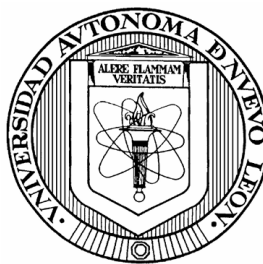


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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



**SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE SALES DE ORO
CONJUGADAS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENtido
COMO ESTRATEGIA PARA PREVENIR RESISTENCIA A
AMINOGLUCÓSIDOS**

Por

JULISSA JANETH GARCÍA CEPEDA

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



Octubre de 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Título:

Síntesis nanopartículas de sales de oro conjugadas con oligonucleótidos antisentido
como estrategia para prevenir resistencia a aminoglucósidos

No. Folio: MICMC-102848-JRMR-24/13

Lic. Julissa Janeth García Cepeda

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC): Procesos microbiológicos

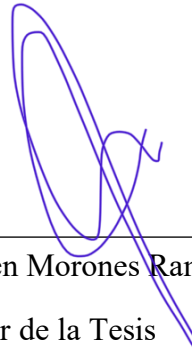
Lugar de ejecución: Laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIBYN), de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Asesor: José Rubén Morones Ramírez

Monterrey, 15 de octubre del 2025

**SÍNTESIS NANOPARTÍCULAS DE SALES DE ORO
CONJUGADAS CON OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO
COMO ESTRATEGIA PARA PREVENIR RESISTENCIA A
AMINOGLUCÓSIDOS**

Aprobación de la tesis



Dr. José Rubén Morones Ramírez

Asesor de la Tesis

Dr. Javier Alberto Garza Cervantes

Co-asesor de la Tesis

Dr. Julio Silva Mendoza

Comité tutorial

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Comité tutorial

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez

Comité tutorial

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mi profundo agradecimiento al equipo de trabajo y, de forma particular, al Dr. José Rubén Morones Ramírez (asesor) por su dirección experta, y al Dr. Javier Alberto Garza Cervantes, cuya guía fue crucial y su motivación fundamental en momentos adversos. Extiendo mi respeto a los miembros del comité tutorial; Dr. Xristo Zárate Kalfópulos, Dr. Julio Silva Mendoza y Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez, por la rigurosa revisión y el valioso tiempo invertido. Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas por la oportunidad académica y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el indispensable apoyo financiero. Mi aprecio se dirige también al Instituto de Innovación y Transferencia de Tecnología de Nuevo León (I2T2) por el financiamiento, el espacio provisto y la dedicación de su equipo.

Reconozco a la Dra. Nuria Vigués, mi asesora en la Universidad Autónoma de Barcelona, por su mentoría durante mi estancia y a los amigos que hicieron más amena esta enriquecedora etapa crucial de mi vida.

Finalmente, en el plano más personal y emotivo, quiero dirigir mi agradecimiento a mi familia, y a mis queridos padres por el apoyo incondicional que trascendió cualquier obstáculo, siendo mi refugio y mi mayor inspiración. A mis hermanas, por siempre brindarme palabras de ánimo, que fueron el motor que me impulsó en los momentos de mayor incertidumbre, demostrando una compañía leal y fundamental y a mi novio por brindarme claridad y alegría durante el proceso. También mi más sincero afecto a todos mis amigos que siempre me han hecho creer en mí. A todos ustedes, mi más sincero y eterno reconocimiento.

ÍNDICE

Contenido

Contenido

ÍNDICE.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	12
Capítulo 1.....	14
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. El declive de los antibióticos	14
1.1.1. Factores de la crisis y sus implicaciones.....	17
1.2. Mecanismos de Resistencia a antibióticos	17
1.2.1. Enzimas hidrolíticas	19
1.3. Aminoglucósidos	21
1.3.1. Mecanismo de acción.....	23
1.3.2. Mecanismo de resistencia de los aminoglucósidos	24
1.3.3. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	25
1.4. Kanamicina	25
Capítulo 2.....	26
2.1. Tratamientos alternativos	26
2.1.1. Estrategias basadas en ADN/ARN.....	26
2.2. Terapia con oligonucleótidos antisentido.....	32
2.2.1. Oligonucleótidos antisentido dirigidos a enzimas modificadoras de aminoglucósidos	34
2.2.2. Oligonucleótidos químicamente modificados y conjugados a péptidos	35
2.2.3. Administración de oligonucleótidos antisentido	35
2.2.4. Nanopartículas con oligonucleótidos antisentido	37
2.3. Blanco seleccionado.....	40
2.3.1. Mecanismo de resistencia conferido por <i>nptII</i>	41

2.3.2. Estudios de vigilancia	42
Capítulo 3.....	43
3. HIPÓTESIS y OBJETIVOS	43
3.1 Hipótesis.....	43
3.2. Objetivo General.....	43
3.3. Objetivos Específicos	43
Capítulo 4.....	44
4. METODOLOGÍA DEL TRABAJO.....	44
4.1. Materiales y equipo	44
4. 2. Condiciones de cultivo.....	45
4.3. Diseño de oligonucleótidos antisentido	46
4.4. Transformación de <i>E. coli</i> ATCC 11229 en una cepa resistente a kanamicina	47
4. 5. Síntesis de nanopartículas	49
4.6. Purificación y caracterización de las AuNPs y ASO-AuNPs.....	51
4.7. Concentración mínima inhibitoria	51
Capítulo 5.....	54
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Acondicionamiento de la cepa y clonación de plásmido pUC57-kan.....	54
5.3. Caracterización de AuNPs y ASO-AuNPs.....	56
5.3.1. Espectro de absorbancia UV-Visible de AuNPs	57
5.3.2. Caracterización por FTIR y DLS de AuNPs	58
5.3.3. Caracterización por TEM de AuNPs.....	60
5.3.4. Concentración mínima inhibitoria	61
5.4. Pruebas combinatorias	63
Capítulo 6.....	66
6. DISCUSIÓN	66
Capítulo 7.....	77
7. CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de resistencia a antibióticos.....	19
Figura 2. Colonias de <i>E. coli</i> transformada	54
Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas mediante lecturas de absorbancia a 600 nm durante 24 h.....	55
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa para el plásmido pUC57-Kan en <i>E.coli</i> ATCC	56
Figura 5. Caracterización de AuNPs y espectro de absorbancia UV-Vis	57
Figura 6. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier de AuNPs	59
Figura 7. Gráfico de DLS en escala logarítmica	60
Figura 8. Micrografía TEM de AuNPs	61
Figura 9. Concentración mínima inhibitoria de <i>E. coli</i> ATCC 11229 no transformada	62
Figura 10. Concentración mínima inhibitoria de <i>E. coli</i> resistente a KanR	63

Figura 11. Porcentaje de inhibición de par de conjugado AuNPs-ASOs1, AuNPs-ASOs2, AuNPs-ASOsC y AuNPs..... 64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de prioridad de patógenos resistentes a antibióticos..... 16

Tabla 2. Propuesta de Oligonucleótidos antisentido 47

ABREVIATURAS

ACC: Acetiltransferasas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMG: Aminoglucósidos

ANT: Nucleotidil Adenil-Transferasas

APH: Fosfo-transferasas

APH(3')-II: Aminoglucósido 3'-fosfotransferasa

ARN-m: ARN mensajero

ARN: Ácido ribonucleico

ARNt: ARN de transferencia

ASO: Oligonucleótidos antisentido

ATP: Trifosfato de adenosina

AuCl₃: Cloruro de oro (III)

AuNPs: Nanopartículas de oro

DTT: Ditiotreitól

EMA: Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

EPC: Enterobacterias productoras de carbapenemasas

FTIR: Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier

gARN: ARN guía

IM: Membrana interna

K₂HPO₄: Fosfato dipotásico

KH₂PO₄: Fosfato monopotásico

LBSS: Laboratorio de Biología Sintética y Sistemas

LPS: Lipopolisacáridos

LSPR: Resonancia del plasmón de superficie localizado

MDR: Multidrogo resistente

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

MLGNPs: Nanopartículas de Oro Recubiertas con Multicapa

Na₂HPO₄: Fosfato disódico

NaH₂PO₄: Fosfato monosódico

NPTII: Neomicina fosfotransferasa II

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

OM: Membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDR: Pan-resistentes

ppm: Partes por millón

RNP: Complejo Ribonucleoproteico

RAM: Resistencia a los Antimicrobianos

rpm: Revoluciones por minuto.

SARM: Staphylococcus aureus resistente a la meticilina

ssDNA: Cadenas de ADN sencillas

TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión

t-FNA: Ácido nucleico de marco tetraédrico

V: Volts

XDR: Extremadamente resistentes

RESUMEN

Las infecciones patógenas se han convertido en uno de los principales objetivos de la medicina, ya que la resistencia a los antibióticos es cada vez más difícil de combatir. Se ha llegado a un punto de inflexión en el que estos medicamentos se han utilizado indebidamente, creando un problema de salud a nivel global ¹.

El rápido ritmo al que surgen las enfermedades infecciosas es desigual en comparación con el ritmo de desarrollo de nuevas estrategias para su erradicación. Por otro lado, el hecho de que los antibióticos actuales resulten incapaces de distinguir entre el microbiota humano normal y las bacterias patógenas genera la necesidad y justifica la urgencia de investigar métodos alternativos eficaces que prometan especificidad ².

Recientemente, se han explorado nuevas estrategias para tratamientos antimicrobianos de patógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés), siendo la más notable la terapia antisentido. Esta herramienta terapéutica consta de oligonucleótidos antisentido (ASO, por sus siglas en inglés) que están diseñados para exhibir complementariedad de secuencia con objetivos de ARNm específicos responsables de diferentes genes de resistencia a los medicamentos ³. La carga negativa y el gran tamaño de los ASO pueden dificultar la difusión pasiva a través de las membranas bacterianas.

Por lo tanto, se propone el diseño de ASO dirigidos al gen *KanR* que confiere resistencia a la kanamicina junto con un sistema de administración en el que las nanopartículas de oro (AuNP, por sus siglas en inglés) son vehículos prometedores ^{4,5}. Al incorporar un grupo tiol en un extremo de un ASO, podemos crear conjugados con AuNP, mejorando potencialmente su internalización celular y su entrega a los sitios objetivo ^{6,7}.

Por ello, en este trabajo se propuso utilizar este sistema debido a las ventajas que ofrece: baja toxicidad, biocompatibilidad, facilidad de producción y anclaje de moléculas a su superficie mediante interacciones electrostáticas o covalentes. Se trata de una nueva herramienta terapéutica donde la combinación del oligonucleótido antisentido, dirigido al gen *KanR*, y nanopartículas de oro, expresadas en *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente, resensibilizó la cepa a la kanamicina, determinando así la concentración mínima inhibidora de kanamicina en *E. coli* resistente en presencia y ausencia del sistema ASO-AuNPs.

El conjugado diseñado ASO–AuNPs pudo permitir que se internalizarán de manera más eficiente en la célula bacteriana, donde los ASOs pudieron hibridar con el ARNm diana y suprimir la expresión de la enzima fosfotransferasa.

La actividad biológica observada en los ensayos combinatorios pudiera respaldar este mecanismo. El análisis de la actividad biológica reveló que los conjugados AuNPs–ASO1 y AuNPs–ASO2 exhiben una capacidad inhibitoria equivalente, alcanzando niveles de eficacia cercanos al 80 %. A pesar de que los ASOs fueron diseñados para hibridar en sitios distintos de la secuencia del gen *kanR*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su rendimiento.

Este fenómeno sugiere que la eficacia del silenciamiento génico mediado por nanopartículas de oro no depende estrictamente de la posición específica dentro del marco abierto de lectura (ORF), siempre que el blanco se localice en una región funcionalmente relevante. Estos hallazgos indican que la accesibilidad del complejo al transcrito de ARNm y la estabilidad de la hibridación en condiciones experimentales podrían tener un

peso mayor en la magnitud del efecto inhibitorio que la ubicación precisa de la secuencia diana.

