, luego se añadieron 50 µL de la mezcla de reactivos de las perlas de captura de las seis citocinas para posteriormente mezclar con 50 µL del reactivo de detección de ficoeritrina. Los tubos se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 3 horas para luego ser lavados con 1mL de solución de lavado (provista por el kit)

y se centrifugó a 1600 rpm durante 10 min. Entonces, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen final de 300 μ L con solución de lavado. Bien cabe mencionar que se realizó la curva de calibración de cada una de las citocinas provistas en el kit y que el diluyente fue utilizado como blanco.

La lectura se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD Accuri TM C6 (BD Horizon, California, Estados Unidos). El análisis de los datos obtenidos se realizó en el software CFlow plus (BD Biosciences, California, Estados Unidos).

6.8 Fagocitosis en PBMC bovinas

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de bovinos fueron aisladas a partir de sangre colectada con heparina como anticoagulante, para ello se colocaron 2.5×10^5 células por pozo en una placa de 96 pozos en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Las PBMC se trataron con dos diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag: 1.72 y 3.44 μ g/mL (CMB de las NPs Bi/Ag contra *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente) y como control se utilizaron PBMC sin tratamiento. Las NPs Bi/Ag se mantuvieron durante 24 horas en condiciones estándar de incubación y posteriormente se retiró el tratamiento, se enjuagaron las células con PBS 1X estéril. Del total de las PBMC, 1.25×10^5 células se utilizaron para determinar viabilidad celular mediante en el ensayo de captación con rojo neutro y las otras 1.25×10^5 fueron utilizadas para evaluar fagocitosis mediante el kit comercial Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC) con número de catálogo 500290 (Cayman Chemical, Michigan, Estados Unidos de América). Para evaluar la viabilidad celular se determinó la capacidad de captación lisosomal, para lo cual se colocaron 100ng de LPS junto con rojo neutro (25 μ g/mL) en RPMI, luego las PBMC se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 2 horas, una vez transcurrido el período de

incubación se retiró el rojo neutro, se enjuagó dos veces con PBS 1X estéril. Entonces, se lisaron las células con la finalidad de liberar el colorante captado por los lisosomas, para ello se colocaron 100µL por pozo de solución de desorción (1% de ácido acético glacial, 50% de etanol y 49% de agua), se agitó la placa a 80 rpm durante 30 min protegida de la luz, transcurrido este tiempo se dejó en reposo por 5 minutos y se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 540nm.

El resto de las PBMC tratadas con NPs Bi/Ag durante 24 h (1.25×10^5) se utilizaron para realizar el ensayo de fagocitosis siguiendo las indicaciones del fabricante del kit comercial Phagocytosis Assay Kit (IgG FITC). Brevemente, las PBMC se incubaron con el complejo de perlas de látex y anticuerpo IgG-FITC diluido en un título 1:200 durante 3 horas a 37°C estimuladas con LPS. Las perlas no unidas se enjuagaron con PBS 1X estéril y se adicionó azul tripán proporcionado por el kit durante 2 minutos para corroborar la viabilidad celular. La fagocitosis se cuantificó mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri TM C6 (BD Horizon, California, Estados Unidos de América). El análisis de los datos obtenidos se realizó en el software CFlow plus (BD Biosciences, California, Estados Unidos de América).

6.9 Modelo de infección

6.9.1 Animales

Ratones BALB/c hembra fueron empleadas para los experimentos *in vivo*. Los animales se mantuvieron en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, con agua y alimento *ad libitum*. Cinco animales fueron utilizados por grupo experimental para todos los modelos. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio

NOM-062-ZOO-1999 y aprobados por el Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal (CEIBA).

6.9.2 Modelo de herida infectada

El modelo murino de herida infectada se realizó de acuerdo con Adibhesami *et al.* (2017) con algunas modificaciones, los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de ketamina (75mg/kg) y xilacina (15mg/kg). La superficie dorsal se afeitó y desinfectó con etanol al 70% v/v; luego, una escisión de 5 a 6 mm de diámetro se realizó en la piel para crear la herida. Los ratones se asignaron aleatoriamente en cuatro grupos: Grupo 1 como control de herida infectada con *S. aureus* sin tratamiento, Grupo 2 como herida infectada con *S. aureus* tratada con 22.02 µg NPs Bi/Ag, Grupo 3 como control de herida infectada con *E. coli* sin tratamiento y, Grupo 4 como herida infectada con *E. coli* tratada con 22.02 µg NPs Bi/Ag. Inmediatamente después de la creación de la herida, se inoculó con 5×10^5 UFC de cada cepa bacteriana. El inóculo se mantuvo durante 2 horas en el sitio de la herida para el establecimiento de la infección, y posteriormente se aplicó el tratamiento tópicamente con las NPs Bi/Ag y se aplicó diariamente durante 5 días. El sacrificio de los ratones se realizó al 7mo. día después del establecimiento de la infección, y la carga bacteriana en el sitio de la herida se determinó a partir de una biopsia de la herida infectada y tratada. La biopsia se colocó en 5mL de solución salina estéril, y la suspensión bacteriana obtenida fue diluida en serie en un factor de 1:10 y sembrada por el método de extendido en placa en agar Sal Manitol para crecimiento de *S. aureus* y agar EMB para *E. coli* con la finalidad de cuantificar la carga bacteriana.

Adicionalmente, las biopsias se fijaron en 10% de solución amortiguadora de formaldehído y sometida a varios pasos de procesamiento histológico incluida la tinción tricrómica de Masson. La expresión de colágeno se cuantificó como el porcentaje del área

teñida de color azul en las fotografías de campo claro utilizando el software ImageJ con la función deconvolución de color por el complemento FIJI. Es importante mencionar que otros grupos de ratones fueron tratados de manera similar para monitorearlos hasta la sanación clínica de la herida (Día 10).

6.9.3 Modelo de sepsis

Los ratones fueron asignados aleatoriamente dentro de tres grupos: Grupo 1 control, ratones sin infección solamente tratados con 22.02 µg de NPs Bi/Ag administradas intraperitonealmente; Grupo 2, ratones con sepsis tratados con PBS estéril administrado intraperitonealmente; Grupo 3, ratones con sepsis tratados con inyección intraperitoneal de 22.02 µg de NPs de Bi/Ag. Los ratones fueron mantenidos en jaulas de polipropileno bajo condiciones estándar con una temperatura de 24°C, 50% de humedad relativa, y control de ciclos de luz y oscuridad (12h:12h). El alimento y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante 24 horas. El Grupo 2 se inoculó intraperitonealmente con 3×10^9 UFC de la cepa *E. coli* ATCC 11229, y de manera simultánea PBS estéril se administró. El grupo 3 se inoculó intraperitonealmente con 3×10^9 UFC de la cepa *E. coli* ATCC 11229 y 22.02µg de NPs Bi/Ag fueron administradas simultáneamente. Una segunda dosis de PBS estéril (Grupo 2) o NPs Bi/Ag (Grupo 3) se administró después de 2 horas de la inoculación con *E. coli*. Los ratones se monitorearon durante 24 horas.

6.9.4 Modelo de mastitis in vitro

Leche no pasteurizada de bovino se obtuvo del establo lechero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las muestras de leche fueron transportadas en hielo al laboratorio y mantenidas a 4°C hasta que el ensayo se realizó. Diez mL de leche se colocaron en frascos de vidrio estériles y se inocularon con 1.5×10^5 UFC/mL de la cepa *S. aureus* ATCC 29213; y fueron tratados con NPs Bi/Ag a CMB (las

NPs se colocaron al mismo tiempo que el inóculo bacteriano); 100µg/mL de gentamicina fueron utilizados como control positivo de inhibición y leche no tratada se utilizó como control negativo. La leche se mantuvo durante 24 horas a 37°C, y la carga bacteriana promedio se determinó por método de extendido en placa mediante diluciones seriadas con un factor de dilución de 1:100 en agar sal manitol.

6.9 Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de integridad de membrana, viabilidad celular y producción de citocinas inflamatorias se analizaron utilizando una prueba ANOVA de una sola vía y se realizaron comparaciones múltiples de Tukey entre las medias; mientras que los datos del ensayo de formación de biopelículas se analizaron mediante una prueba ANOVA de dos vías y la comparación entre medias se realizó mediante comparaciones múltiples de Tukey. Los datos de captación de rojo neutro se analizaron mediante una prueba ANOVA de una sola vía y la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Dunett. Los datos de fagocitosis se analizaron mediante la prueba no paramétrica Mann-Whitney. Los datos de expresión de colágeno se analizaron mediante una prueba t de Welch. Para todos los análisis las medias se consideraron significativamente diferentes con un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, Estados Unidos).

7.- RESULTADOS

7.1 Caracterización de nanopartículas de bismuto/plata

Se obtuvieron nanopartículas de bismuto y plata a partir de una sola reacción en medio acuoso mediante síntesis química. El plasmón de resonancia superficial (SPR) de estas nanopartículas se caracterizó mediante espectroscopía UV-Vis y mostró dos bandas máximas de absorbancia en las longitudes de onda de 257 nm y 411 nm. Las nanopartículas se mantuvieron estables durante al menos 28 días después de su síntesis (Figura 2).

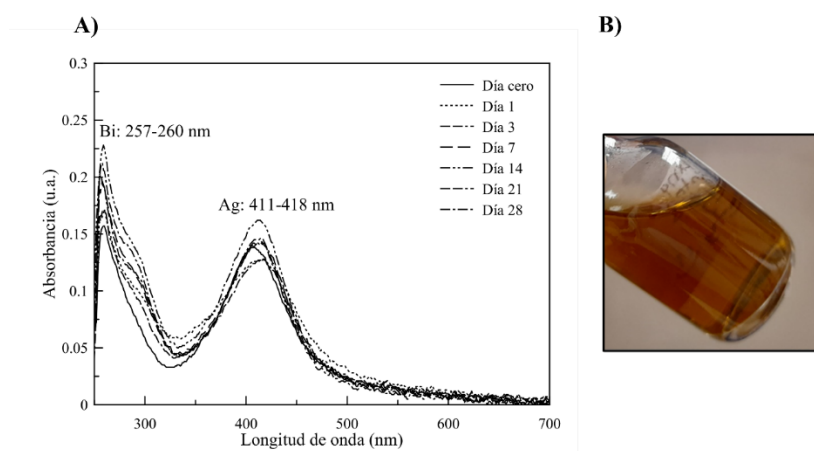


Figura 2. Estabilidad de las nanopartículas Bi/Ag. La estabilidad de las nanopartículas de bismuto y plata fue monitoreada durante 28 días mediante espectroscopía de absorción UV-Vis (A). Imagen representativa de las nanopartículas de Bi_{0.8}Ag_{0.2} (B).