Por otro lado, los ensayos realizados bajo la exposición con AuNPs sin funcionalizar no generaron inhibición significativa (<12%). Este resultado sugiere que la actividad antibacteriana proviene específicamente del efecto antisentido, y no de las nanopartículas per se ⁹⁸.

Capítulo 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El declive de los antibióticos

Los antibióticos son fármacos o moléculas bioactivas que son empleados para tratar de ralentizar el crecimiento bacteriano o de impedir su crecimiento. Desde el descubrimiento fortuito de la penicilina, transformaron por completo el tratamiento de las enfermedades infecciosas, salvando incontables vidas y la lucha por combatir enfermedades infecciosas parece no tener fin alguno. Sin embargo, lo que en su momento fue un milagro científico, hoy se enfrenta a una crisis silenciosa y de proporciones globales: el declive de su eficacia. Esto es el resultado de un uso indebido de antibióticos,

prescripciones inapropiadas, falta de innovación y aplicaciones excesivas en la ganadería, favoreciendo así, la propagación de multidrogo resistentes (MDR).

Los MDR son bacterias que han desarrollado resistencia a ciertos antibióticos por uno o más mecanismos de supervivencia y adaptación lo que provoca que estos ya no pueden lograr su efecto para erradicarlos o disminuir la carga infecciosa en el organismo⁸. Esta alarmante situación, impulsada por la resistencia a los antibióticos, amenaza con devolver a la humanidad a una era pre-antibiótica, donde infecciones comunes y curables se convertirán nuevamente en sentencias de muerte.

La propagación de los MDR es una de las principales preocupaciones para la salud pública, dada a la notable carga de morbilidad, mortalidad, costos de atención médica y uso de antibióticos⁹. El problema radica en la naturaleza evolutiva de las bacterias. A diferencia de las enfermedades crónicas, las infecciones bacterianas son un duelo constante entre el ingenio humano y la adaptabilidad microbiana.

Las "superbacterias" como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) o las enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) se han convertido en un problema de pocas opciones para los médicos. Estas infecciones, que antes respondían a tratamientos estándar, ahora requieren antibióticos de último recurso, que son más caros, tienen más efectos secundarios y, en muchos casos, no son efectivos. Los procedimientos médicos de rutina, como una cesárea, o una apendicectomía, conllevan ahora un riesgo mucho mayor de complicaciones fatales.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde el 2017, dio a conocer la lista de patógenos resistentes a distintos antibióticos que son los de mayor importancia para las que se necesita con urgencia la formulación de nuevos antibióticos o alguna terapia personalizada que minimice su propagación, la cual se actualiza constantemente. (Tabla 1) ¹⁰. Además, la OMS ha calificado la resistencia a los antimicrobianos como una de las diez principales amenazas para la salud pública mundial, estimando que para 2050 podría causar hasta 10 millones de muertes anuales si no se toman medidas urgentes.

Tabla 1. Clasificación de prioridad de patógenos resistentes a antibióticos

Clasificación de prioridad	Patógeno resistente	Resistencia de antibiótico
Clase 1. Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Enterobacteriaceae	Carbapenémicos, productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (ESBL, por sus siglas en inglés)
Clase 2. Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter spp</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonella</i>	

	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina y fluoroquinolonas
Clase 3. Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Sin sensibilidad a la penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolonas

Información obtenida de (World Health Organization [WHO], 2017)¹⁰.

1.1.1. Factores de la crisis y sus implicaciones

El inicio del declive de los antibióticos es multifacético y requiere una respuesta integral. En primer lugar, la falta de incentivos para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos por parte de la industria farmacéutica ha creado un vacío crítico en la línea de producción.

1.2. Mecanismos de Resistencia a antibióticos

La Resistencia a antibióticos o resistencia a fármacos antimicrobianos, es la capacidad que tiene un microorganismo para poder sobrevivir sobre los efectos de un antibiótico al que normalmente es susceptible. Las bacterias, con su asombrosa capacidad de replicación y mutación, han desarrollado mecanismos para neutralizar los antibióticos, ya sea destruyéndolos, alterando su objetivo o expulsándolos de sus células. Este mecanismo de defensa se manifiesta en dos tipos de resistencia; natural o intrínseca y adquirida^{11, 12}.

- **Natural o intrínseca:** Cuando es una propiedad específica de la bacteria y se da aun cuando no se haya tenido contacto con el antibiótico. Se habla de una capacidad intrínseca cuando el microorganismo tiene un mecanismo de resistencia que le impide al antibiótico actuar sobre este^{13, 14}. Estos fenómenos se presentan

en todas las bacterias de la misma especie, por lo que estas serán resistentes a algunas familias de antibióticos y lo que les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas.

- **Adquirida:** La bacteria que antes era susceptible al fármaco se convierte en resistente ¹¹. Este mecanismo implica un cambio genético, es decir mutaciones (cambios en la secuencia de bases del cromosoma) y se transmite a la descendencia por transmisión vertical de genes (transferencia de material genético por medio de plásmidos u otro material genético móvil como integrones y transposones) ¹³. Con la transferencia vertical no solo obtenemos la transmisión de una generación a otra, sino que también hacia otras especies bacterianas; aumentando así la posibilidad de que una especie de bacteria logre adquirir resistencia a más de un antibiótico, aun cuando no se ha estado en contacto con este ¹⁴.

Este fenómeno de resistencia es un proceso natural, pero su velocidad se ha acelerado de forma dramática debido a la presión selectiva ejercida por el uso y abuso generalizado de estos medicamentos. La sobreprescripción en la medicina humana, la falta de adherencia a los tratamientos completos y, de forma crucial, su uso masivo en la ganadería y la agricultura como promotores del crecimiento, han creado un caldo de cultivo ideal para la proliferación de cepas resistentes

Los mecanismos de resistencia son variados, pero los más comunes son cuatro principalmente: enzimas hidrolíticas, modificaciones en el sitio activo, disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingresar el fármaco y bombas de eflujo ^{15, 16} (Fig. 1.).

1.2.1. Enzimas hidrolíticas

Este mecanismo de resistencia se da debido a que la bacteria tiene la capacidad de sintetizar enzimas que sean capaces de hidrolizar el antibiótico, deteniendo su actividad antimicrobiana sin tener la posibilidad de ejercer acción sobre la bacteria. Un ejemplo de esto son las betalactamasas; enzimas que hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo betalactámico. La síntesis de esta enzima resulta ser el mecanismo más frecuente de resistencia farmacológica, ya que continuamente existen mutaciones de expresión BLEE (expresión de beta-lactamasas de espectro extendido) permitiendo así la resistencia a antibióticos como la ceftriaxona (cefalosporina de tercera generación). Las BLEE suelen encontrarse asociadas a una co-resistencia con los aminoglucósidos por medio de la transferencia horizontal de genes ¹⁷.

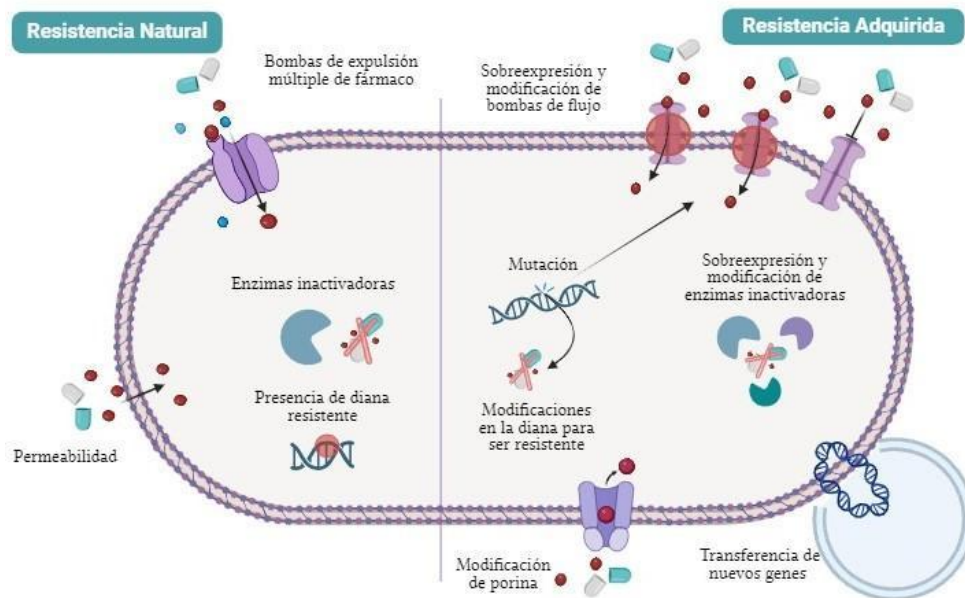


Figura 1. Mecanismo de resistencia a antibióticos. La clasificación de los principales mecanismos de resistencia natural y adquirida en bacterias.

1.2.2. Modificaciones del sitio activo

Las modificaciones del sitio activo pueden estar dadas por medio de un cambio en un aminoácido en la diana, convirtiendo así un blanco diferente y logrando la disminución por la afinidad del antibiótico. Las modificaciones más comunes son por medio del complejo enzimático PBP (penicillin-binding-protein), el cual es el encargado de producir el peptidoglicano, ubicado en la pared celular de las bacterias (especialmente en las Gram positivas), y al haber una alteración en el sitio blanco, los antibióticos no pueden actuar, provocando así resistencia a ellos. Otro mecanismo importante es por medio de la modificación ribosomal, el ribosoma es quien sufre de mutaciones en los genes *erm A* y *erm B* mediante metilación ¹⁷.

1.2.3. Disminución de la permeabilidad de la pared celular

En este mecanismo se puede ver afectado el diámetro o número de porinas en la membrana exterior, disminuyendo la posibilidad de que el antimicrobiano ingrese por la membrana y reducir la concentración intracelular para alterar el metabolismo bacteriano normal.

Los aminoglucósidos actúan por medio de este mecanismo o por bombas de expulsión (por ejemplo, la bomba MexAB-OprM) y mecanismos de metilación del ARN16s mediados por metilasas codificadas en transposones insertados en plásmidos, que confieren una resistencia de alto nivel a todos los aminoglucósidos ^{18, 19}.

1.2.4. Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo transportan el antibiótico hacia el exterior de la célula sin modificaciones previas y sin acción antimicrobiana. Al igual que las porinas, las bombas de eflujo son proteínas que controla el contenido intracelular y algunos patógenos prioritarios listados por la OMS, han logrado de inhibir el efecto de los antibióticos como el sistema de eflujo MexAB-OprM lo es la familia de las MFS (major facilitator superfamily) en *Staphylococcus aureus*, también se tiene el sistema de eflujo AcrAB-TolC, perteneciente a la familia RND (resistance nodulation division) normalmente encontrado en *E. coli* ^{20,21}.

1.3. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos que están conformados por aminoazúcares y un anillo aminociclitol (alcohol cíclico con grupos aminos), por enlace glicosídico, por lo que también se le conocen aminoglucósidos-aminociclitoles ²¹. Se pueden obtener de productos naturales o derivados semisintéticos de compuestos provenientes de actinomicetos del suelo ^{21,22}.

Los aminoglucósidos dan inicio cuando se descubre que el género de *Streptomyces* es un productor natural de antibióticos, siendo uno de los más importantes por la producción de múltiples fármacos antibacterianos, antifúngicos y antiparasitarios ²². Todos los aminoglucósidos naturales empleados hasta ahora son producto de los géneros *Streptomyces* o *Micromonospora*, y cada uno de estos se identifica con el sufijo “-micina”.

La estreptomina se aisló por primera vez de cepas de *Streptomyces griseus* en 1944, siendo el primer aminoglucósido (AMG) y el primer antibiótico disponible para combatir infecciones contra *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la enfermedad de tuberculosis ²³. Pocos años después, en 1949 se descubre la neomicina, aislada de *Streptomyces fradiae*, la cual tenía un potencial tóxico, dando paso al descubrimiento de la kanamicina en 1957 (aislada de *Streptomyces kanamyceticus*), convirtiéndose en el AMG de elección ^{22,23}.

Los AMG se clasifican en función de dos tipos de anillos aminociclitolos. El grupo de las estreptominas está constituido por un anillo de estreptidina en posición lateral. Los grupos de las neomicinas, kanamicinas y gentamicinas están constituidos por un anillo central de 2-desoxiestreptamina ²².

Los aminoglucósidos constituyen un grupo de antibióticos de amplio espectro que han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de infecciones bacterianas severas, particularmente aquellas causadas por bacilos gramnegativos. Desde hace varias décadas, estos compuestos se han empleado de manera complementaria con antibióticos β -lactámicos, dada la sinergia farmacodinámica que se establece entre ambos. Esta combinación terapéutica ha demostrado mejorar la eficacia antimicrobiana, ya que los β -lactámicos comprometen la integridad de la pared celular bacteriana, facilitando así la entrada de los aminoglucósidos, los cuales ejercen su acción inhibiendo la síntesis proteica bacteriana mediante la unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, provocando errores en la lectura del ARN mensajero y, en consecuencia, la producción de proteínas defectuosas.

Sin embargo, en años recientes se ha evidenciado una diseminación creciente de determinantes genéticos de resistencia frente a los aminoglucósidos, lo que representa una amenaza significativa para su eficacia terapéutica. Los mecanismos de resistencia descritos incluyen la modificación enzimática del antibiótico mediante enzimas como acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas, que inactivan la molécula antes de alcanzar su sitio de acción; la alteración estructural de los sitios de unión ribosomales; la disminución de la permeabilidad de la membrana externa; y la sobreexpresión de bombas de eflujo, que reducen la concentración intracelular efectiva del fármaco.

1.3.1. Mecanismo de acción

Los aminoglucósidos primero actúan sobre la superficie, gracias a que son moléculas cargadas positivamente, les permite pasar la membrana externa al desplazar los iones de magnesio y calcio que se enlazan a las moléculas de lipopolisacáridos adyacentes; provocando un cambio en la permeabilidad de la membrana externa. Una vez que la molécula de aminoglucósido atraviesa fácilmente la barrera de peptidoglicano (grampositivos y gramnegativos), en donde requieren transporte activo dependiente de oxígeno, (por lo que su actividad contra anaerobios estrictos es escasa) y se concentra en torno a la membrana citoplásmica ^{22, 24}. En consecuencia, estas moléculas buscan al ribosoma, específicamente la subunidad 30S, donde se unen diferentes proteínas S y al ARN 16S, bloqueando la actividad del complejo de iniciación, inhibiendo la síntesis de proteínas y a su vez, generando una lectura errónea del ARNm. También pueden actuar interrumpiendo la fase de elongación peptídica ²⁴.

Todos los aminoglucósidos son eficaces contra microorganismos aerobios debido a que los anaerobios carecen del sistema de transporte dependiente de oxígeno. Se requieren principalmente para hacer frente a microorganismos entéricos Gram negativos^{21,25}. La propagación de estos mecanismos de resistencia, tanto en el ámbito hospitalario como comunitario, ha limitado considerablemente las opciones terapéuticas disponibles frente a patógenos multirresistentes, comprometiendo la efectividad de los tratamientos combinados con aminoglucósidos y β -lactámicos que durante décadas representaron un pilar fundamental en la terapia antimicrobiana.

1.3.2. Mecanismo de resistencia de los aminoglucósidos

El mecanismo de resistencia se da con bacterias que impiden la entrada al interior de la membrana por la escasa afinidad del compuesto por el ribosoma bacteriano o debido a que las moléculas de aminoglucósido son inactivadas por transferasa que catalizan la acetilación de funciones amina y la transferencia de grupos fosforilo o adenilo a los átomos de oxígeno de los radicales hidroxilos. Las transferasas pueden ser transmitidas por plásmidos y cada fármaco de la familia de los aminoglucósidos confiere una sensibilidad distinta a estas enzimas^{24,25}.

Los aminoglucósidos suelen encontrar resistencia a través de tres mecanismos clave: la alteración enzimática, los procesos de expulsión activa y la metilación del ARN16s. Estos procesos son facilitados por metilasas, las cuales están codificadas en transposones que se insertan en plásmidos. Adicionalmente, las variaciones en la concentración intracelular, que pueden ser causadas por cambios en la permeabilidad de

la membrana externa o por bombas de expulsión (como MexAB-OprM), representan mecanismos de resistencia de alto nivel aplicables a todos los aminoglucósidos.

En *Enterobacterias*, los dos mecanismos principales de resistencia son las modificaciones enzimáticas de los aminoglucósidos o modificación en su diana ²⁶.

1.3.3. Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Se conocen al menos tres familias de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) y todas han sido descritas en *Acinetobacter baumannii*, una bacteria cocobacilo patógeno Gram negativa y resistente a la mayoría de los antibióticos. Estas enzimas son nucleotidil adenil-transferasas (ANT), fosfo-transferasas (APH) y acetiltransferasas (AAC). Cada una cuenta con múltiples de variantes que transfieren a ciertas posiciones de las moléculas de aminoglucósidos AMP, fosfato o acetil-coenzima A, respectivamente, anulando su efecto antibacteriano. Las enzimas que provocan mayor nivel de resistencia son las APHs y las AACs ²⁶.

1. 4. Kanamicina

La kanamicina es un aminoglucósido de amplio espectro bactericida por hacer frente a bacterias Gram positivas y negativas aeróbicas y *Mycobacterium*. Está constituido por un anillo central de 2-desoxiestreptamin ²². El principal mecanismo de acción es la interrupción de la síntesis proteica durante la transferencia de aminoácidos del aminoacil-ARNt a los ribosomas. Una de las ventajas de este antibiótico es que crea una codificación falsa y genera polipéptidos incorrectos, siendo un excelente bactericida por su citotoxicidad ²⁷. Este mecanismo lo hace a través de la retención en el ribosoma de los aminoacil-ARNt que no corresponden al codón establecido en el sitio A del ribosoma ²⁸.

Las *Enterobacterias* hospitalarias y *P. aeruginosa* suelen ser actualmente resistentes a este antibiótico ²⁸.

Capítulo 2

2. ANTECEDENTES

2.1. Tratamientos alternativos

Dado a que el problema de resistir antibióticos parece no estar cerca de un final, ya que existen bacterias multidrogo resistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pan-resistentes (PDR), siendo estas últimas las más peligrosas por ser resistentes a todo tipo de antibiótico, la eficiencia de los antimicrobianos va en declive hasta la obsolescencia. Por lo tanto, la comunidad científica ha diseñado nuevos tratamientos antimicrobianos prometedores para combatir MDR, XDR o PDR. Entre las nuevas terapias se pueden encontrar los péptidos antimicrobianos, nanopartículas orgánicas (micelas, liposomas) y metálicas (Ag, Cu, Ni y Zn), tratamientos combinatorios entre antibióticos con nanotecnologías (nanoesferas, nanocápsulas, nanopartículas, etc.), terapia de fagos y oligonucleótidos antisentido ^{29, 30, 31}.

2.1.1. Estrategias basadas en ADN/ARN

2.1.1.1. Sistemas CRISPR-Cas antimicrobianos

El paradigma terapéutico que aprovecha la tecnología CRISPR-Cas como una estrategia antimicrobiana de precisión se cimienta en el principio de la direccionalidad molecular. Este enfoque implica la programación de un complejo ribonucleoproteico

(RNP), compuesto por una nucleasa Cas (frecuentemente Cas9) y una molécula de ARN guía (gARN), para reconocer y escindir secuencias específicas dentro del material genético bacteriano. El objetivo primordial de esta intervención es la neutralización de los determinantes genéticos que confieren la resistencia a los antimicrobianos (RAM). Específicamente, la diana molecular puede ser el ácido desoxirribonucleico (ADN) de plásmidos conjugativos que actúan como vehículos de disseminación de la resistencia, o bien los genes de resistencia integrados en el cromosoma bacteriano. Como ilustran Mayorga-Ramos *et al.* (2023), un sistema CRISPR diseñado con especificidad puede inducir la "curación de plásmidos" (plasmid curing), un proceso que resulta en la eliminación selectiva de los elementos extracromosómicos portadores de los alelos de resistencia. Alternativamente, la nucleasa puede dirigirse a los loci cromosómicos que codifican para la resistencia, provocando su inactivación funcional. La consecuencia de cualquiera de estas acciones es la resensibilización de la cepa bacteriana a los agentes antimicrobianos previamente ineficaces, restaurando así la utilidad clínica de los fármacos

34 .

La introducción de este sistema genético o proteico a la célula bacteriana es un desafío de bioingeniería, resuelto mediante diversos vectores de entrega. Entre los más estudiados se encuentran los vectores plasmidiales, los bacteriófagos (modificados para expresar el sistema CRISPR-Cas) y los sistemas basados en nanopartículas lipídicas o poliméricas. Una vez internalizado, el complejo CRISPR-Cas cataliza la formación de roturas de doble hebra (DSBs) en la secuencia de ADN diana. Si el blanco es un plásmido esencial, la DSB puede llevar a la pérdida del plásmido; si la diana se encuentra en el genoma cromosómico, la falta de reparación eficaz o la generación de mutaciones letales a través de la unión de

extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR) fallida, a menudo culmina en la muerte celular de la bacteria ³⁴.

A pesar de su promesa, la translación clínica y biológica de esta tecnología enfrenta limitaciones inherentes. Un reto crítico es la evolución de mutantes de escape (escape mutants), cepas que adquieren mutaciones en el sitio de reconocimiento del gRNA o en el motivo adyacente al protoespaciador (PAM), lo que impide la acción de la nucleasa. Adicionalmente, la existencia de mecanismos anti-CRISPR (Acr) en el microbioma, que son proteínas codificadas por fagos o plásmidos capaces de inhibir la función de las nucleasas Cas, representa una barrera evolutiva significativa ³⁴. La eficiencia de la entrega en entornos biológicos complejos y la heterogeneidad fenotípica y genotípica de las poblaciones bacterianas, que incluye variaciones en los niveles de expresión del gen de resistencia y la existencia de células persistentes, añaden capas de complejidad a la optimización del tratamiento.

Un avance significativo se ha reportado en el diseño de un sistema CRISPR-Cas9 orientado no solo a la erradicación, sino también a la prevención de la adquisición de nuevos determinantes de resistencia. Lee *et al.* (2025) describen un constructo que "vacuna" esencialmente a *E. coli*, protegiéndola activamente contra la incorporación de genes de resistencia transmitidos por los tres principales mecanismos de transferencia horizontal de genes (HGT): transformación, transducción y conjugación. Los resultados de este estudio demostraron una notable reducción logarítmica en la frecuencia de transferencia de los genes, alcanzando una disminución de uno a tres órdenes de magnitud en el evento de HGT. Estas estrategias son de imperiosa relevancia en el control epidemiológico de la diseminación de la RAM, particularmente en el caso de los genes

que confieren resistencia a aminoglucósidos, una clase de antibióticos de importancia clínica crítica ³⁵.

2.1.1.2. Análogos de ASOs: PNAs (Peptide Nucleic Acids)

El péptido nucleico análogo (PNA) representa una clase de oligómeros sintéticos caracterizados por una modificación estructural quimérica. En estas moléculas, el esqueleto fosfodiéster intrínseco a los ácidos nucleicos naturales (ADN y ARN) ha sido reemplazado por una columna vertebral peptídica neutra, a menudo basada en N-(2-aminoetil) glicina, manteniendo las bases nucleicas (adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) unidas a este backbone de forma espaciada y secuencial ³⁶.