Luego se determinó el tamaño hidrodinámico promedio utilizando la técnica DLS: 10.15 nm para las nanopartículas de bismuto (NPs Bi) y 8.06 nm para las nanopartículas de plata (NPs Ag). El potencial zeta obtenido fue: +39.3 y +39.4 mV para las NPs Bi y Ag, respectivamente; y el índice de polidispersidad fue: 0.370 y 0.357 para las NP de Bi y Ag, respectivamente (Cuadro 1), así se observó que, el sistema de nanopartículas sintetizado adquiere estabilidad al séptimo día después de la síntesis.

Días después de la síntesis	Nanopartículas	Diámetro hidrodinámico promedio (nm)	Índice de polidispersidad (PDI)	Potencial Zeta (mV)
Día 0	Bi	242.5	0.529	39.3
	Ag	162.5	0.583	42.2
Día 1	Bi	45.26	0.424	39.2
	Ag	15.74	0.410	39.6
Día 4	Bi	72.31	0.234	38.8
	Ag	3.4	0.328	37.8
Día 7	Bi	10.15	0.370	39.3
	Ag	8.061	0.357	39.4
Día 14	Bi	10.29	0.470	36.0
	Ag	9.69	0.438	36.7
Día 21	Bi	8.553	0.479	33.9
	Ag	13.64	0.410	32.0

Cuadro 1. *Parámetros fisicoquímicos de las nanopartículas Bi/Ag.* Diámetro hidrodinámico promedio, índice de polidispersidad y potencial zeta de las nanopartículas sintetizadas durante 21 días. Se resalta en negritas el día donde las NPs Bi/Ag adquieren estabilidad.

El tamaño individual promedio de las NPs Bi/Ag se determinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con 100, 000 magnificaciones. Un histograma de distribución de tamaños se construyó utilizando el software ImageJ versión 1.53 a partir de la medición de 100 NPs Bi/Ag 7 días después de la síntesis (cuando las NPs Bi/Ag alcanzaban estabilidad, como se muestra en el Cuadro 1). El tamaño individual promedio

obtenido fue de 18.39 ± 7.49 nm; mediante el análisis TEM se determinó que las NPs Bi/Ag poseen una morfología cuasi-esférica (Figura 3).

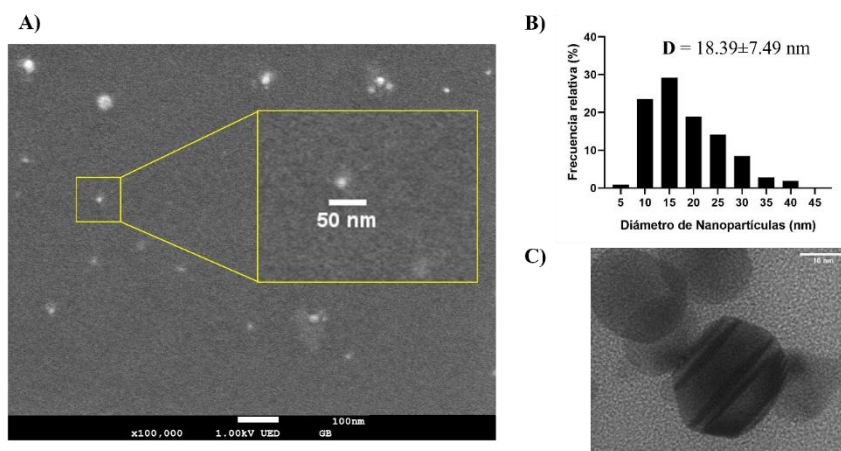


Figura 3. Micrografía electrónica de las nanopartículas Bi/Ag. Micrografía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas sintetizadas (A). Distribución de tamaño de nanopartículas de Bi/Ag determinada por SEM. D: diámetro individual promedio y desviación estándar de las nanopartículas (B). Micrografía electrónica de transmisión de nanopartículas de Bi/Ag cuasi-esféricas con un tamaño promedio de 18.39 nm (C).

El análisis elemental de NPs Bi/Ag se realizó para determinar las concentraciones atómicas de las cuales estaban conformadas dichas NPs. En el sistema de NPs Bi/Ag sintetizado se obtuvieron tres poblaciones diferentes: plata (11%), bismuto (33.4%) y NP bimetalicas de bismuto y plata (55.6%, Figura 4).

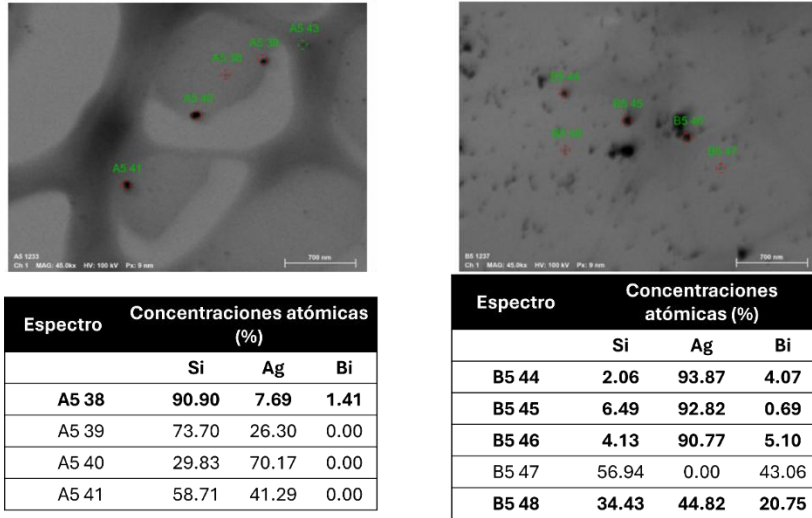


Figura 4. *Análisis elemental de las nanopartículas Bi/Ag.* Concentraciones atómicas determinadas por análisis elemental de las nanopartículas sintetizadas. La presencia de tres poblaciones de nanopartículas en la solución fue determinada: nanopartículas monometálicas de bismuto en un 11%, monometálicas de plata en un 33.4 % y nanopartículas bimetalicas de bismuto y plata en un 55.6 %.

La presencia de nanopartículas bimetalicas fue confirmada mediante el espectro EDS determinado por TEM, que también se utilizó para determinar el perfil de línea de intensidad extraído de las NPs bimetalicas individuales (Figura 5).

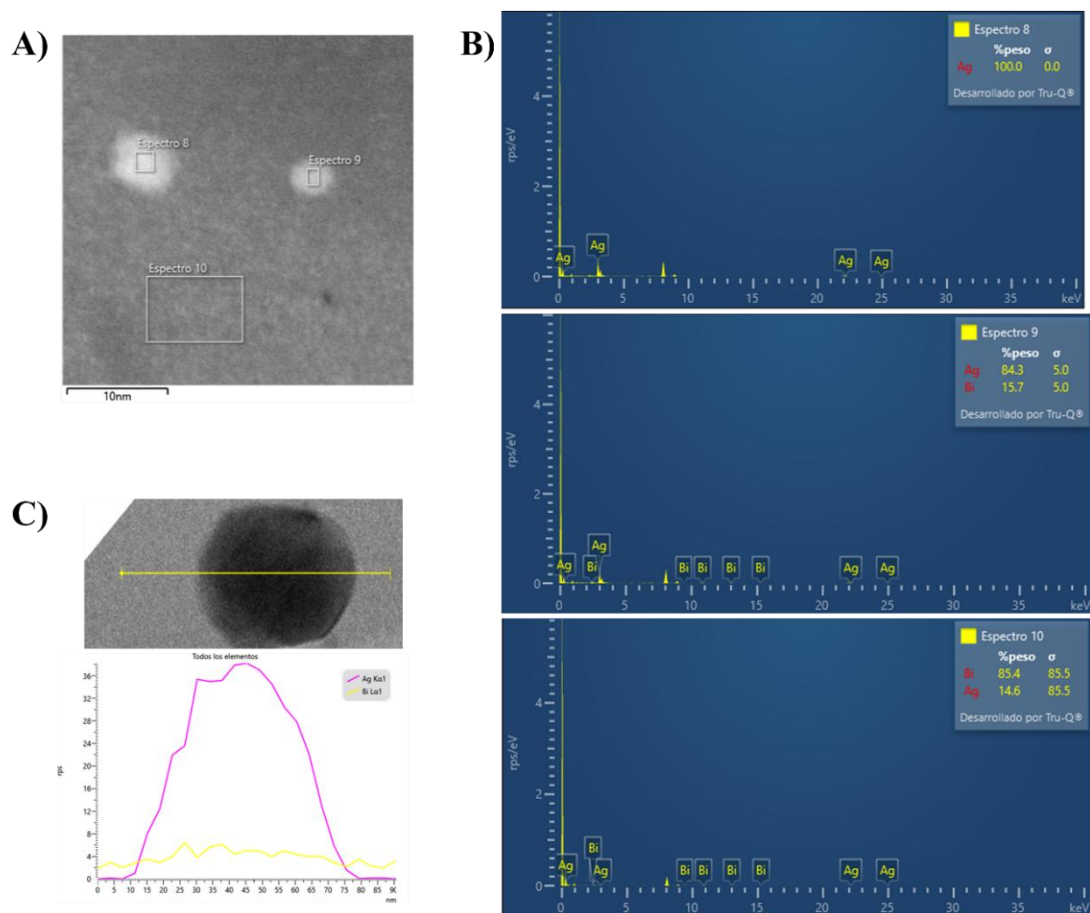


Figura 5. Espectro EDS determinado por TEM de las nanopartículas Bi/Ag. Microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) en campo oscuro (A) y espectro EDS en la selección de la sección transversal (B). Perfil de línea de intensidad extraído de la región en línea amarilla en los mapas elementales obtenidos utilizando EDS.

El estado químico de bismuto y plata presentes en las nanopartículas fue determinado por análisis XPS, donde se muestra la presencia de Bi, Ag, C y O (Figura 6). Los espectros XPS de alta resolución en el nivel del código de electrones Bi (4f) mostraron dos picos asimétricos a 164.58 y 159.48 eV correspondientes a Bi (4f_{5/2}) y Bi (4f_{7/2}), respectivamente. La separación entre los picos de las regiones Bi(4f) fue de 5.1 eV, lo que concuerda con presencia de Bi₂O₃; se observó la ausencia de bismuto metálico, ya que

éste se caracteriza por una separación entre picos de 5.3 eV y la presencia de un pico en la región Bi4f de 157 eV (Ling *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2017). En el caso del Ag(3d), se confirmó la presencia de plata metálica ($\Delta = 6.0$ eV).