Esta alteración confiere a los PNAs dos propiedades biológicas y fisicoquímicas de relevancia crítica. En primer lugar, la estructura peptídica le otorga una resistencia intrínseca a la degradación por nucleasas y proteasas, superando una limitación importante de los oligonucleótidos terapéuticos convencionales. En segundo lugar, su naturaleza no cargada y la configuración de sus bases propician una afinidad de unión extraordinariamente alta (mayor que la del ADN/ADN o ADN/ARN) hacia sus secuencias complementarias en el ARN o ADN objetivo ³⁶.

El mecanismo de acción antibacteriana de los PNAs se basa en la estrategia antisentido. Los PNAs se diseñan con una secuencia que es estrictamente complementaria a una secuencia diana específica dentro de la célula bacteriana. Al penetrar la membrana, estos compuestos pueden actuar a varios niveles:

- Inhibición de la Traducción: Los PNAs pueden dirigirse a secuencias críticas del ARN mensajero (ARNm) que codifican para genes de resistencia a

antibióticos o genes esenciales para la supervivencia bacteriana. La formación de un dúplex PNA/ARNm bloquea físicamente el acceso del ribosoma, impidiendo el proceso de traducción y, consecuentemente, la síntesis de la proteína funcional correspondiente ³⁶.

- **Perturbación de Estructuras Esenciales:** Alternativamente, los PNAs pueden dirigirse a regiones conservadas del ARN ribosómico (ARNr). La unión a estas regiones puede perturbar la estructura terciaria o las interacciones funcionales del ribosoma, un componente crucial de la maquinaria de síntesis proteica, lo que resulta en una inhibición global del crecimiento celular.

La validación empírica de la eficacia de los PNAs como agentes antimicrobianos se remonta a estudios seminales. Good y Nielsen (1999) demostraron la capacidad silenciadora de los PNAs dirigidos al ARNm en cepas de *E. coli*, observando una reducción dosis-dependiente en la expresión génica del objetivo y un control significativo del crecimiento bacteriano en sistemas de cultivo *in vitro* ³⁷.

En el ámbito de la patogenicidad clínica, Popella *et al.* (2022) realizaron un análisis sistemático y exhaustivo de PNAs diseñados para atacar genes esenciales en cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC), evaluando su rendimiento bajo diferentes condiciones ambientales relevantes para la infección. Esto subraya la necesidad de una optimización *in vivo* de la diana ³⁸.

Más recientemente, el desafío de la baja permeabilidad de los PNAs a través de las envolturas celulares bacterianas se ha abordado mediante la conjugación molecular. Patel *et al.* (2017) emplearon conjugados PNA-CPP (péptido de penetración celular o cell-penetrating peptide), demostrando un efecto antimicrobiano específico y robusto en el

fitopatógeno *Erwinia amylovora*. La acción de este conjugado fue mediada por la reducción cuantificable del ARNm objetivo, validando el mecanismo antisentido y resaltando el papel crucial de los CPPs como agentes de transporte molecular para mejorar la biodisponibilidad intracelular del PNA terapéutico ³⁹.

2.1.1.3. Diseño basado en transcriptómica de inhibidores antisentido

La estrategia de diseño de inhibidores antisentido fundamentada en el análisis transcriptómico representa una metodología de medicina de precisión microbiana que optimiza la selección de blancos terapéuticos. Este enfoque trasciende el mero ataque a genes de resistencia conocidos, al mapear dinámicamente el perfil de expresión génica del patógeno bajo condiciones relevantes, como la exposición a antibióticos o el contexto de la infección. Esta tecnología permite la cuantificación global y simultánea de todos los transcritos de ARN presentes en una muestra bacteriana en un momento dado.

Aunins *et al.* (2020) emplearon secuenciación de ARN (RNA-seq) para identificar genes sobreexpresados en respuestas de resistencia y luego diseñaron PNAs antisentido dirigidos a esos genes, evaluando su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. Este planteamiento permite adaptar la estrategia antisentido según el perfil de expresión del patógeno ⁴⁰.

El diseño del PNA se centra típicamente en regiones de alta accesibilidad del ARNm, a menudo cerca del codón de inicio de la traducción (AUG) o en el sitio de unión del ribosoma (RBS). La unión del PNA a su diana en el ARNm ⁴⁰:

- Bloquea la Iniciación de la Traducción: Al formar un dúplex estable, el PNA impide que el ribosoma acceda al ARNm, silenciando la expresión de la proteína.
- Induce la Degradación del ARNm: En algunos sistemas, la formación del híbrido PNA/ARNm puede marcar al transcrito para su degradación por enzimas nucleolíticas celulares.

2.1.1.4. Terapias anti-plásmido: bloqueo de transferencia

Muchos genes de resistencia a aminoglucósidos se localizan en plásmidos conjugativos. Una estrategia consiste en usar CRISPR para cortar plásmidos esenciales o dianas dentro del plásmido, provocando su pérdida en la población bacteriana ^{34, 41}. Hao *et al.* (2020) desarrollaron un sistema CRISPR-Cas9 para eliminar plásmidos que portaban genes de carbapenemasa, demostrando que es factible aplicar este concepto a otros genes de resistencia ⁴¹.

2.2. Terapia con oligonucleótidos antisentido

Los ASOs son una cadena de entre 13 a 25 nucleótidos de cadena sencilla, con complementariedad de bases de un fragmento de ARN mensajero ^{2, 31}. La vía en la que actúan los ASO es por medio de un emparejamiento específico de bases con un ARNm complementario; esta complementariedad conlleva una inhibición en la traducción debido a la interrupción estérica en el ribosoma; a su vez, estimula la degradación de la cadena

de ARNm mediada por la ribonucleasa H, que está solo degrada el ARNm del este complejo (ARNm-ASO) ³¹.

Lo que se destaca de esta novedosa tecnología es su versatilidad de aplicación, ya que se ha aplicado para disminuir células cancerígenas, impedir la replicación viral o incluso como biomarcadores; sin embargo, su uso destaca en la regulación genética para infecciones de MDR, XDR o PDR, en donde se busca genes de resistencia a patógenos para re-sensibilizarlos y emplearlos como una alternativa terapéutica ³².

Aprovechar el potencial de esta terapia trae consigo varias responsabilidades, desde la inversión económica inicial y el aprender a manejarlas para su optimización. Sin embargo, esto se compensa con la facilidad de diseño y síntesis de esta novedosa tecnología, ya que reducen el tiempo de espera en cuanto a su formulación de 6 años a 1 año.

La capacidad de los ASO va más allá que la de los antibióticos convencionales pues puede atacar a distintas bacterias y no se ven afectados por los mecanismos de resistencia; esto se debe a su capacidad de interfiere directamente con la expresión génica, por la hibridación específica entre el ASO y el ARNm diana mediante apareamiento de bases complementarias ².

La ruta de acción de los ASOs puede ser categorizada en dos mecanismos, según su diseño químico y el tipo de enlace fosfodiéster o fosforotioato que posean. Las dos rutas principales son; (1) la inhibición estérica de la traducción, donde el ASO se une al ARNm e impide el acceso del ribosoma a la secuencia codificante, y (2) la degradación

mediada por RNasa H, que reconoce los híbridos ADN-ARN y degrada el ARNm complementario, suprimiendo la síntesis proteica ³¹.

Su aplicación para combatir la resistencia bacteriana, representan una alternativa novedosa al uso de antibióticos convencionales, ya que estos permiten dirigir su acción hacia genes específicos de resistencia, como *nptII* (*KanR*), responsable de la fosforilación e inactivación de la kanamicina. Al bloquear la transcripción o traducción de los genes, los ASOs pueden restaurar la sensibilidad del del microorganismo al antibiótico, actuando como moduladores genéticos de la resistencia ^{2,32}.

2.2.1. Oligonucleótidos antisentido dirigidos a enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Varios trabajos demostraron in vitro y en modelos bacterianos que oligómeros antisentido o secuencias guía externas (EGS, que promueven el corte por RNasa P) dirigidas al ARNm de la enzima acetiltransferasa AAC (6')-Ib (responsable de resistencia a amikacina y otros aminoglucósidos) reducen la expresión enzimática y disminuyen la resistencia en cepas experimentales ⁴². Estos estudios incluyen análisis de accesibilidad del ARNm, ensayos de degradación por RNasa H/RNasa P y reducción de concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) cuando se introducen los oligómeros en bacterias permeabilizadas o mediante electroporación ^{42, 43, 44}. Estas investigaciones aseguran la especificidad al dirigirse a secuencias conservadas y/o emplear dianas múltiples reduce la probabilidad de escape, pero la presión selectiva puede favorecer variantes, lo que podría implicar resistencia evolutiva. Sin embargo, estas investigaciones

aún se encuentran en fase preclínica para la mayoría de las aplicaciones antibacterianas; la evidencia clínica directa falta.

2.2.2. Oligonucleótidos químicamente modificados y conjugados a péptidos

Para salvar la barrera de entrada celular y la degradación enzimática se han probado análogos resistentes (PNAs, PMOs, LNA/BNA, 2'-O-modificaciones) y oligómeros unidos a péptidos penetrantes de membrana (CPP). Un ejemplo importante es un oligómero híbrido con 2',4'-bridged nucleic acid (BNA) conjugado a un péptido penetrante que redujo la resistencia mediada por AAC(6')-Ib en *Acinetobacter baumannii* y mostró eficacia en modelos preclínicos ⁴⁵.

Investigaciones previas se han realizado estudios de ASOs y análogos dirigidos a enzimas que confieren resistencia a aminoglucósidos, entre estas aplicaciones destacan trabajos sólidos sobre ASOs, EGS (external guide sequences) y PNAs dirigidos a enzimas como AAC(6')-Ib (que confiere resistencia a amikacina y otros aminoglucósidos) y que muestran resensibilización *in vitro* o en modelos preclínicos ^{42, 43, 44}. Estos estudios prueban el principio de atacar ARNm de enzimas modificadoras de aminoglucósidos ⁴⁵.

2.2.3. Administración de oligonucleótidos antisentido

La administración intracelular de ASOs en bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, se considera inherentemente difícil debido a las barreras de permeabilidad intrínsecas de su envoltura celular ⁴⁶. La barrera más significativa es la membrana externa (OM, por sus iniciales en inglés, Outer Membrane). Está compuesta por una bicapa asimétrica de

fosfolípidos en la capa interna y lipopolisacáridos (LPS) en la capa externa. La mayoría de los ASOs son moléculas altamente hidrofílicas y están cargadas negativamente, lo que dificulta enormemente su capacidad para atravesar la región hidrofóbica central de la membrana externa. El paso a través de la OM está estrictamente regulado por porinas y otros canales de transporte. Los ASOs son generalmente demasiado grandes y cargados para utilizar eficientemente estas vías⁴⁷.

Una vez que un ASO hipotéticamente atraviesa la OM, se encuentra con el espacio periplásmico, que contiene una alta concentración de nucleasas degradativas. Aunque los análogos de ASOs, como los PNA o el 2'-O-metil ARN, son más resistentes a las nucleasas que el ADN/ARN natural, no son completamente invulnerables. El tránsito lento por el periplasma aumenta la probabilidad de ser detectados y degradados. Finalmente, para llegar a su diana (el ARNm) en el citoplasma, el ASO debe cruzar la membrana interna, una bicapa fosfolipídica con un estricto control de transporte³³. Esto sucede a que solo permite el paso de moléculas específicas mediante proteínas transportadoras o canales, por lo que solo pueden pasar nutrientes o metabolitos naturales, no moléculas grandes o sintéticas como un ASO⁴⁶. Es por eso que se dice que hay un control estricto puesto a que no existe un transporte libre ni por difusión, y las moléculas no reconocidas simplemente no entran. Por lo tanto, el tamaño del ASO no es el único obstáculo, sino la falta de un mecanismo natural que permita su paso a través de la membrana interna.

En resumen, la eficacia terapéutica del ASO depende de su capacidad para alcanzar una concentración intracelular suficiente en el citoplasma. Sin un mecanismo de entrega (como el encapsulamiento o conjugación con AuNPs), la mayoría de los ASOs

simplemente se quedan fuera de la célula o son degradados antes de llegar a su destino ³²,

46

Por lo tanto, el máximo desafío que presentan los ASO es la administración eficiente, pero este problema se supera con modificaciones químicas ^{31,32}.

La estrategia más empleada es la modificación química es del esqueleto de los oligonucleótidos, el anillo de ribosa y las bases nitrogenadas que lo componen; por otro lado, el uso de moléculas transportadoras podría ser una de las estrategias más prometedoras ^{32,33}.

2.2.4. Nanopartículas con oligonucleótidos antisentido

De los materiales más empleados para transportar a los ASO son los nanotubos de carbono, péptidos, nanopartículas metálicas y magnéticas, siendo las nanopartículas de oro (AuNPs) las más atractivas por sus características físicas y químicas ^{2,33}. La estrategia de acoplar ASOs a nanopartículas para protegerlos y facilitar su entrada bacteriana ha mostrado resultados prometedores en otros genes de resistencia. Por ejemplo, nanopartículas de oro recubiertas con multicapa (MLGNPs, por sus siglas en inglés) cargadas con ASOs dirigidos a *mecA* (resistencia a β -lactámicos en *S. aureus*) lograron silenciamiento significativo del gen y restauraron sensibilidad al antibiótico en ensayos in vitro, demostrando que AuNPs pueden ser vectores eficaces para ASOs en bacterias gram-positivas ⁴⁹.

Existe evidencia de que conjugados de AuNPs cargados con ASOs se han usado para silenciar genes de resistencia; el trabajo de Beha *et al.* (2021) constituye un ejemplo

significativo de la nanoestructura aplicada a la terapia antisentido, demostrando la viabilidad de utilizar nanopartículas de oro como vectores de entrega para superar las limitaciones de estabilidad y penetración celular de los oligonucleótidos.

El estudio se centra en el desarrollo y la aplicación de MLGNPs, un sistema de delivery sofisticado. Estas AuNPs no son meros soportes inertes, sino plataformas de conjugación diseñadas para una carga útil específica: los ASOs. La estructura multicapa probablemente optimiza varios factores críticos, como la protección del ASO contra la degradación por nucleasas séricas o celulares, y la facilitación de la captación celular (endocitosis). El blanco seleccionado es el gen *mecA* que codifica a la PBP2a (penicillin-binding protein 2a), una transpeptidasa con baja afinidad por los β -lactámicos, que es el determinante genético primario de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* (SARM). La estrategia terapéutica se basa en un mecanismo antisentido directo:

- Entrega Intracelular: Las MLGNPs, portando los ASOs, son internalizadas por las células de *S. aureus* (SARM).
- Unión al ARNm: Una vez liberados en el citoplasma, los ASOs hibridan con la secuencia complementaria del ARN mensajero (mRNA) del gen *mecA*.
- Silenciamiento Génico: Esta formación del dúplex ASO/mRNA bloquea la traducción del mensaje genético por el ribosoma o, alternativamente, marca el mRNA para la degradación por la RNasa H.

Los resultados reportados por Beha *et al.* (2021) establecieron una prueba de concepto sólida; se logró una disminución cuantificable y significativa en los niveles de expresión del gen *mecA* y, por inferencia, de la proteína PBP2a. La reducción de PBP2a

resultó en la reversión del fenotipo de resistencia a la meticilina. Es decir, las bacterias SARM tratadas volvieron a ser sensibles a este antibiótico *in vitro*. Esto confirma la viabilidad y eficacia de la plataforma ASO-AuNP para el silenciamiento génico en un patógeno Gram-positivo clínicamente relevante ⁴⁹. Las AuNPs resuelven estos problemas actuando como vehículos de transporte que facilitan el cruce de las membranas de la bacterianas, al estar conjugados a la superficie de las AuNPs, los ASOs están protegidos de la acción de las nucleasas en el medio externo y en el espacio periplásmico ^{47, 49}.

El gran tamaño de las AuNPs favorece su adsorción a la superficie bacteriana. Se ha propuesto que las AuNPs pueden inducir su translocación a través de la envoltura celular, posiblemente al interactuar con el LPS o al inducir un tipo de endocitosis-like o disrupción de membrana ^{48, 49}. Las AuNPs permiten empaquetar múltiples copias del ASO, asegurando una entrega concentrada una vez que el vehículo ha superado las barreras.

Las ventajas que ofrece este material es su baja toxicidad y biocompatibilidad, la facilidad en su producción y anclaje de moléculas a su superficie por interacciones electrostáticas o covalentes. Lo destacable de los AuNPs es que su estructura química les permite una adsorción con compuestos alcanotiolados, especialmente posee una bien establecida química de adsorción con los grupos tiol.

Por lo tanto, si tomamos esa característica para su optimización, se podría aprovechar el enlace covalente “S-Au”, resultante de la adsorción química de un compuesto modificado con un grupo tiol, para el anclaje de moléculas sintéticas y/o biológicas a las AuNPs ⁴. Entonces, si tomamos un grupo tiol a uno de los extremos de la cadena de ASO, será posible que estos se unan a nanopartículas de oro y de esta forma, beneficiar la llegada hacia el interior de la célula blanco ⁵⁰.

En este contexto, el presente estudio aborda una estrategia de re-sensibilización bacteriana con el uso de ASOs anclados por enlaces tiol a AuNPs. Las AuNPs se proponen como plataformas nanométricas de entrega con una función dual: servir como sistemas de transporte dirigidos y conferir estabilidad estructural a los ASOs, favoreciendo su acceso intracelular y la inhibición específica del ARNm del gen de resistencia *kanR*.

2.3. Blanco seleccionado

Para razón de esta investigación se tomará como objeto de estudio el gen de resistencia a kanamicina (*KanR*), identificado molecularmente como *nptII* (o alternativamente *aph(3)-IIa*). Este determinante genético confiere resistencia a una subclase de aminoglucósidos análogos, que incluyen compuestos como la Kanamicina, Paromomicina, la Geneticina y la Butirosina^{51, 52}. El gen *nptII* tiene su origen en el transposón Tn5, un elemento genético móvil, y fue originalmente aislado en cepas de *E. coli*. Este gen, codifica para la enzima aminoglucósido 3'-fosfotransferasa II (APH(3')-IIa), también conocida como Neomicina Fosfotransferasa II (NPTII). El mecanismo bioquímico de resistencia mediado por esta enzima es la detoxificación por fosforilación⁵³. La NPTII cataliza la transferencia de un grupo fosfato, utilizando el trifosfato de adenosina (ATP) como donante, a un grupo 3-hidroxilo (-OH) específico ubicado en la porción aminohexosa de la estructura química de los antibióticos aminoglucosilados. Esta modificación química resulta en la inactivación irreversible del antibiótico, impidiendo su unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y, por lo tanto, aboliendo su actividad antimicrobiana.

2.3.1. Mecanismo de resistencia conferido por *nptII*

La enzima fosfotransferasa (APH(3')-II) añade un grupo fosfato al antibiótico, lo que reduce su afinidad por el sitio ribosómico donde realiza su efecto tóxico (comprometiendo la traducción). Este proceso de modificación impide que el antibiótico produzca errores en la síntesis de proteínas, lo que es el mecanismo habitual de acción de los aminoglucósidos. En cuanto a la especificidad del sustrato, APH(3')-II fosforila a particulares aminoglucósidos que tienen el sitio 3'-hidroxilo accesible. No todos los aminoglucósidos son sustratos eficaces. Por ejemplo, *nptII* no suele conferir resistencia a antibióticos como amikacina, aunque puede haber mutaciones que amplíen su rango de acción en condiciones de laboratorio.

La estructura genética y la ecología de los genes de resistencia difieren entre bacterias. *Pseudomonas aeruginosa* suele acumular múltiples mecanismos (bombas de eflujo, alteraciones de permeabilidad, AMEs y metiltransferasas del 16S rRNA), y los perfiles varían por región; *nptII* aparece rara vez en series clínicas grandes ^{54, 55}. *Enterococcus faecalis* muestra también diversidad de mecanismos; los genes *aph(3')* existen en algunas poblaciones, pero *nptII* no es reportado como frecuente en las últimas series de vigilancia. ^{54, 56}.

En un contexto ambiental y agrícola, *nptII* ha sido detectado con mayor frecuencia en contextos ambientales o agrícolas (p. ej. su uso como marcador en organismos genéticamente modificados y su diseminación en suelos), pero esa presencia ambiental no se traduce necesariamente en alta prevalencia clínica en humanos ^{58, 59}.

2.3.2. Estudios de vigilancia

Estudios de caracterización genética de aislados resistentes a aminoglucósidos publicados entre 2022 y 2024 muestran que los genes *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia* se reportan con mucha mayor frecuencia en aislamientos clínicos (incluyendo *Pseudomonas* resistentes y *Enterococcus*), mientras que *nptII* no es una diana común en estas series. Por ejemplo, Saeli *et al.* (2024) analizaron 96 aislamientos de *Pseudomonas* resistentes y encontraron alta prevalencia de *aac(6')-Ib* y *ant(2'')-Ia*; *nptII* no fue identificado como diana dominante, sin embargo, si cuenta incidencia baja ⁵⁴.

Estudios locales y regionales (2022–2024) que realizan PCR/WGS en *Enterococcus faecalis* clínico también muestran perfiles heterogéneos de resistencia (bajo a moderado para aminoglucósidos dependiendo de la región), y *nptII* no suele figurar entre los genes más detectados en su lugar aparecen otros AMEs y, cuando hay resistencia de alto nivel, a veces metiltransferasas del 16S rRNA u otras combinaciones ^{56, 59}.

Dada la baja prevalencia clínica, proyectos que propongan ASO-AuNP dirigidos a *nptII* podrían ser muy útiles para estudios de prueba de concepto.

Capítulo 3

3. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El uso de oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen *KanR*, conjugados en nanopartículas de oro, resensibilizará cepas de *Escherichia coli* resistentes a la kanamicina, reduciendo su concentración mínima inhibitoria.

3.2. Objetivo General

Sintetizar oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen *KanR* y conjugarlos con nanopartículas de oro para resensibilizar cepas de *Escherichia coli* resistentes a kanamicina, evaluando la concentración mínima inhibitoria de kanamicina en presencia y ausencia del tratamiento propuesto.

3.3. Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar AuNPs.
2. Diseñar la secuencia de ASO dirigida al gen *KanR*
3. Conjugar los ASO con las AuNPs y caracterizar el sistema resultante.
4. Transformar *E. coli* ATCC 11229 con el plásmido pUC57-Kan, que contiene el gen *KanR*, para generar resistencia a kanamicina.
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria de kanamicina en *E. coli* resistente en presencia y ausencia del sistema ASO-AuNPs.

Capítulo 4

4. METODOLOGÍA DEL TRABAJO

4.1. Materiales y equipo

Todos los productos químicos y reactivos empleados en este trabajo fueron de grado analítico y se adquirieron de las empresas CTR Scientific (Monterrey, NL, México), Biobasic y Addgene (USA). Los reactivos necesarios que se utilizaron en el proyecto fueron: medios de cultivo LB Miller (Difco), agar bacteriológico (BD, Bioxon), fosfato dipotásico (K_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), cloruro de oro (III) ($AuCl_3$), citrato de sodio, fosfato disódico (Na_2HPO_4), fosfato monosódico (NaH_2PO_4), kanamicina, secuencias de ASO, plásmidos, solución salina tamponada con fosfato (PBS), agua ultrapura (18 M Ω), ditiotreitól (DDT).