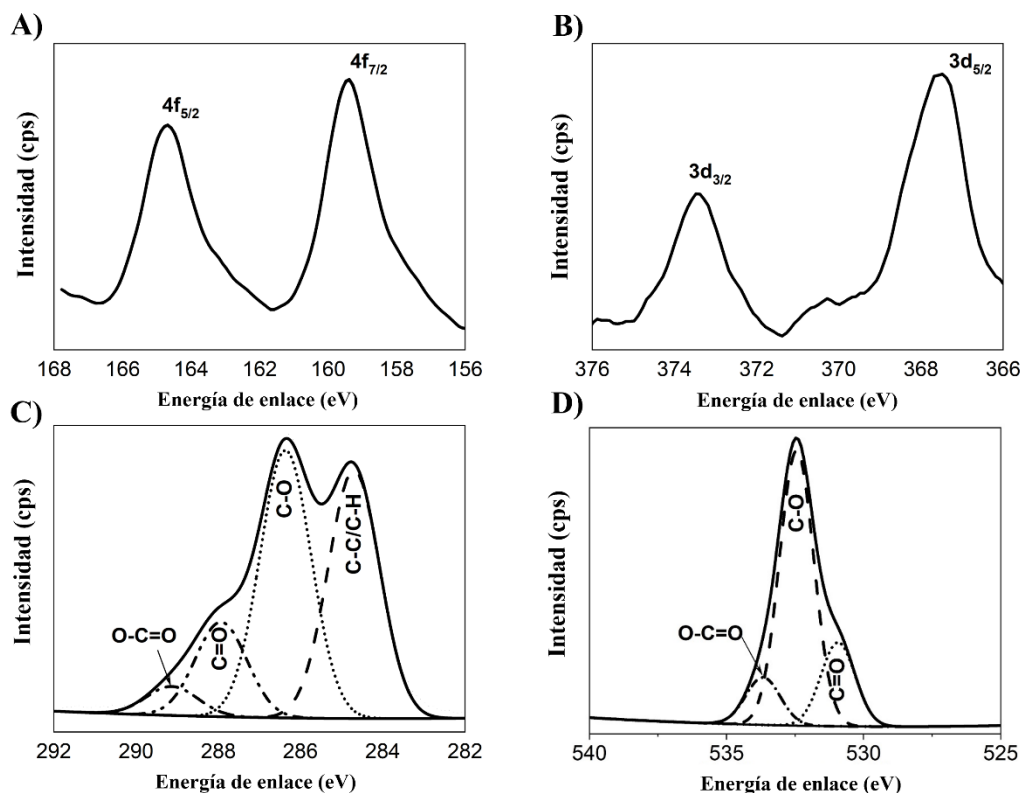


Figura 6. Espectro XPS de las nanopartículas Bi/Ag. Espectro XPS de Bi4f (A), Ag3d(B), C1s(C) y O1s (D) de nanopartículas de Bi/Ag.

7.2 Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos

Las NPs Bi/Ag tienen un efecto antimicrobiano sobre las bacterias *E. coli* ATCC 11229 y *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 7) con una CMI y CMB de 3.44 para *E. coli* y 1.72 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* (Cuadro 2).

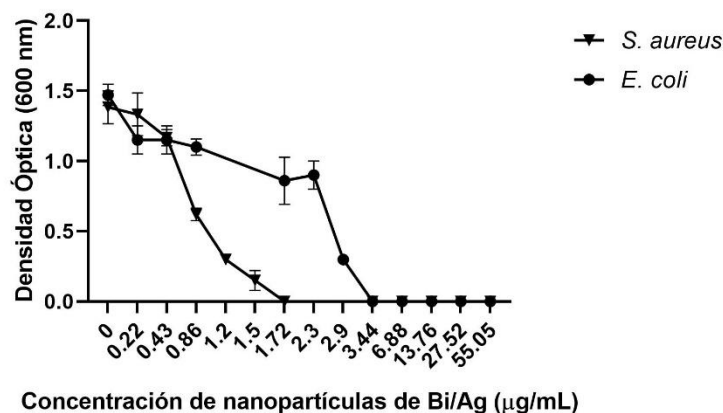


Figura 7. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag sobre el crecimiento bacteriano. 10^5 UFC/mL (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) fueron tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.88, 1.2, 1.5, 1.72, 2.3, 2.9, 3.44, 6.88, 13.76, 27.52 y 55.05 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 24 h. Después, fue determinada la DO a una longitud de onda de 600nm.

Cepa bacteriana	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1.72	1.72
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	3.44	3.44

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de nanopartículas de Bi/Ag para *S. aureus* y *E. coli*.

7.3 Integridad de la membrana

La enzima citosólica LDH se liberó de manera dosis dependiente ($p < 0.05$; Figura 8), lo que indica que una mayor concentración de nanopartículas de Bi/Ag aumenta la ruptura de la membrana plasmática en *E. coli* y *S. aureus*.

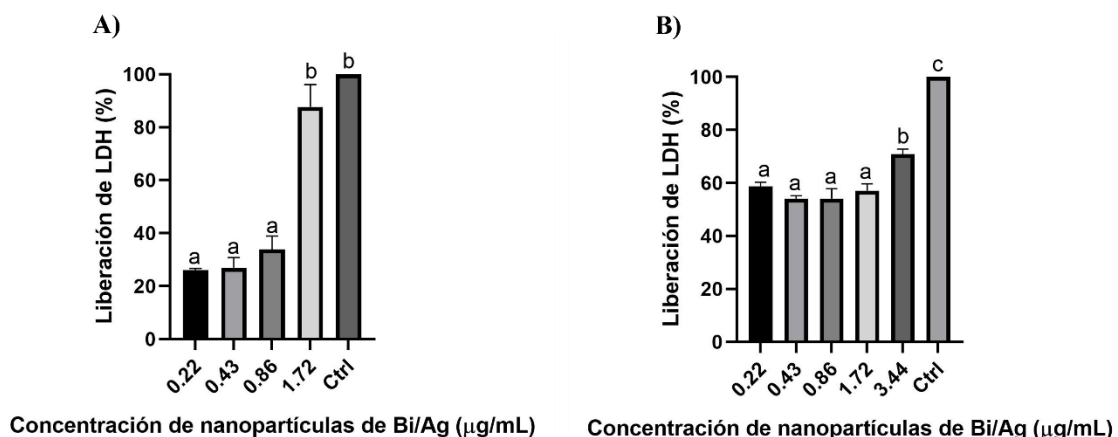


Figura 8. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag sobre la liberación de LDH en cepas bacterianas. Porcentaje de liberación de LDH después del tratamiento con nanopartículas de Bi/Ag sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (A) y *Escherichia coli* ATCC 11229 (B). 10^5 UFC/mL fueron inoculadas con concentraciones sub-inhedoras de nanopartículas (0.22, 0.43, 0.86, 1.72 y 3.44 µg/mL) e incubadas a 37°C durante 24 h. Luego, la liberación de LDH fue determinada mediante DO a una longitud de onda de 490 nm. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). El control es el 100 % de liberación de LDH (células tratadas con solución de lisis: 9 % v/v Triton® X-100).

7.4 Ensayo de formación de biopelículas

Las nanopartículas evaluadas inhiben la formación de biopelícula por parte de la bacteria *S. aureus*, a mayores concentraciones mayor es la inhibición, pero esta capacidad disminuye de manera dependiente del tiempo ($p < 0.05$), excepto para la concentración de 0.43 µg/mL. Las NPs Bi/Ag son más efectivas 7 días después de ser sintetizadas (Figura 9).

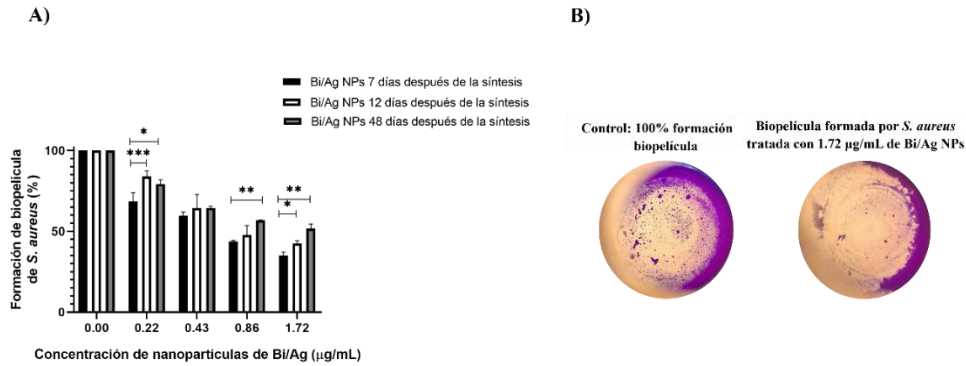


Figura 9. Efecto de las nanopartículas Bi/Ag después de diferentes días de haber sido sintetizadas sobre la inhibición en la formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus*. 1.5×10^6 UFC/mL fueron inoculadas y entonces las NPs Bi/Ag fueron administradas (0.22 , 0.43 , 0.86 y $1.72 \mu\text{g/mL}$). Después se incubaron las bacterias con el tratamiento a 37°C durante 24 h. Luego, la biopelícula fue teñida con cristal violeta y la DO fue determinada a una longitud de onda de 595 nm . Cada tratamiento se realizó al menos por duplicado. Los resultados representan el promedio, y las barras de error muestran la desviación estándar. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$ indica diferencia estadística significativa entre los promedios (A). Imágenes representativas del ensayo de formación de biopelícula (B).

7.5 Ensayo de viabilidad celular

Las CMB de NPs Bi/Ag previamente establecidas para *S. aureus* ($1.72 \mu\text{g/mL}$) y *E. coli* ($3.44 \mu\text{g/mL}$) se evaluaron en líneas celulares HUVEC, NIH/3T3 y MCF7 encontrando que la viabilidad de estas células no se ve afectada a diferentes densidades celulares ($p > 0.05$; Figura 10 y Figura 11).

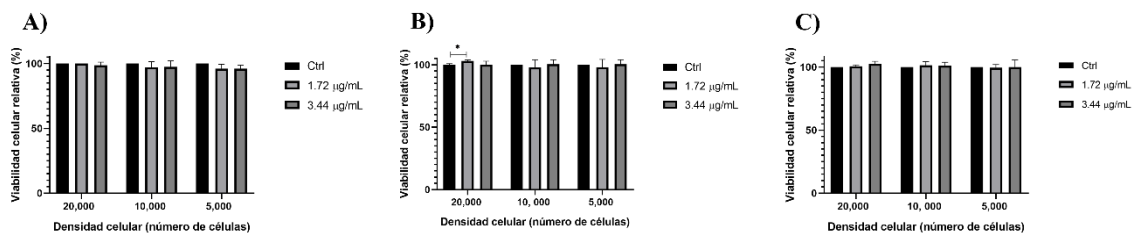


Figura 10. Efecto de la CMB de las nanopartículas Bi/Ag para *S. aureus* ($1.72 \mu\text{g/mL}$) y *E. coli* ($3.44 \mu\text{g/mL}$) sobre la viabilidad relativa en HUVEC (A), NIH/3T3 (B) y MCF7 (C) a diferentes densidades celulares (20,000, 10,000 y 5,000 células) por 24h. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados representan el promedio, y las barras de error muestran la desviación estándar. Las líneas celulares sin tratamiento fueron consideradas como control. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, y $***p < 0.001$ indican diferencia estadística significativa entre los promedios.

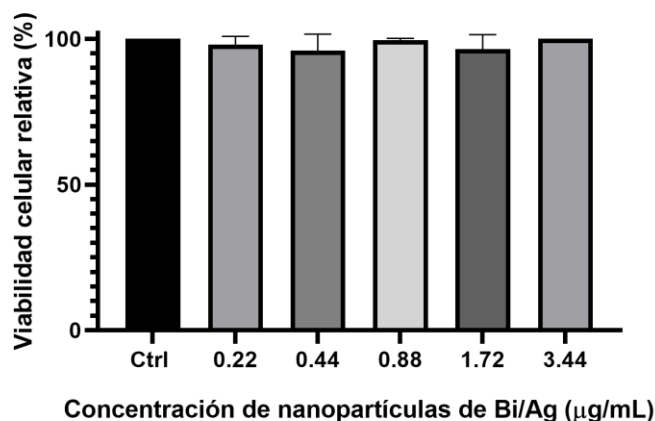


Figura 11. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la viabilidad relativa en la línea celular de epitelio mamario diferenciado (MCF7). Se sembraron 1×10^5 células por pocillo, se trataron con NPs Bi/Ag (0.00, 0.22, 0.44, 0.88, 1.72 y 3.44 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, las células se fijaron con TCA al 10% y se tiñeron con SRB. Luego, se solubilizó SRB con solución de Tris base y se determinó la DO a 540 nm de cada concentración de NPs. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Los resultados representan el promedio y las barras la desviación estándar.

Además, para corroborar que las nanopartículas no tenían ningún efecto citotóxico sobre las células HUVEC, se realizó una curva de viabilidad celular y se observó que ésta comienza a disminuir a partir de una concentración de 13.76µg/mL ($p < 0.05$), ocho y cuatro veces mayor que la CMB utilizado para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente (Figura 12).

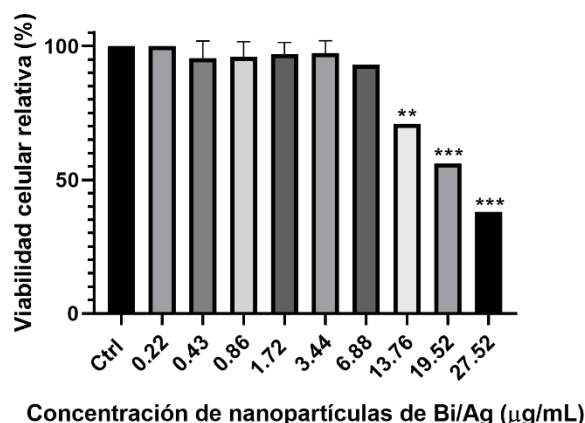


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la viabilidad celular relativa en la línea celular HUVEC. Diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag (0.22, 0.43, 0.86, 1.72, 3.44, 6.88, 13.79, 19.52 y 27.52 µg/mL) fueron evaluadas sobre la línea celular HUVEC durante 24 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados representan el promedio, y las barras de error muestran la desviación estándar. La línea celular sin tratamiento fue considerada como el control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, y *** $p < 0.001$ indican diferencia estadística significativa entre los promedios.

7.6 Producción de citocinas inflamatorias

La producción de citocinas inflamatorias se evaluó sobre la línea celular MCF7, donde se observó que la CMB de las NPs Bi/Ag previamente establecidas para *S. aureus* (1.72 µg/mL) y *E. coli* (3.44 µg/mL) no afectada la producción de IL-6 ni IL-8 ($p < 0.05$; Cuadro 3).

Tratamiento/Citocina	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
Control	12864.5±145.03 ^a	293.8±45.3 ^a
LPS (100 ng)	16521±502.1 ^b	596.8±10.8 ^b
Bi/Ag NPs (1.72 µg/mL)	121432.5±80.8 ^a	273.9±33.4 ^a
Bi/Ag NPs (3.44 µg/mL)	13491.2±415.5 ^a	243.6±26.5 ^a

Cuadro 3. Efecto de CMB de nanopartículas Bi/Ag (1.72 y 3.44 µg/mL para *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente) sobre la producción de citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en la línea celular de epitelio mamario (MCF7). Se sembraron 1×10^5 células por pocillo, se trataron con NPs y se incubaron a 37 °C durante 5 h. Los sobrenadantes fueron recolectados y en ellos se cuantificaron las citocinas mediante un citómetro de flujo con el kit de citocinas inflamatorias humanas CBA de BD. Literales diferentes indican diferencia estadística significativa entre los promedios ($p < 0.05$).

7.7 Actividad fagocítica de PBMC bovinas

El efecto de la formulación a base de nanopartículas de bismuto y plata sobre la capacidad fagocítica de PBMC bovinas fue evaluado y se determinó que la CMB de las nanopartículas de Bi/Ag para *S. aureus* (1.72 $\mu\text{g/L}$) y *E. coli* (3.44 $\mu\text{g/mL}$) no tienen efecto citotóxico sobre estas células (Figura 13), así como tampoco afecta su actividad fagocítica (Figura 14).

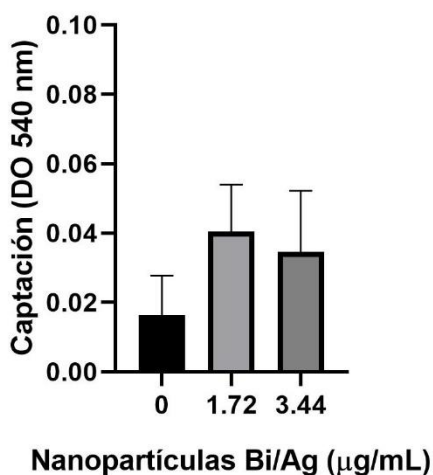


Figura 13. Viabilidad celular de PBMC bovinas tratadas con nanopartículas Bi/Ag. 1.25×10^5 PBMC fueron tratadas con diferentes concentraciones de nanopartículas de Bi/Ag (CMB para *S. aureus* y *E. coli*, 1.72 y 3.44 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) durante 24 h. Luego, mediante el ensayo de rojo neutro fue determinada su capacidad de captación lisosomal como indicador de viabilidad celular. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados representan el promedio, y las barras de error muestran la desviación estándar. PBMC sin tratamiento fueron consideradas como control.

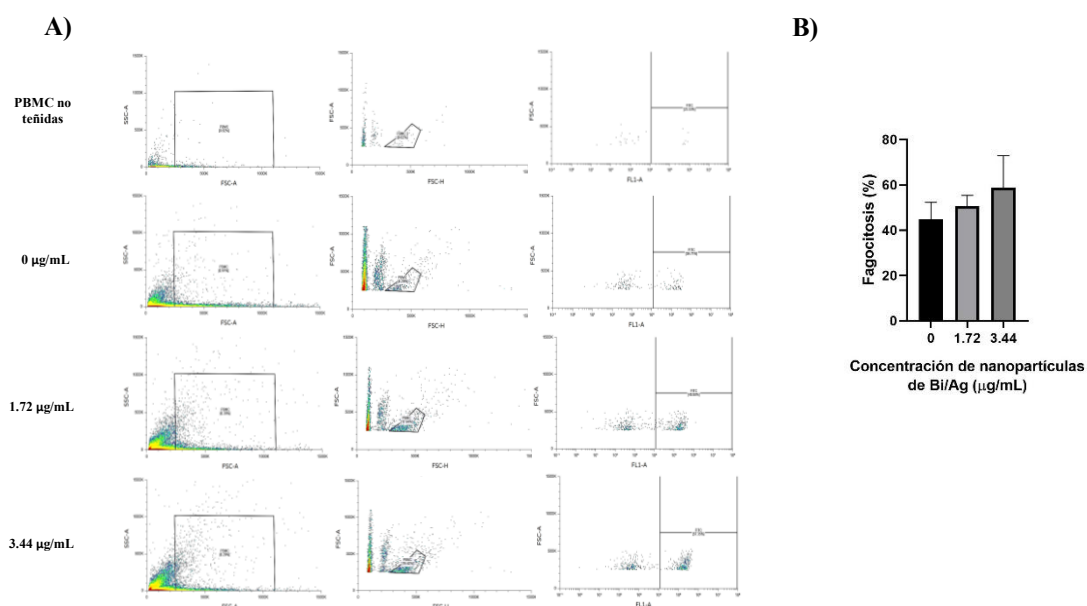


Figura 14. *Actividad fagocítica de PBMC bovinas estimuladas con nanopartículas Bi/Ag.* Estrategia de selección de PBMC en citometría de flujo (A). PBMC fueron estimuladas con diferentes concentraciones de nanopartículas de Bi/Ag (1.72 y 3.44 µg/mL) durante 24 h. Luego, mediante el ensayo de fagocitosis con perlas de IgG-FITC fue determinada su capacidad fagocítica (B). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los resultados representan el promedio, y las barras de error muestran la desviación estándar. PBMC sin tratamiento fueron consideradas como control.

7.8 Modelo de herida infectada

Se realizó un experimento *in vivo*, donde se infectaron heridas con inóculos de diferentes cepas (*S. aureus* y *E. coli*). Los resultados mostraron que el tratamiento con 22.02 μg de NPs Bi/Ag logró la disminución de la infección en el caso de *S. aureus* y el aumento de la abundancia de colágeno ($p < 0.05$; Figura 15); así como la eliminación de la infección por *E. coli* (Figura 16). De esta manera, se demostró que, la presente formulación de nanopartículas resultó ser efectiva para combatir y eliminar infecciones superficiales.