El material y los equipos que se emplearon se encontraron disponibles en el Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología: micropipetas de volumen variable (0.1-10, 2 – 20, 10 – 100, 20 – 200 y 100 – 1000 μ L, Eppendorf); espectrofotómetro (Opizen PLUS, Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer), autoclave (Lab Companion), campana de flujo laminar (Labconco), equipo de electroforesis (miniPCR), balanza analítica (AND), balanza granataria (Ohaus) incubadora con agitación (Lab. companion); incubadora estática (Lab companion); centrífuga de piso (Thermo Scientific) equipada con un rotor para tubos de 1.6, 5 y 50 mL (Fiberlite); microcentrífuga (Ohaus), microondas

(Everstar), horno de secado (Shield Lab), refrigerador 4°C / Congelador -20°C (Norlake scientific).

El material de vidrio utilizado fue el siguiente: Matraz Erlenmeyer de vidrio 125, 250, 500 y 1000 mL (Kimax), vaso de precipitado de 250, 500, 1000 y 2000 mL (Pyrex). Los materiales consumibles de plástico empleados fueron; tubos para centrifuga de 15 y 50 mL (Corning), puntillas para micropipetas de volumen variables 0.1-20 µL, 1-200 µL, 100-1000 µL (SSI) (Corning), columnas NAPTM-5 Sephadex (cytiva), tubos de 0.2, 0.6 y 1.6 mL (SSI).

4. 2. Condiciones de cultivo

La cepa bacteriana de estudio es *E. coli* ATCC 11229 y se adquirió de Invitrogen. Para su crecimiento se utilizó caldo Luria-Bertani (LB). Se inoculó en caldo LB y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) en una incubadora agitadora durante 18h (cultivo durante la noche). Posterior a la incubación se realizó una suspensión bacteriana por centrifugación, para cambiar a un medio nuevo y se incubó a 37 °C con agitación (150 rpm) nuevamente para determinar la OD a 600 nm empleando el espectrofotómetro UV/VIS (Optizen PLUS).

Para obtener la cepa resistente a kanamicina se utilizó *E. coli* ATCC 11229 y se transformó con el plásmido pUC57-Kan bajo las indicaciones del kit TransformAid Bacterial de Thermo ScientificTM. Todas las pruebas realizadas con *E. coli* ATCC 11229 y *E. coli* resistente a kanamicina se realizaron en medio LB Miller.

4.3. Diseño de oligonucleótidos antisentido

Todas las secuencias de nucleótidos necesarias para el estudio fueron consultadas en la base de datos de “GeneBank” del NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El diseño de los ASOs se realizó a través de los programas bioinformáticos; SnapGene Viewer (<http://www.snapgene.com/>), IDT OligoAnalyzer (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>), NUPACK (<http://www.nupack.org/>) UCSC In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Los ASOs se diseñaron según Hoynes-O'Connor *et al* (2016). Brevemente, se seleccionaron los primeros 8 codones codificantes de la enzima para posteriormente comprobar que los ASOs tienen un porcentaje superior al 85% de hibridación con el ARNm diana e inferior al 85% en zonas no deseadas ⁶⁰. Se empleó BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que los ASOs no se hibridaba en áreas no deseadas del ADN genómico y plasmídico de *E. coli*.

4.3.1. Secuencia de ASO utilizada

Las secuencias de ASOs previamente diseñadas se adquirieron de T4 Oligo (Irapuato, México). Se trabajaron tres secuencias para este estudio. La secuencia 1, fue diseñada para hibridar en una región cercana al codón de inicio AUG; mientras que la secuencia 2, fue diseñada para la región central del ARNm y una tercera secuencia que sirvió como control negativo. El propósito de esto es demostrar si la posición exacta de hibridación dentro del ARNm del gen *kanR* sí puede generar diferencias en la eficiencia de inhibición, aun cuando todas las secuencias se encuentren dentro del mismo marco de lectura.

Tabla 2. Propuesta de Oligonucleótidos antisentido				
Oligonucleótido	Posición	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Modificación
<i>KanR</i>	1767 – 1786	GGCAGTTCATAGGATGGCA	20	5'SH C6
	1953 - 1922	GCCAGCCATTACGCTCGTCA	20	
Control	252 - 271	AGGCTGCGCAACTGTTGGGA	20	

4.4. Transformación de *E. coli* ATCC 11229 en una cepa resistente a kanamicina

Se utilizó la técnica de electroporación para la transformación de las cepas resistentes y la propagación de los plásmidos. Para esto, se siguió la metodología propuesta por Tu *et al* (2016), con algunas adaptaciones ⁶¹.

4.4.1. Preparación de células electrocompetentes

Para la obtención de células viables electrocompetentes se tomó un inóculo de 5 mL de medio LB con 20 μ L de *E. coli* ATCC 11229 a 37°C, 150 rpm durante 18 horas. Con esas colonias, se prepararon 5 nuevos inóculos con 1.4 mL de medio LB y 100 μ L del cultivo overnight, para después ser depositados en tubos de 1.6 mL, se cultivó de nuevo a 37 °C a 900 rpm en la incubadora de piso; de 2 tubos se observó la densidad óptica a 60 nm (OD₆₀₀) y los otros 2 restantes se tomaron como control de viabilidad. Una vez que se alcanzó el valor 0.6 como OD₆₀₀, las células se centrifugaron a 9000 rpm a 24 °C por 2 min para después descartar el sobrenadante y re-suspender las células en 1 mL de agua ultrapura. Fue necesario un segundo lavado, para posteriormente centrifugar a 9000 rpm a 24 °C por 2 min para después descartar el sobrenadante y re-suspender las células en

30 μL de agua ultrapura y los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente. Posterior a eso, se le agregaron 300 ng del plásmido pUC57-Kan para obtener un volumen final de 40 μL . El ADN y las células bacterianas se transfirieron a una celda de electroporación de 1 mL, con una separación de 2 mm y se electrizaron a 2500 V. Una vez realizado lo anterior, la celda se enjuago con 1 mL de medio LB fresco (este paso ayudó a las células a recuperarse y evitar estrés celular) y se dejó incubando a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, el cultivo con células transformadas se sembró en agar LB con concentración de kanamicina de 100 ppm.

4.4.2. Selección de células transformadas

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a la selección de colonias aisladas. Estas colonias se tomaron de la placa de agar LB que contenía kanamicina y, a continuación, fueron transferidas utilizando un asa a un tubo de 5 mL con medio LB suplementado con kanamicina. Finalmente, los tubos se almacenaron y las colonias se preservaron bajo refrigeración a 4 °C.

4.4.3. Extracción de ADN plasmídico

Para este proceso se empleó el kit de extracción PureLink™ Quick Plasmid Miniprep, siguiendo las indicaciones del fabricante, con el fin de corroborar la integración de éste.

4.4.4. Análisis del ADN plasmídico

Este proceso se realizó mediante una restricción enzimática con la enzima BamHI, siguiendo el protocolo del proveedor de la enzima (Thermo Scientific). Se agregaron 16 μL de agua ultrapura, 2 μL buffer 10X BamHI 1 μL de ADN plasmídico (0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y

BamHI 0,5 - 2 35 μL , a un tubo de 0.6 mL; a un segundo tubo se agregó 2 μL buffer 10X EcoRI μL de ADN plasmídico (0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y EcoRI 0,5 - 2 35 μL ; y se incubaron a 37°C por 1 hora. Las enzimas se inactivaron con una segunda incubación a 80°C por 20 min.

El resultado de los fragmentos del plásmido se analizó por medio de una electroforesis en el equipo de miniPCR. Para su análisis se emplearon un gel de agarosa al 2% utilizando buffer TAE 1X para correr la electroforesis, usando una mezcla de 1.5 μL de jugo azul, 1.5 μL de GelRed y 3- 5 μL de cada muestra, para ser observado en el equipo donde, se someterá a luz ultravioleta. El resultado que se espera observar es la banda correspondiente al plásmido incorporado.

4. 5. Síntesis de nanopartículas

Para la síntesis de AuNPs se empleó el método de Turkevich, siendo una técnica clásica para obtener AuNPs y se basa en el principio de calentar el ácido cloroaurico con citrato de sodio, para formar un coloide de oro que resulta en un color rojo rubí característico.

Se siguió la siguiente metodología; se agregaron 10 mL de una solución de cloruro de oro (III) (AuCl_3) al 0.01%, se llevó a punto de ebullición para posteriormente, agregar 100 μL de citrato de sodio 10%. La solución obtuvo un viraje de amarillo pálido a un violeta-rojizo al transcurrir unos 10-15 minutos; transcurrido el periodo, se dejó atemperar y se almacenó a 4°C para su uso futuro ⁶³.

4.5.1 Purificación de los ASO y anclaje a AuNPs

Se utilizó una columna NAPTM5 para purificar los ASO. Una vez obtenida la solución de ASO purificada, se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los ASOs una vez purificados fueron anclados a las AuNPs mediante una modificación alcanotiol en el extremo 5' del ASO. Las AuNPs se adhieren a los oligos gracias al enlace covalente Au-S, que se forma entre el azufre del grupo tiol y el oro de la superficie. Este enlace es fuerte, estable y permite anclar los oligos de manera orientada y funcional.

Para mantener la forma de tiol activa, se debe de reducir el enlace disulfuro previo al anclaje de las AuNPs. Esta metodología se basa en la de Hurst *et al* (2006), con algunas adaptaciones. En un tubo de 0.5 mL, se añadieron 52 μL de agua ultrapura, 10 μL de una solución de ASO (100 μM), 20 μL de DTT (0.5M), 18 μL de PBS (1 M, pH 8) ⁶². La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente por 1 h.

4.5.1.1. Conjugación de los ASO a las AuNP

Para la conjugación de los ASOs y las AuNPs debe seguirse la siguiente metodología planteada por Hurst y colaboradores; en un tubo de 15 mL se añadieron 60 μL de ASOs (concentración final de 2.15 μM), 7 mL de AuNP (concentración final 2.15 nM), se incubaron a temperatura ambiente por 16 h. Transcurrido el periodo, se agregaron, por goteo, PBS hasta una concentración de 10 mM (pH 7.4) y NaCl hasta una concentración 50 mM; se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la concentración de sal se incrementó hasta 10 mM y se dejó incubando por 24 h. Finalmente, el producto resultante se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso futuro.

4.6. Purificación y caracterización de las AuNPs y ASO-AuNPs

La metodología de Balasubramanian y colaboradores fue la seleccionada para poder realizar el proceso de purificación. De la solución de AuNPs se transfirió 1 mL a un tubo de 1.6 mL y se llevó a varios ciclos de centrifugación. En el ciclo 1, se centrifugó a 7000 g por 20 min, posterior a eso, se obtuvo un pellet aceitoso de color rojizo de forma, de nombre Pt 1, se descartó el sobrenadante (Sb 1) y se re-suspendió nuevamente en agua ultrapura. Sb 1 se transfirió a un nuevo tubo de 1.6 mL y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, a partir de ahí se obtuvo un nuevo pellet (Pt 2) y se descartó el sobrenadante. Pt 1 y Pt 2, se combinaron y comenzó un nuevo ciclo de centrifugación ⁶⁴.

El conjugado de ASO-AuNPs, se purificó mediante centrifugación a 14,000 g por 20 min. El sobrenadante se separó y se analizó mediante espectrofotometría UV-Vis a 260 nm para cuantificar la cantidad de ASO remanente no conjugado.