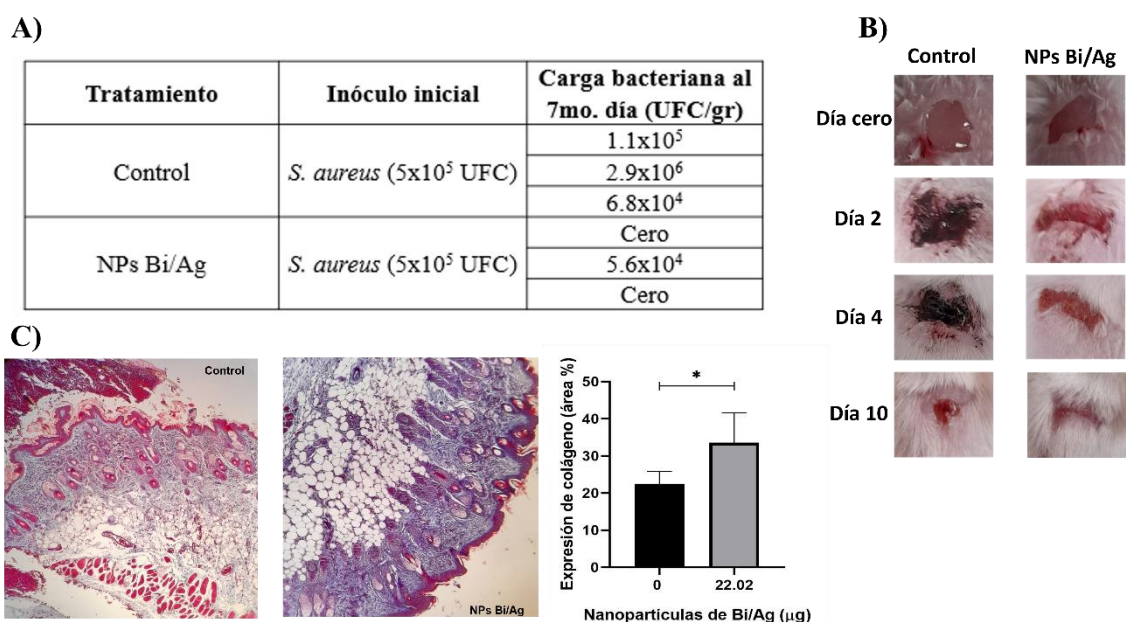


Figura 15. Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en heridas contaminadas con 5×10^5 UFC de *S. aureus* en ratones. Después de la escisión de la herida, las bacterias se inocularon y se mantuvieron *in situ* en el sitio de la herida durante 2 horas para permitir el establecimiento de la infección. Inmediatamente se aplicó una dosis diaria durante 5 días del tratamiento de manera tópica con 22.02 μg de NPs Bi/Ag. Al séptimo día después de la infección de la herida los ratones fueron sacrificados y se sumergió una biopsia del sitio de la herida en solución salina para obtener una suspensión bacteriana, que luego se inoculó en placas de agar sal manitol para determinar la carga bacteriana (A). Imágenes representativas de ratones con heridas infectadas con *S. aureus* y tratadas con NPs Bi/Ag a los cero, 2, 4 y 10 días después del establecimiento de la infección (B). Imágenes representativas de la sección histológica de muestras de piel de ratones, con y sin tratamiento con NPs Bi/Ag, teñidas con tinción tricrómica de Masson (aumento 10X).

Rojo: fibra muscular y hemoglobina, rosa: citoplasma; marrón oscuro o negro: núcleos celulares y azul: fibra de colágeno. Los datos son media $\pm$ desviación estándar; * $p < 0.05$ en comparación con el control, 0 μg de NPs Bi/Ag (C).

A)

Tratamiento	Inóculo inicial	Carga bacteriana al 7mo. día (UFC/gr)
Control	<i>E. coli</i> (5×10^5 UFC)	1×10^6
		1.6×10^6
		1.25×10^4
NPs Bi/Ag	<i>E. coli</i> (5×10^5 UFC)	Cero
		Cero
		Cero

B)

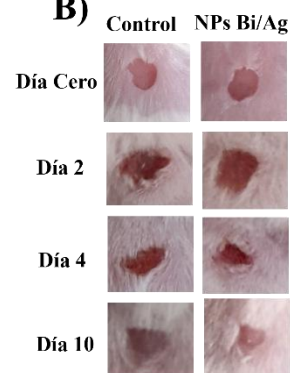


Figura 16. Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en heridas contaminadas con 5×10^5 UFC de *E. coli* en ratones. Después de la escisión de la herida, las bacterias se inocularon y se mantuvieron *in situ* en el sitio de la herida durante 2 horas para permitir el establecimiento de la infección. Inmediatamente se aplicó una dosis diaria durante 5 días del tratamiento tópico con 22.02 μg de NPs Bi/Ag. Los ratones fueron sacrificados al séptimo día después de la infección de la herida y se sumergió una biopsia del sitio de la herida en solución salina para obtener una suspensión bacteriana, que luego se inoculó en placa de agar EMB (A). Imágenes representativas de ratones con heridas infectadas con *E. coli* y tratadas con NPs Bi/Ag a los cero, 2, 4 y 10 días después del establecimiento de la infección (B).

7.9 Modelo de sepsis

En este modelo las NPs Bi/Ag no mostraron diferencia entre los grupos tratados y no tratados con NPs Bi/Ag, ya que los ratones de ambos grupos murieron 24 h después de la infección. Sin embargo, el grupo tratado sólo con NPs Bi/Ag sin infección sobrevivió, por lo que las NPs Bi/Ag no tuvieron efecto tóxico (Cuadro 4).

Tratamiento	Inóculo inicial (<i>E. coli</i> , UFC)	Sobrevida después de 24 horas
Control 1 (22.02 µg NPs Bi/Ag)	0	100%
Control 2 (PBS estéril)	3.6x10 ⁹	0%
NPs Bi/Ag (22.02 µg)	3.6x10 ⁹	0%

Cuadro 4. *Efecto de nanopartículas Bi/Ag sobre ratones con sepsis ocasionada por E. coli.* Ratones se inoculaban intraperitonealmente con 3.6x10⁹ UFC de *E. coli* ATCC 11229 para ocasionar un cuadro de sepsis, simultáneamente a la inoculación se comenzó el tratamiento con 22.02 µg de NPs Bi/Ag de manera intraperitoneal. Una segunda dosis fue aplicada 2 horas después de la inoculación bacteriana. Los ratones se monitorearon durante 24 horas.

7.10 Modelo de mastitis *in vitro*

Los resultados mostraron que las NPs Bi/Ag no eliminaron las UFC de *Staphylococcus aureus* inoculadas en la leche (Cuadro 5). Asimismo, la carga bacteriana presente en la leche cruda utilizadas como control tampoco se vio afectada.

Tratamiento	Inóculo inicial (<i>S. aureus</i> , UFC/mL)	Carga bacteriana en agar nutritivo después de 24h de infección	Carga bacteriana en agar sal manitol después de 24h de infección
Control 1	0	Incontable	Incontable
Control 2	1.5×10^5	Incontable	Incontable
NPs Bi/Ag (1.72 µg/mL)	1.5×10^5	Incontable	Incontable
NPs Bi/Ag (3.44 µg/mL)	1.5×10^5	Incontable	Incontable
Gentamicina	1.5×10^5	Cero	Cero

Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas Bi/Ag sobre la carga bacteriana en leche cruda contaminada con *S. aureus*. Leche cruda de bovino se inoculó con 1.5×10^5 UFC/mL de *S. aureus* ATCC 2921, luego se trató con diferentes concentraciones de NPs Bi/Ag, la leche infectada con tratamiento se mantuvo durante 24 h a 37°C y la carga bacteriana fue determinada por la técnica de extendido en placa en agar nutritivo y sal manitol utilizando diluciones seriada.

8.- DISCUSIÓN

La formulación de nanopartículas metálicas desarrollada (NPs Bi/Ag) está compuesta por tres diferentes poblaciones: nanopartículas bimetálicas de bismuto y plata, así como nanopartículas monometálicas conformadas de cada elemento (Figura 4, la presencia de Si se debe a que la rejilla sobre la cual se coloca la muestra para su análisis está elaborada de dicho elemento). La síntesis de nanopartículas bimetálicas fue posible, ya que el bismuto es soluble en plata en un 5.5 % (Karakaya y Thompson, 1993). Esta solubilidad parcial es la razón por la cual la eficiencia de la reacción no fue del 100 %, lo que resulta evidente con la presencia de nanopartículas monometálicas de cada elemento.

Además, bien cabe mencionar que, la distribución de la composición de las NPs bimetálicas no es homogénea (relación peso $\text{Bi}_{15.7}\text{Ag}_{84.3}$, Figura 5), es decir no se mantiene la relación molar inicial de los elementos metálicos ($\text{Bi}_{0.8}\text{Ag}_{0.2}$) en cada nanopartícula sintetizada. Resultados similares fueron observados por Ruiz-Ruiz y colaboradores en 2016, donde nanopartículas bimetálicas de bismuto y plata fueron sintetizadas por el método de reducción mecano-química.

Es importante mencionar que, a diferencia de las síntesis existentes, la síntesis aquí desarrollada permite obtener nanopartículas estables de bismuto y plata en una solución acuosa a partir de una sola reacción por reducción química. Asimismo, esta es la primera solución bimetálica de nanopartículas de bismuto y plata con actividad antibacteriana reportada. La presente formulación se caracterizó y demostró poseer un valor de potencial zeta mayor a 30mV, lo que confirma su estabilidad (Kovacevic *et al.*, 2011), ya que este parámetro indica la magnitud de la fuerza electrostática de atracción o repulsión entre las NPs y por ende la prevención de la aglomeración entre ellas.

Al evaluar el SRP se encontraron dos bandas máximas de absorbancia a las longitudes de onda de 257 y 411 nm, características de plasmón de resonancia superficial de NPs de bismuto (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2020) y plata (Piñero *et al.*, 2017), respectivamente.

Las Bi/Ag NPs tiene diferentes tamaños con un diámetro individual promedio de 18.39 ± 7.49 nm y una morfología cuasi-esférica (Figura 3). Estas características son responsables de su actividad bactericida, esto es, el tamaño y forma de las NPs favorecen el ingreso exitoso a la célula bacteriana, ocasionando lisis celular. Debido a que entre mayor área superficial tengan las NPs se libera una mayor cantidad de iones metálicos comparada con NPs de diferentes morfologías (Cheon *et al.*, 2019).

S. aureus fue más susceptible a las NPs Bi/Ag que *E. coli* (Figura 7). Esto puede ser debido a la carga eléctrica positiva de las NPs (Cuadro 1), ya que la pared celular de las bacterias Gram positivas está conformada por ácidos teicoicos y lipoteicoicos, que confieren una carga eléctrica negativa mayor comparada con las bacterias Gram negativas (Liu *et al.*, 2015). Esto significa que, probablemente haya una fuerza de atracción electrostática mayor entre las NPs Bi/Ag y las bacterias Gram positivas.

La inhibición en la formación de biopelícula (Figura 9) pudo ser el resultado de que las NPs probablemente sean capaces de disminuir la actividad transcripcional de genes que son responsables de la formación de biopelícula, como ha sido reportado previamente con las nanopartículas de plata (Yu *et al.*, 2018). Sin embargo, una de las desventajas, cuando se emplean las NPs Bi/Ag reducidas con ácidos orgánicos (ácido ascórbico y ácido cítrico) y estabilizadas con quitosano, es la disminución en la capacidad de inhibición de formación de biopelícula cuando son utilizadas después de 48 días de sintetizadas. Por lo cual, es necesario desarrollar otra síntesis de NPs Bi/Ag con otros agentes reductores y

estabilizadores para corroborar si esos factores pueden mantener la capacidad anti-biofilm por un tiempo mayor.

La formulación sintetizada ocasiona la muerte de microorganismos por ruptura de la membrana plasmática y finalmente liberación del contenido citosólico al medio ambiente extracelular como se observó en el ensayo de la enzima LDH (Figura 8). Es decir, ocasiona un daño directo en la bacteria, probablemente esta sea la razón por la cual, en los modelos de infección evaluados las NPs Bi/Ag sólo fueron efectivas en heridas superficiales infectadas. Notablemente, la CMB de NPs Bi/Ag sobre las bacterias evaluadas es hasta 100 veces más baja que aquellas reportadas por otros estudios, donde el efecto antibacteriano de nanopartículas de bismuto y plata fue evaluado sobre modelos *in vitro* (Kovacevic *et al.*, 2011; Lange *et al.*, 2021; Jawad *et al.*, 2022).

Las nanopartículas de plata han demostrado tener efecto bactericida sobre *S. aureus* (Ansari *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2023), y varios estudios han demostrado que son más efectivas en combinación con antibióticos (Ahmadi y Adibhesami, 2017; Khalil *et al.*, 2021). Sin embargo, las nanopartículas de plata inducen citotoxicidad en células eucariotas, como fibroblastos (Wilkinson y Hardman, 2020; Skóra *et al.*, 2021), células presentes en tejidos tanto humanos como animales. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas alternativas para combatir procesos infecciosos que afectan a humanos, así como animales.

S. aureus es una bacteria causante de infecciones en heridas, cuadros de sepsis, así como en mastitis crónica; mientras que *E. coli* es una de las principales bacterias medioambientales responsables de generar infecciones locales y sistémicas. Gentamicina fue utilizado como control en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, porque es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro con capacidad de unión al ARN 16S, en

específico a la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la traducción de proteínas o generando proteínas no funcionales (Gemeinder *et al.*, 2021). Es por esto por lo que, los modelos de infección evaluados fueron inducidos con estas cepas bacterianas y este antibiótico utilizado como control de inhibición del crecimiento de dichas bacterias.

Hoy en día, es un reto desarrollar o prescribir tratamientos para combatir infecciones bacterianas debido a la falta de disponibilidad de antibióticos efectivos para combatirlas o prevenirlas (Dumache *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2022). Sin embargo, es sabido que las nanopartículas bimetalicas tienen una actividad antimicrobiana mayor comparada con el uso de nanopartículas monometalicas (Gulam Mohammed *et al.*, 2014; Perdikaki *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019; Arora *et al.*, 2020). Así, la presente formulación de NPs Bi/Ag es un candidato ideal para combatir infecciones ocasionadas por bacterias, ya que pueden eliminar la carga bacteriana de las infecciones establecidas, no presentan toxicidad sobre líneas celulares representativas de los tejidos a tratar (endoteliales, epiteliales y fibroblastos; Figura 10) ni sobre PBMC (Figura 13). No producen efectos secundarios indeseables como alteración en la producción de citocinas inflamatorias (Cuadro 3) en las células tratadas ni modifican la actividad fagocítica de PBMC (Figura 14).

9.- CONCLUSIONES

Es posible obtener una formulación estable con nanopartículas bimetálicas de bismuto y plata en solución acuosa a partir de una sola reacción mediante síntesis química. Esta formulación posee actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. aureus* y *E. coli*, además, es capaz de dañar la membrana plasmática de estos microorganismos. Las nanopartículas Bi/Ag son efectivas para combatir infecciones en heridas superficiales, no muestran efecto citotóxico sobre las líneas celulares de fibroblastos, vasculares endoteliales y de epitelio mamario; así como tampoco son citotóxicas sobre células mononucleares de sangre periférica. Asimismo, no alteran la producción de citocinas inflamatorias en la línea celular de epitelio mamario diferenciado ni modifican la actividad fagocítica de PBMC.

10.- PERSPECTIVAS

Si bien en este trabajo se comprobó la eficacia bactericida de la formulación con nanopartículas de bismuto y plata, es necesario dilucidar el mecanismo de acción por medio del cual logra lisar células procariotas y determinar, si existe, alguna diferencia en este mecanismo de acción entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Además, también sería interesante comparar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de bismuto y plata monometálicas contra las bimetálicas para confirmar su probable acción bactericida potenciada.

Asimismo, es necesario evaluar el efecto antimicrobiano de la presente formulación contra una mayor cantidad microorganismos, incluyendo aquellos que ocasionan infecciones en animales con fin zootécnico y aquellos que han sido identificados como multidrogorresistentes.

Por último, se sugiere determinar la formulación adecuada para su administración tópica y posible aplicación comercial.

11.- REFERENCIAS

- Abd El-Aziz NK, Ammar AM, El-Naenaeey ESY, El Damaty HM, Elazazy AA, Hefny AA, Eldesoukey IE. 2021. Antimicrobial and antibiofilm potentials of cinnamon oil and silver nanoparticles against *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis: New avenues for countering resistance. BMC Veterinary Research. 17: 1-14.
- Adibhesami M, Ahmadi M, Farshid AA, Sarrafzadeh-Rezaei F y Dalir-Naghadeh B. 2017. Effects of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. In Veterinary Research Forum. 8: 23.
- Adkins PR y Middleton JR. 2018. Methods for diagnosing mastitis. Veterinary Clinics: Food Animal Practice. 34: 479-491.
- Ahmadi M y Adibhesami M. 2017. The effect of silver nanoparticles on wounds contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* in mice: an experimental study. Iran. J. Pharm. Res. 16: 661–669.
- Ahmed KBA, Raman T y Veerappan A. 2016. Future prospects of antibacterial metal nanoparticles as enzyme inhibitor. Materials Science and Engineering: C. 68: 939-947.
- Ahmed AM y Shimamoto T. 2011. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. Microbiology and immunology. 55: 318-327.
- Algharib SA, Dawood A y Xie S. 2020. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. Drug delivery. 27: 292-308.
- Ansari MA, Khan HM, Khan AA, Cameotra SS y Alzohairy MA. 2015. Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. Indian J. Med. Microbiol. 33: 101–109.
- Anselmo AC y Mitragotri S. 2016. Nanoparticles in the clinic. Bioengineering & translational medicine. 1:10-29.
- Argueta-Figueroa L, Morales-Luckie RA, Scougall-Vilchis RJ y Olea-Mejía OF. 2014. Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu–Ni nanoparticles for potential use in dental materials. Progress in Natural Science: Materials International. 24: 321-328.
- Arora N, Thangavelu K y Karanikolos GN. 2020. Bimetallic nanoparticles for antimicrobial applications. Front. Chem. 8:412.
- Arvidsson A, Mattison I, Ahlberg E y Loeberg J. 2013. Medical devices having a surface compromising nanoparticles. European Patent Office. No. 2662051.
- Azad A, Rostamifar S, Modaresi F, Bazrafkan A y Rezaie Z. 2020. Assessment of the Antibacterial Effects of Bismuth Nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. BioMed Research International.
- Bilal M, Rasheed T, Iqbal HM, Hu H, Wang W y Zhang X. 2017. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. International Journal of Biological Macromolecules. 103: 554-574.
- Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec JY, Leblond A y Gay É. 2018. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. Journal of dairy science. 101: 9451-9462.
- Bradley AJ, Breen JE, Payne B, White V y Green MJ. 2015. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. Journal of dairy science. 98:1706-1720.

- Bradley AJ. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *The veterinary journal*. 164:116-128.
- Breisch M, Grasmik V, Loza K, Pappert K, Rostek A, Ziegler N, Ludwing A, Heggen M, Epple M, Tiller J, Schildhauer T, Köller M y Sengstock C. 2019. Bimetallic silver-platinum nanoparticles with combined osteo-promotive and antimicrobial activity. *Nanotechnology*. 30: 305101.
- Bronzo V, Lopreiato V, Riva F, Amadori M, Curone G, Addis MF, Cremonesi P, Moroni P, Trevisi E y Castiglioni B. 2020. The Role of Innate Immune Response and Microbiome in Resilience of Dairy Cattle to Disease: The Mastitis Model. *Animals*.10:1397.
- Brouillette E y Malouin F. 2005. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *J Microbes Infect* 7:560–8.
- Cabral-Romero C. y Chellam S. 2014. Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety. In: *Nanomedicine*, Seifalian A, de Mel A, Kalaskar DM Eds. Pp. 430-437.
- Călina D, Docea AO, Rosu L, Zlatian O, Rosu AF, Anghelina F, Rogoveanu O, Arsene AL, Nicolae AC, Drăgoi CM, Tsiaoussis J, Tsatsakis AM, Spandidos DA, Drakoulis N y Gofita E. 2017. Antimicrobial resistance development following surgical site infections. *Molecular medicine reports*. 15: 681-688.
- Cheon JY, Kim SJ, Rhee YH, Kwon OH y Park WH. 2019. Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2773-2780.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23, CLSI, editor, Wayne, PA, USA, 2013.
- Coppock RW. 2019. Nutraceuticals in Mastitis. In *Nutraceuticals in Veterinary Medicine* pp. 569-585. Springer, Cham.
- da Luz JZ, Machado TN, Bezerra AG, de Oliveira Ribeiro CA y Neto FF. 2020. Cytotoxicity of bismuth nanoparticles in the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 31: 1-9.
- Dalanezi FM, Joaquim SF, Guimarães FF, Guerra ST, Lopes BC, Schmidt EMS, Cerri R y Langoni H. 2020. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. *Journal of dairy science*. 103:3648-3655.
- Dalvand LF, Hosseini F, Dehaghi SM y Torbati E. S. 2018. Inhibitory effect of bismuth oxide nanoparticles produced by bacillus licheniformis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA). *Iranian Journal of Biotechnology*. 16: 1.
- Das PE, Majdalawieh AF, Abu-Yousef IA, Narasimhan S y Poltronieri P. 2020. Use of a hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera* leaves for the green synthesis of bismuth nanoparticles and evaluation of their anti-microbial and antioxidant activities. *Material*. 13: 876.
- Dego OK. 2020. Current Status of Antimicrobial Resistance and Prospect for New Vaccines against Major Bacterial Bovine Mastitis Pathogens. In: *Animal Reproduction in Veterinary Medicine*. IntechOpen.
- Dias RS, Fialho AC, Eller MR, Mantovani HC, da Silva CC, y De Paula SO. 2013. Challenges in vaccination against mastitis. *International Journal of Medical and Biological Frontiers*. 19:63.
- Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS y Star RA. 2009. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *The Journal of clinical investigation*. 119: 2868-2878.
- Du Y, Li T, Wan Y, y Liao P. 2014. Signal molecule-dependent quorum-sensing and quorum-quenching enzymes in bacteria. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 24:1.