Para conocer la morfología y el tamaño de las AuNPs; y para caracterizar la conjugación de los ASO sobre las AuNPs, la morfología y el tamaño de ASO-AuNPs, se requirieron de la espectroscopia UV-vis y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

4.7. Concentración mínima inhibitoria

Para la solución de kanamicina, se empleó agua destilada, como vehículo, en un rango de concentración de 100 – 1024 ppm para la cepa *E. coli* ATCC 11229 y de 8-8,200 ppm para *E. coli* resistente. Para la obtención del inóculo, se preparó un cultivo “overnight” (20 h de cultivo a 37°C y 150 rpm) para las cepas de *E. coli* ATCC 11229, posteriormente se hizo una dilución 1:250 en medio fresco y se incubó nuevamente hasta

alcanzar una OD₆₀₀ de 0.2 ± 0.02 . Para el ajuste, se requirió medio LB fresco para obtener un rango de concentración de 10^7 - 10^8 células/mL. A partir de este ajuste, se necesitó preparar una dilución 1:100 y se agregaron 100 μ L a cada uno de los pozos para alcanzar una concentración final de 10^5 células/mL.

Posterior de este paso, se agregaron las células, previamente se adicionaron al pozo diferentes cantidades de kanamicina y se aforó el volumen con medio LB hasta completar 200 μ L. Las microplacas procedieron a un periodo de incubación por 24 h a 37°C y 150 rpm. Posterior a la incubación se leyó la OD₆₀₀. La MIC de kanamicina para las cepas de *E. coli* ATCC 11229 será aquel valor de concentración del antibiótico en donde, se vea suspendido o no sea apreciable el crecimiento de la bacteria en contraste al crecimiento sin antibiótico.

4.7.1. Combinatorias de ASO-AuNPs sobre el crecimiento de *E. coli* resistente

Se evaluó el efecto del tratamiento con kanamicina, AuNPs, ASO-AuNPs sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* transformada con pUC57-*KanR*. La metodología se adaptó del protocolo descrito por Meng *et al.* (2015), con modificaciones orientadas al sistema experimental utilizado en este estudio.

Para la obtención del inóculo, se realizó un cultivo *overnight* (18 h, 37 °C, 150 rpm) de *E. coli* pUC57-*KanR*. Posteriormente, se efectuó una dilución 1:250 en medio LB fresco y se incubó nuevamente hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2 ± 0.02 a 600 nm (OD₆₀₀). El ajuste final se realizó con medio LB para obtener una concentración aproximada de 10^7 – 10^8 UFC/mL.

A partir de esta suspensión, se preparó una dilución 1:20, y se adicionaron 20 μL a cada pozo de una placa de 96 pocillos para obtener una concentración final de $\sim 10^5$ UFC/mL. Posteriormente, se aplicaron diferentes concentraciones de kanamicina (8 - 8,200 ppm), AuNPs (5 y 10 μM) y ASO-AuNPs (5 y 10 μM), en un volumen total de 100 μL por pozo. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación orbital de 150 rpm.

El crecimiento bacteriano se monitoreó midiendo la OD600 en un lector de microplacas en distintos intervalos de tiempo (24 h). La combinación más eficaz entre kanamicina y ASO-AuNPs se determinó como aquella que, con las menores concentraciones de ambos componentes, produjo una inhibición del crecimiento significativamente mayor que los tratamientos individuales y el control positivo de crecimiento. Asimismo, el tratamiento con AuNPs sin funcionalizar sirvió para confirmar que cualquier efecto inhibitorio observado se debía principalmente a la acción de ASOs o a la sinergia con el antibiótico, y no a un efecto tóxico intrínseco de las nanopartículas de oro.

Capítulo 5

5. RESULTADOS

5.1. Acondicionamiento de la cepa y clonación de plásmido pUC57-kan.

Posterior a la transformación del plásmido pUC57-Kan en *E. coli* ATCC 11229, se procedió a inocular placas de agar LB con kanamicina a 100 ppm, para confirmar la obtención de colonias transformadas (Fig. 2. A). Se aisló una colonia transformada y se sembraron en agar Eosina y Azul de Metileno como técnica de inhibición selectiva en donde *E. coli*, como fermentadora de lactosa, produjo un verde metálico brillante en las colonias (Fig. 2. B) y se aisló una segunda colonia para inocularlo en medio LB para su incubación a 37°C, con agitación continua a 150 rpm durante toda la noche (18 horas).

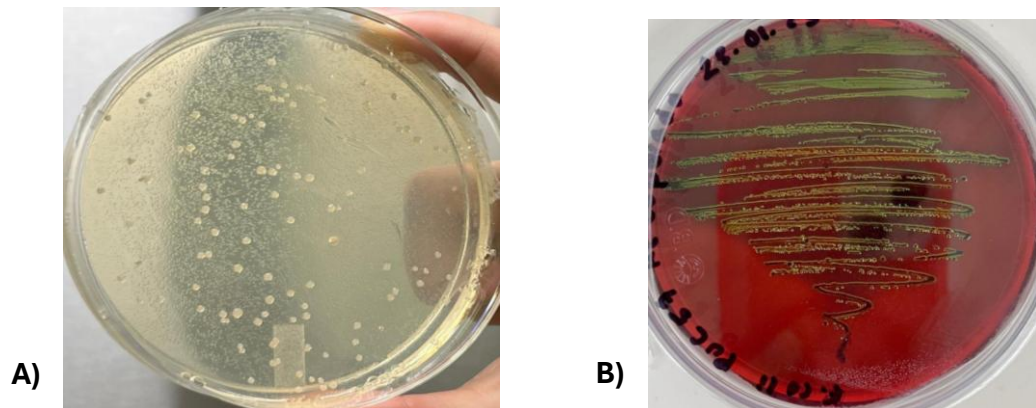


Figura 2. Colonias de *E. coli* transformada sembradas en agar LB y EMB. Colonias de *E. coli* transformadas con pUC57-KAN. A) *E. Coli* pUC57 en agar LB con 100 ppm de Kanamicina, B) *E. coli* pUC57 en agar Eosina y Azul de Metileno.

A partir de un inóculo ajustado a OD₆₀₀ de 0.002 se obtuvo la curva de crecimiento de 24 horas de *E. coli* ATCC 11229 en medio LB y en medio LB con kanamicina a 100 ppm; *E. coli* transformada 100 ppm. Se empleó como control medio de cultivo LB sin inoculación bacteriana (Figura 3).

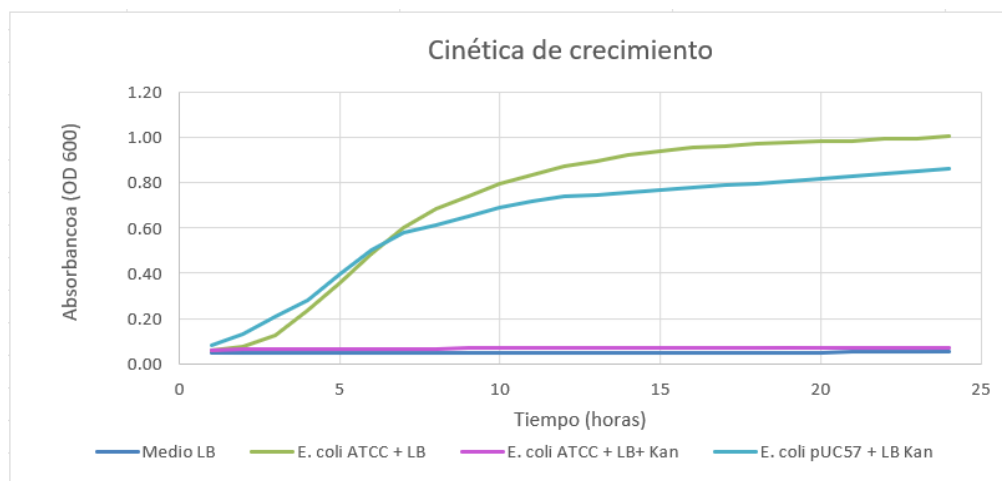


Figura 3. Cinética de crecimiento de las cepas mediante lectura de absorbancia a 600 nm durante 24 horas.

5.2.1. Caracterización plasmídica

Se realizó una restricción enzimática para visualizar fragmentos de pUC57-kan para su visualización en electroforesis en gel de agarosa al 8% (figura 4). El gel de electroforesis de plásmido pUC57-Kan en *E. coli* ATCC 11229 y los fragmentos obtenidos por la restricción enzimática. Carriles: MP. - Marcador de peso molecular Carril 2 (PS) se visualiza el plásmido a 2500 pb, carril 3 (Bam) la banda corresponde a corte con *BamHI* a 2140 pb, carril 4 (PS) corresponde a plásmido y carril 5 (Eco) la banda muestra corte con *EcoRI* a 2179 pb.

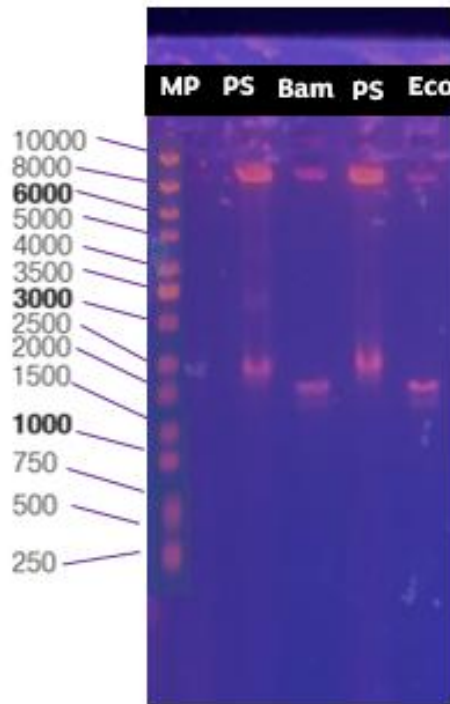


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para el plásmido pUC57-Kan en *E. coli* ATCC 11229.

5.3. Caracterización de AuNPs y ASO-AuNPs

La caracterización de las AuNPs y los conjugados de ASOs con AuNPs (ASO-AuNPs) utilizando Espectroscopia UV-Visible, TEM y la Dispersión Dinámica de Luz (DLS, por su acrónimo en inglés Dynamic Light Scattering) es fundamental para la presente investigación de materiales y nanomedicina. Estas técnicas se complementan, proporcionando una comprensión completa de las propiedades físicas de las nanopartículas, cruciales para predecir su rendimiento biológico.

La caracterización inicial para las AuNPs es vital para confirmar la síntesis exitosa y la monodispersidad del lote. Estas propiedades influyen directamente en la Resonancia de Plasmón

Superficial Localizada (LSPR), que a su vez se correlaciona con su color y potencial uso en bioimágenes.

La combinación de las técnicas permitió no solo confirmar la síntesis y conjugación del ASO, sino también asegurar la calidad de las nanopartículas para su uso en la presente aplicación biomédica.

5.3.1. Espectro de absorbancia UV-Visible de AuNPs

Siguiendo con el protocolo propuesto en la metodología (4.5) se obtuvo la síntesis de AuNPs, la cual pasó de ser una solución amarillo pálido al momento de hidratarlo, y después de estar en contacto con el citrato de sodio, viró a un color rojizo-violeta, siendo un color característico de este tipo de nanopartículas (figura 5). En el espectro UV-Visible se observó un pico (~SPR) cerca de los 520 nm ya a los 17 minutos de reacción, que luego se desplaza a ~527 nm a los 23 minutos. Ese cambio en el máximo de absorbancia (de ~520 a ~527 nm) sugiere que con el tiempo de reacción las nanopartículas crecen o cambian su entorno.