- Dumache R, Rogobete AF, Bedreag OH, Sarandan M, Cradigati AC, Papurica M. 2015. Use of miRNAs as biomarkers in sepsis. *Anal. Cell. Pathol.* 1–9.
- Elbehiry A, Al-Dubaib M, Marzouk E y Moussa I. 2019. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. *MicrobiologyOpen*. 8: e00698.
- Elemo KK, Bedada BA y Kebede T. 2018. Prevalence, Risk Factors and Major Bacterial Causes of Bovine Mastitis in Smallholder Dairy Farms in and around Sinana District, Bale Zone, South Eastern Ethiopia. *Global Journal of Science Frontier Research: D Agriculture and Veterinary*. 18:1.
- El-Sayed A, Kamel M. 2021. Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical animal health and production*. 53: 1-16.
- FAO. 2022. The future of food and agriculture – Drivers and triggers for transformation. The Future of Food and Agriculture, no. 3. Rome. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cc0959en/cc0959en.pdf>
- Formaggio DMD, de Oliveira Neto XA, Rodrigues LDA, de Andrade VM, Nunes BC, Lopes-Ferreira M, Ferreira F, Wachenesk C, Camargo E, Conceicao K y Tada DB. 2019. In vivo toxicity and antimicrobial activity of AuPt bimetallic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 21:1-16.
- Freeland G, Hettiarachchy N, Atungulu GG, Apple J y Mukherjee S. 2023. Strategies to combat antimicrobial resistance from farm to table. *Food Reviews International*. 39: 27-40.
- Freick M, Frank Y, Steinert K, Hamedy A, Passarge O y Sobiraj A. 2016. Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. *Tierärztliche Praxis G: Großtiere/Nutztiere*. 44: 219-229.
- Garrido AG y Figueiredo LFPD. 2004. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cirurgica Brasileira*. 19: 82-88.
- Gemeinder JLP, Barros NRD, Pegorin GSA, Singulani JDL, Borges FA, Arco MCG. 2021. Gentamicin encapsulated within a biopolymer for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infected skin ulcers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 32, 93–111.
- Gentilini E, Denamiel G, Betancor A, Rebuelto M, Fermepin MR y De Torres RA. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*. 85:1913-1917.
- Gomes F y Henriques M. 2016. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current microbiology*. 72:377-382.
- Gomez C, Hallot G, Laurent S y Port M. 2021. Medical applications of metallic bismuth nanoparticles. *Pharmaceutics*. 13: 1793.
- Gonçalves JL, de Campos JL, Steinberger AJ, Safdar N, Kates A, Sethi A, Shutske G, Goldberg T, Cue R, Ruegg PL. 2022. Incidence and Treatments of Bovine Mastitis and Other Diseases on 37 Dairy Farms in Wisconsin. *Pathogens*. 2022; 11:1282.
- Gulam Mohammed N, Prasad NI, Shaikh YA y Shaikh A. 2014. Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity. *Der Pharm. Lett.* 6: 129–136.
- Hamida RS, Ali MA, Goda DA y Al-Zaban MI. 2020. Lethal mechanisms of nostoc-synthesized silver nanoparticles against different pathogenic bacteria. *International Journal of Nanomedicine*. 10499-10517.
- Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S y Taponen S. 2018. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of dairy science*. 101:9493-9504.

- Hernández-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Diaz D, Arevalo-Niño K, Garza-Enriquez M, De la Garza-Ramos MA. y Cabral-Romero C. 2012. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. International journal of nanomedicine. 7: 2109.
- Holko I, Tancin V, Vršková M, Tvarožková K. 2019. Prevalence and antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy cows in Slovakia. J Dairy Res. 86:436–9.
- Hozyen HF, Ibrahim ES, Khairy EA y El-Dek SI. 2019. Enhanced antibacterial activity of capped zinc oxide nanoparticles: A step towards the control of clinical bovine mastitis. Veterinary world. 12: 1225.
- Iftikhar S, Iqtedar M, Saeed H, Aftab M, Abdullah R, Kaleem A y Aslam F. 2021. Comparative and combinatorial study of biogenic bismuth nanoparticles with silver nanoparticles and doxycycline against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* BTCB02 and *Salmonella typhi* BTCB06. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 20: 271-280.
- Jawad KH, Marzoog TR, Hasoon BA, Sulaiman GM, Jabir MS, Ahmed EM. 2022. Antibacterial activity of bismuth oxide nanoparticles compared to amikacin against *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus*. J. Nanomater. 8511601.
- Kaiser R, Escaig R y Nicolai L. 2023. Hemostasis without clot formation—how platelets guard the vasculature in inflammation, infection, and malignancy. Blood.
- Kalińska A, Jaworski S, Wierzbicki M y Gołębiewski M. 2019. Silver and copper nanoparticles—an alternative in future mastitis treatment and prevention? International journal of molecular sciences. 20: 1672.
- Karakaya I y Thompson WT. 1993. The ag-bi (silver-bismuth) system. J. Phase Equilibria 14, 525–530.
- Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, Nyakarahuka L, Kyobe S, Okee M, Najjuka CF y Joloba ML. 2013. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda. PloS one. 8: e63413.
- Kazemi J, Ahmadi M, Dastmalchi SH y Adibhesami M. 2014. Antibacterial effect of silver nanoparticles along with protein synthesis-inhibiting antibiotics on *Staphylococcus aureus* isolated from cattle mastitis.
- Khalil MA, El Maghraby GM, Sonbol FI, Allam NG, Ateya PS y Ali SS. 2021. Enhanced efficacy of some antibiotics in presence of silver nanoparticles against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from burn wound infections. Front. Microbiol. 12:648560.
- Kirtane AR, Verma M, Karandikar P, Furin J, Langer R y Traverso G. 2021. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. Nature Nanotechnology. 16: 369-384.
- Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Mueller RH y Keck CM. 2011. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. Int. J. Pharm. 406: 163–172.
- Kumar S, Majhi RK, Singh A, Mishra M, Tiwari A, Chawla S. 2019. Carbohydrate-coated gold–silver nanoparticles for efficient elimination of multidrug resistant Bacteria and *in vivo* wound healing. ACS Appl. Mater. Interfaces 11: 42998–43017.
- Landin H, Mörk MJ, Larsson M y Waller KP. 2015. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. Acta Veterinaria Scandinavica, 57:1-6.
- Lange A, Grzenia A, Wierzbicki M, Strojny-Cieslak B, Kalińska A, Gołębiewski M, Radzikowski D, Sawosz E, Jaworski S. 2021. Silver and copper nanoparticles inhibit biofilm formation by mastitis pathogens. Animals. 11: 1884.

- Leid JG, Ditto AJ, Knapp A, Shah, PN, Wright BD, Blust R, Christensen L, Clemons CB, Wilber JP, Young GW, Kang AG, Panzer MJ, Cannon CL, Yun YH, Youngs WJ, Seckinger NM y Cope EK. 2012. In vitro antimicrobial studies of silver carbene complexes: activity of free and nanoparticle carbene formulations against clinical isolates of pathogenic bacteria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 67: 138-148.
- Lemire JA, Harrison JJ y Turner RJ. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 371-384.
- Leung E, Weil DE, Raviglione M y Nakatani H. 2011. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*. 89: 390-392.
- Li T, Wang Z, Guo J, de la Fuente-Nunez C, Wang J, Han B, Tao H, Liu J y Wang X. 2023. Bacterial resistance to antibacterial agents: Mechanisms, control strategies, and implications for global health. *Science of The Total Environment*. 860: 160461.
- Lindahl JF y Grace D. 2015. The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review. *Infection ecology & epidemiology*. 5: 30048.
- Liu Y, Qin R, Zaat SA, Breukink E y Heger M. 2015. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. *J. Clin. Transl. Res.* 1:140–167.
- Liu Q, Mazhar M y Miller L. S. 2018. Immune and inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* skin infections. *Current dermatology reports*. 7: 338-349.
- Mah TFC y O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. 9: 34-39.
- Makvandi P, Wang CY, Zare EN, Borzacchiello A, Niu LN y Tay FR. 2020. Metal-based nanomaterials in biomedical applications: Antimicrobial activity and cytotoxicity aspects. *Advanced Functional Materials*. 30: 1910021.
- Maliha M, Brammananth R y Dyson J. 2021. Biocompatibility and selective antibacterial activity of a bismuth phosphinato-nanocellulose hydrogel. *Cellulose*. 28: 4701-4718.
- Mancuso G, Midiri A, Gerace E y Biondo C. 2021. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 10:1310.
- Markova Z, Šišková KM, Filip J, Čuda J, Kolář M, Šafářová K, Medrik I y Zbořil R. 2013. Air stable magnetic bimetallic Fe–Ag nanoparticles for advanced antimicrobial treatment and phosphorus removal. *Environmental science & technology*. 47:5285-5293.
- Marques VF, Motta CCD, Soares BDS, Melo DAD, Coelho SDMD, Coelho IDS, Barbosa H, Souza MMSD. 2017. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Brazilian journal of microbiology*. 48: 118-124.
- Martínez-Martínez MA, Hernandez-Delgadillo R, Abada BS, Pineda-Aguilar N, Solís-Soto JM, Nakagoshi-Cepeda MAA, Nakagoshi-Cepeda SE, Chellam S, Sánchez-Nájera RI y Cabral-Romero C. 2019. Antimicrobial potential of bismuth lipophilic nanoparticles embedded into chitosan-based membrane. *Dental materials journal*. 38:611-620.
- Martins AF, Monteiro JP, Bonafe EG, Gerola AP, Silva CT, Girotto EM, Rubira A y Muniz EC. 2015. Bactericidal activity of hydrogel beads based on N, N, N-trimethyl chitosan/alginate complexes loaded with silver nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*. 26: 1129-1132.
- Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA y Langer R. 2021. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 20: 101-124.
- Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Arnalich Fernández F, Arribas López JR y Mingorance J. 2015. Impact of

- virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*. 6: 93-100.
- Muzammil S, Hayat S, Fakhar-E-Alam M, Aslam B, Siddique MH, Nisar MA y Wang Z. 2018. Nanoantibiotics: Future nanotechnologies to combat antibiotic resistance. *Front. Biosci.* 10: 352-374.
- Nam HM, Lim SK, Kang HM, Kim JM, Moon JS, Jang KC y Jung SC. 2009. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of dairy science*. 92: 2020-2026.
- Nazeruddin GM, Prasad RN, Shaikh YI y Shaikh AA. 2014. Synergetic effect of Ag-Cu bimetallic nanoparticles on antimicrobial activity. *Der Pharmacia Lettre*. 3: 129-36.
- Negut I, Grumezescu V y Grumezescu A. M. 2018. Treatment strategies for infected wounds. *Molecules*. 23: 2392.
- Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O y Abiko Y. 2018. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International journal of general medicine*. 25-32.
- Nickerson SC y Ryman VE. 2019. Antibiotic Therapy in Mastitis Control for Lactating and Dry Cows. University of Georgia, UGA Cooperative Extension Bulletin 1516. p. 11. Available online at: https://secure.caes.uga.edu/extension/publications/files/pdf/B%201516_1.PDF. Consultado en Marzo 2021.
- O'Neill, J. 2015. The review on antimicrobial resistance chaired by Jim O'Neill. *Antimicrob Agric Environ unnecessary use waste*.
- Ou C, Shang D, Yang J, Chen B, Chang J, Jin F y Shi C. 2020. Prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with strong biofilm formation ability among animal-based food in Shanghai. *Food Control*. 112:107106.
- Ozdam M y Gurkok S. 2022. Recent advances in nanoparticles as antibacterial agent. *ADMET and DMPK*. 10: 115-129.
- Pal M, Kerorsu GB, Marami LM y Kandi V. 2020. Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *staphylococcus aureus*: a comprehensive review. *American Journal of Public Health Research*. 8: 14-21.
- Paphitou NI. 2013. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *International journal of antimicrobial agents*. 42: S25-S28.
- Paul D, Gopal J, Kumar M y Manikandan M. 2018. Nature to the natural rescue: silencing microbial chats. *Chemico-Biological Interactions*. 280, 86-98.
- Paulsen, J., Mehl, A., Askim, Å., Solligård, E., Åsvold, B. O. y Damås, J. K. 2015. Epidemiology and outcome of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection and sepsis in a Norwegian county 1996–2011: an observational study. *BMC infectious diseases*. 15: 1-10.
- Perdikaki A, Galeou A, Pilatos G, Karatasios I, Kanellopoulos NK, Prombona A. 2016. Ag and Cu monometallic and Ag/Cu bimetallic nanoparticle–graphene composites with enhanced antibacterial performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8:27498–27510.
- Piñero S, Camero S y Blanco S. 2017. Silver nanoparticles: influence of the temperature synthesis on the particles' morphology. *J. Physics Conf. Series* 786:012020.
- Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N y Sannomiya P. 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 30: 53-59.

- Qadri H, Shah AH, Alkhanani M, Almilaibary A y Mir MA. 2023. Immunotherapies against human bacterial and fungal infectious diseases: A review. *Frontiers in Medicine*. 10: 1135541.
- Rainard P y Foucras G. 2018. A critical appraisal of probiotics for mastitis control. *Frontiers in veterinary science*. 5:251.
- Ramakritinan CM, Kaarunya E, Shankar S y Kumaraguru AK. 2013. Antibacterial effects of Ag, Au and bimetallic (Ag-Au) nanoparticles synthesized from red algae. In *Solid State Phenomena* (Vol. 201, pp. 211-230). Trans Tech Publications Ltd.
- Rieznichenko LS, Gruzina TG, Dybkova SM, Ushkalov VO y Ulberg ZR. 2015. Investigation of bismuth nanoparticles antimicrobial activity against high pathogen microorganism. *American Journal of Bioterrorism Biosecurity and Biodefense*. 2:1004.
- Risal G, Shrestha A, Kunwar S, Paudel G, Dhital R, Budha MB y Nepal R. 2018. Detection of biofilm formation by *Escherichia coli* with its antibiogram profile. *Int J Community Med Public Health*. 5: 5.
- Rostamifar S, Azad A, Bazrafkan A, Modaresi F, Atashpour S y Jahromi ZK. 2021. New Strategy of Reducing Biofilm Forming Bacteria in Oral Cavity by Bismuth Nanoparticles. *BioMed Research International*. 2021: 6695692.
- Ruiz-Ruiz VF, Zumeta-Dubé I, Díaz D, Arellano-Jiménez MJ y José-Yacamán M. 2016. Can silver be alloyed with bismuth on nanoscale? An optical and structural approach. *J. Phys. Chem. C* 121:940–949.
- Sadeghi Dousari A, Talebi Bazmin AA, Forootanfar H y Shakibaie M. 2022. Biosynthesis of bismuth nanoparticles and its synergistic effect with antibiotics against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pathobiology Research*. 25: 23-32.
- Saidi R, Mimoune N, Baazizi R, Benaissa MH, Khelef D y Kaidi R. 2019. Antibiotic susceptibility of staphylococci isolated from bovine mastitis in Algeria. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 6:231.
- Samtiya M, Matthews KR, Dhewa T. 2022. Antimicrobial resistance in the food chain: trends, mechanisms, pathways, and possible regulation strategies. *Foods* 11: 2966.
- Sarani M, Roostaei M, Adeli-Sardou M, Kalantar-Neyestanaki D, Mousavi SAA y Amirbeigi A. 2024. Green synthesis of Ag and Cu-doped Bismuth oxide nanoparticles: Revealing synergistic antimicrobial and selective cytotoxic potentials for biomedical advancements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 81: 127325.
- Sardari RRR, Zarchi SR, Talebi A, Nasri S, Imani S, Khoradmehr A y Sheshde SAR. 2012. Toxicological effects of silver nanoparticles in rats. *African Journal of Microbiology Research*. 6:5587-5593.
- Schrader SM, Vaubourgeix J y Nathan C. 2020. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Science translational medicine*. 12: eaaz6992.
- Shakibaie M, Hajighasemi E, Adeli-Sardou M, Doostmohammadi M y Forootanfar H. 2019. Antimicrobial and anti-biofilm activities of Bi subnitrate and BiNPs produced by *Delftia* sp. SFG against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *IET nanobiotechnology*. 13:377-381.
- Sharma S, Sanpui P, Chattopadhyay A y Ghosh SS. 2012. Fabrication of antibacterial silver nanoparticle—sodium alginate—chitosan composite films. *Rsc Advances*. 2: 5837-5843.
- Skóra B, Krajewska U, Nowak A, Dziedzic A, Barylyak A y Kus-Liśkiewicz M. 2021. Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Sci. Rep*. 11:13451.
- Slavin YN, Asnis J, Hírfeli UO y Bach H. 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of nanobiotechnology*. 15:1-20.

- Taifa S, Muhee A, Bhat RA, Nabi SU, Roy A, Rather GA y Mallick J. 2022. Evaluation of Therapeutic Efficacy of Copper Nanoparticles in *Staphylococcus aureus*-Induced Rat Mastitis Model. Journal of Nanomaterials. 2022:1.
- Tashakkori N, Khoramian B, Moghadam MF, Heidarpour M, Mashayekhi K y Farzaneh N. 2020. Evaluating the effectiveness of two bovine mastitis vaccines and their influences on oxidant and antioxidant capacities of milk. Tropical animal health and production. 52:1493-1501.
- Thamphiwatana S, Angsantikul P, Escajadillo T, Zhang Q, Olson J, Luk BT, Zhang S, Fang R, Gao W, Nizet V y Zhang L. 2017. Macrophage-like nanoparticles concurrently absorbing endotoxins and proinflammatory cytokines for sepsis management. Proceedings of the National Academy of Sciences. 114: 11488-11493.
- Tokonami S, Morita N, Takasaki K y Toshima N. 2010. Novel synthesis, structure, and oxidation catalysis of Ag/Au bimetallic nanoparticles. The Journal of Physical Chemistry C. 114: 10336-10341.
- Tomazi T, de Souza Filho AF, Heinemann MB y Santos MVD. 2018. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. PloS one. 13:e0199561.
- Uchil RR, Kohli GS, KateKhaye VM y Swami OC. 2014. Strategies to combat antimicrobial resistance. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR. 8: ME01.
- Ul-Hamid A, Dafalla H, Hakeem AS, Haider A y Ikram M. 2022. *In-vitro* catalytic and antibacterial potential of green synthesized CuO nanoparticles against prevalent multiple drug resistant bovine mastitogen *Staphylococcus aureus*. International Journal of Molecular Sciences. 23: 2335.
- Vasile BS, Birca AC, Musat MC y Holban AM. 2020. Wound dressings coated with silver nanoparticles and essential oils for the management of wound infections. Materials. 13: 1682.
- Vázquez-Munoz R, Arellano-Jimenez MJ y Lopez-Ribot JL. 2020. Bismuth nanoparticles obtained by a facile synthesis method exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. BMC biomedical engineering. 2:1-12.
- Venkatesan J, Lee JY, Kang DS, Anil S, Kim SK, Shim MS y Kim DG. 2017. Antimicrobial and anticancer activities of porous chitosan-alginate biosynthesized silver nanoparticles. International journal of biological macromolecules. 98: 515-525.
- Vivcharenko V, Trzaskowska M y Przekora A. 2023. Wound dressing modifications for accelerated healing of infected wounds. International Journal of Molecular Sciences. 24: 7193.
- Watts JL. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Veterinary microbiology. 16:41-66.
- Wen H, Dan M, Yang Y, Lyu J, Shao A, Cheng X y Xu L. 2017. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. PloS one. 12: e0185554.
- Wernicki A, Puchalski A, Urban-Chmiel R, Dec M, Stegierska D, Dudzic A y Wojcik A. 2014. Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. Med Weter, 70: 564-567.
- Wilkinson HN y Hardman MJ. 2020. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol. 10:200223.
- Wilson DJ, Grohn YT, Bennett GJ, Gonzalez RN, Schukken YH y Spatz J. 2007. Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. Journal of dairy science. 90:4282-4288.

- Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW y Dowd SE. 2010. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *Journal of wound care*. 19: 45-53.
- Xia Y y Li L. 2016. China's national plan to combat antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*. 16: 1216-1218.
- Yang F, Zhang S, Shang X, Wang L, Li H y Wang X. 2018. Characteristics of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in China. *Journal of dairy science*. 101:6244-6252.
- Yu L, Shang F, Chen X., Ni J, Yu L, Zhang M y Xue T. 2018. The anti-biofilm effect of silver-nanoparticle-decorated quercetin nanoparticles on a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain isolated from a dairy cow with mastitis. *PeerJ*, 6, e5711.
- Zaatout N, Ayachi A y Kecha M. 2020. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities. *Journal of applied microbiology*. 129: 1102-1119.
- Zhang D, Zhang Z, Huang C, Gao X, Wang Z, Liu Y y Liu M. 2018. The phylogenetic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 101: 572-580.
- Zhang DX, Li Y, Yang XQ, Su HY, Wang Q, Zhang ZH y Liu MC. 2020. *In vitro* antibiotic susceptibility, virulence genes distribution and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in the Liaoning Province of China. *Infection and Drug Resistance*. 1365-1375.
- Zhang J, Yu W, Zhao LL, Xiao YY. 2016. Epidemiology and characteristics of bacterial resistance in China. *Chin J Infect Dis*. 9: 118-28.
- Zhang M, Zhang K, De Gusseme B, Verstraete W y Field R. 2014. The antibacterial and anti-biofouling performance of biogenic silver nanoparticles by *Lactobacillus fermentum*. *Biofouling*. 30: 347-357.
- Zhao X y Lacasse P. 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science*. 86(suppl_13): 57-65.