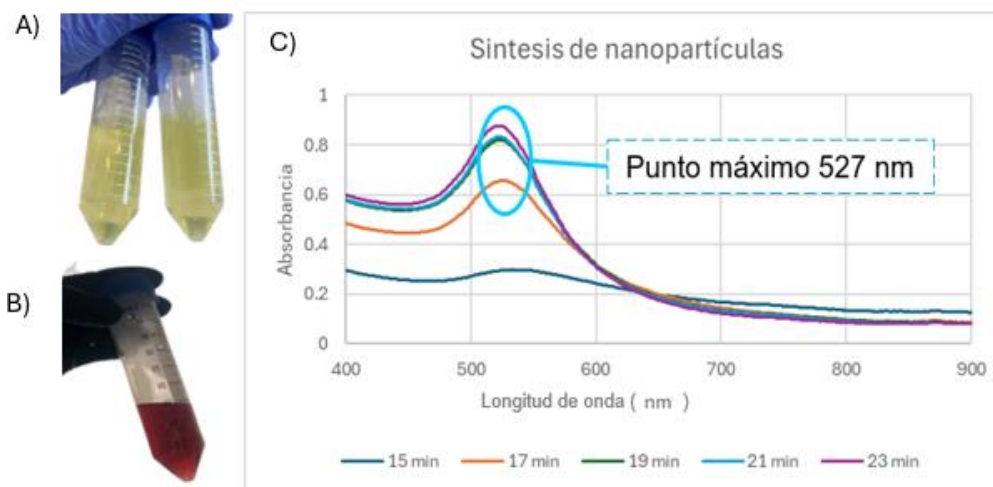


Figura 5. Caracterización de AuNPs y espectro de absorbancia UV-vis. A) Soluciones acuosas de cloruro de oro hidratado. B) Solución de nanopartículas de oro sintetizadas. C) Espectro de absorbancia UV-vis de la solución de AuNPs,

5.3.2. Caracterización por FTIR y DLS de AuNPs

Después de sus síntesis, se analizaron las AuNPs estabilizadas con citrato por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), para confirmar su presencia por las vibraciones características de los grupos carboxilato (COO^-) del citrato. Además, la banda del grupo O-H sugiere presencia de grupos hidroxilo, que también podrían ayudar a la estabilización. En la figura 6, se observan vibraciones de característicos del grupo carboxilato (COO^-) de tipo estiramiento asimétrico a $1570 - 1600 \text{ cm}^{-1}$; estiramiento simétrico a $1360 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ y flexión fuera del plano de $850 - 900 \text{ cm}^{-1}$; además de vibración de estiramiento C-H a $2900 - 3000 \text{ cm}^{-1}$; y vibración de estiramiento O-H a $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ correspondientes a grupos hidroxilo.

Se empleó la técnica DLS, para medir el tamaño de nanopartículas en suspensión. Las mediciones de DLS mostraron un tamaño hidrodinámico promedio (Z-average) de 12.33 nm , con un índice de polidispersidad (PDI) de 1.732 , indicando una distribución de tamaño altamente polidispersa. La distribución de tamaños mostró dos poblaciones principales: una centrada en 5.49 nm , que representa el 60.7% del volumen total, y otra en 21.7 nm , correspondiente al 39.3% . Además, se obtuvo un diámetro medio por volumen (MV) de 16.57 nm , lo que refleja una contribución volumétrica promedio ligeramente mayor debido a la presencia de partículas de mayor tamaño dentro de la muestra. Esto ocurre porque las pocas partículas grandes (21.7 nm , 39.3% del volumen) aportan mucho al volumen total.

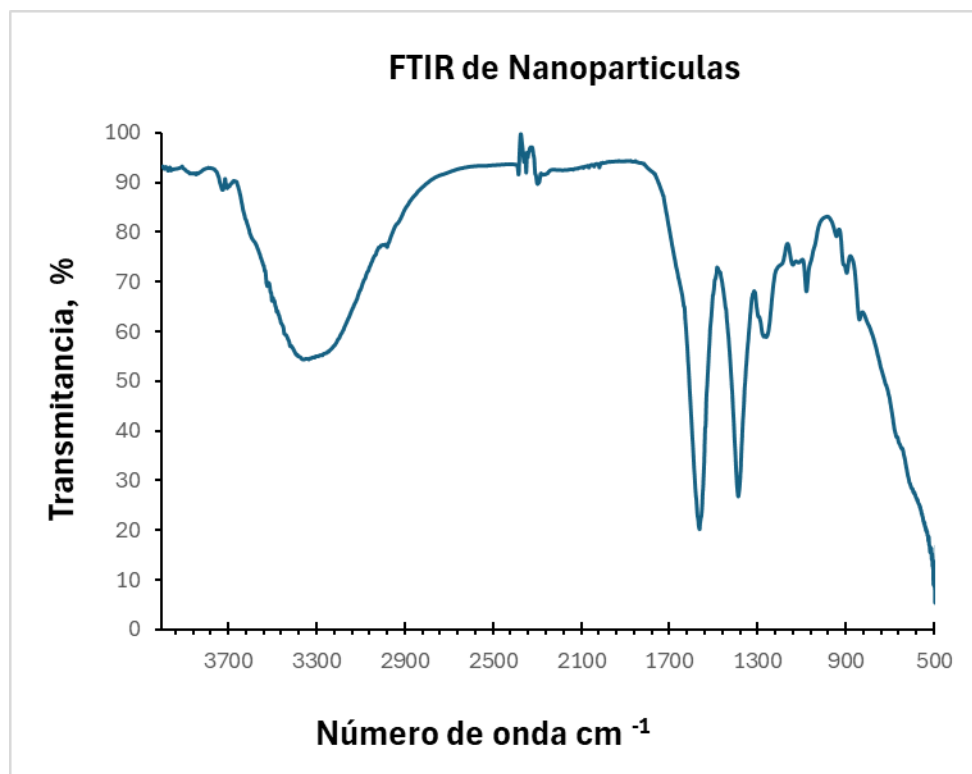


Figura 6. Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) de AuNPs.

La AuNPs tienen un tamaño hidrodinámico medio alrededor de 12 -16 nm. En la figura 7 se observa un gráfico de DLS, en escala logarítmica, que muestra la distribución de tamaños de partículas de la muestra. Se obtuvo una distribución bimodal de tamaños de nanopartículas. El primer pico, centrado entre 2–4 nm, representa nanopartículas individuales o muy pequeñas. El segundo pico (~15–30 nm) podría deberse a agregados o nanopartículas recubiertas. Esto significa que, además de las partículas principales, pueden existir pequeñas fracciones de partículas de mayor tamaño o agregados que contribuyen a la señal de dispersión de luz, manifestándose como picos adicionales en el análisis DLS ⁹⁶. La cola extendida hacia mayores tamaños indica que existe una fracción

de agregados más grandes, aunque en baja proporción. La curva de %Passing muestra que más del 90 % de las partículas están por debajo de los 100 nm, lo cual es aceptable para formulaciones coloidales, aunque la presencia de múltiples poblaciones sugiere polidispersidad.

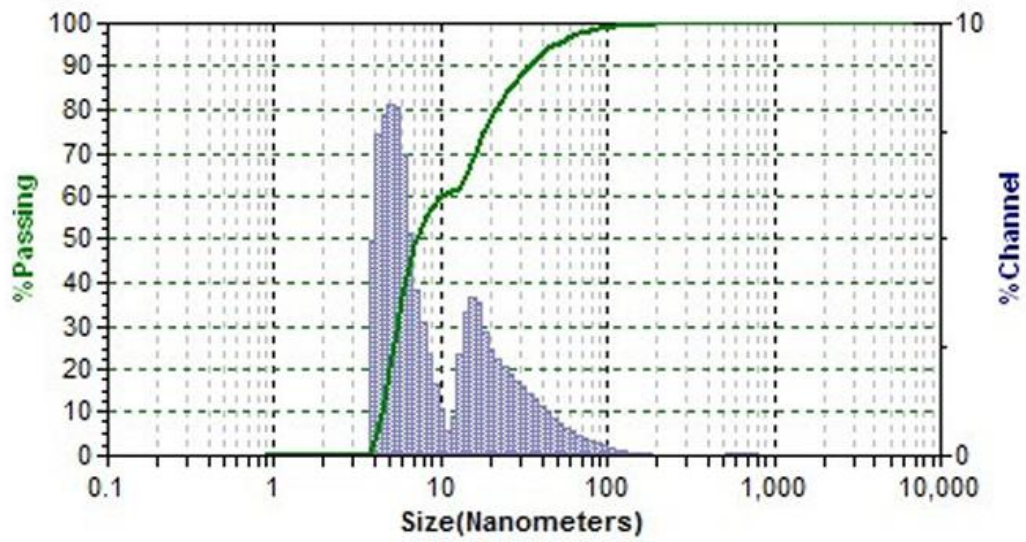


Figura 7. Gráfico de DLS en escala logarítmica.

5.3.3. Caracterización por TEM de AuNPs

Se obtuvieron imágenes por TEM de las nanopartículas de oro. En las imágenes de alta resolución (figura 8) se observa su estructura y morfología esférica y algunas con forma irregular poligonal. Las imágenes reveladas fueron analizadas con el programa ImagenJ para revelar detalles finos, como su tamaño, el cual su diámetro era de 15.04 nm.

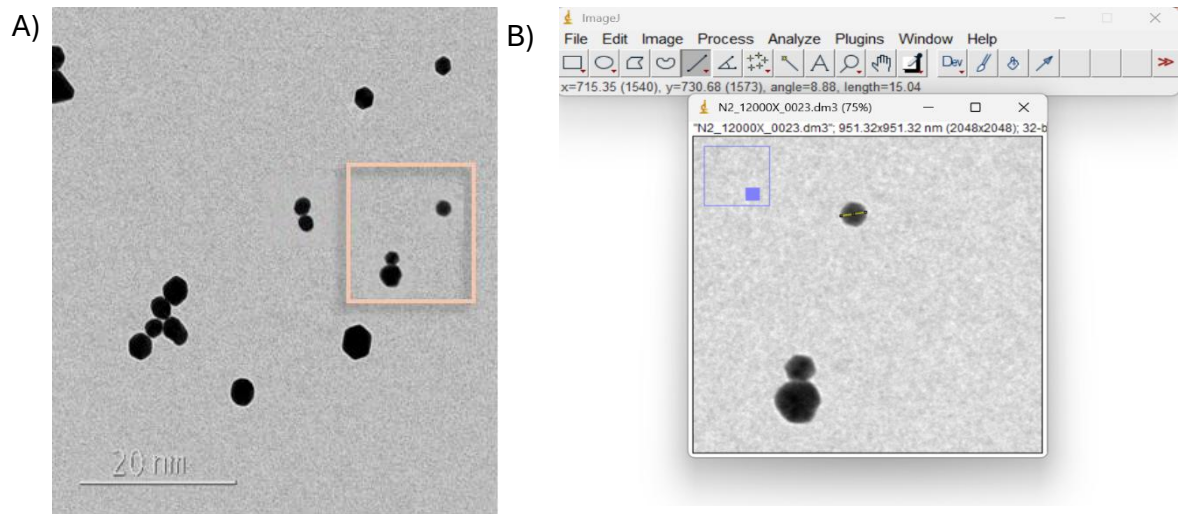


Figura 8. Micrografía TEM de AuNPs. A) Micrografía de TEM; B) Análisis de tamaño mediante ImageJ.

5.3.4. Concentración mínima inhibitoria

5.3.4.1. Concentración mínima inhibitoria de *E.coli* ATCC 11229

Para establecer un punto de referencia de sensibilidad a la kanamicina, se determinó la MIC de la cepa de referencia *E.coli* ATCC 11229 no transformada. La Figura 9 muestra el porcentaje de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de kanamicina (expresadas en ppm, equivalentes a $\mu\text{g/mL}$). La MIC se sitúa a 4 ppm, como se observa en la figura 9.

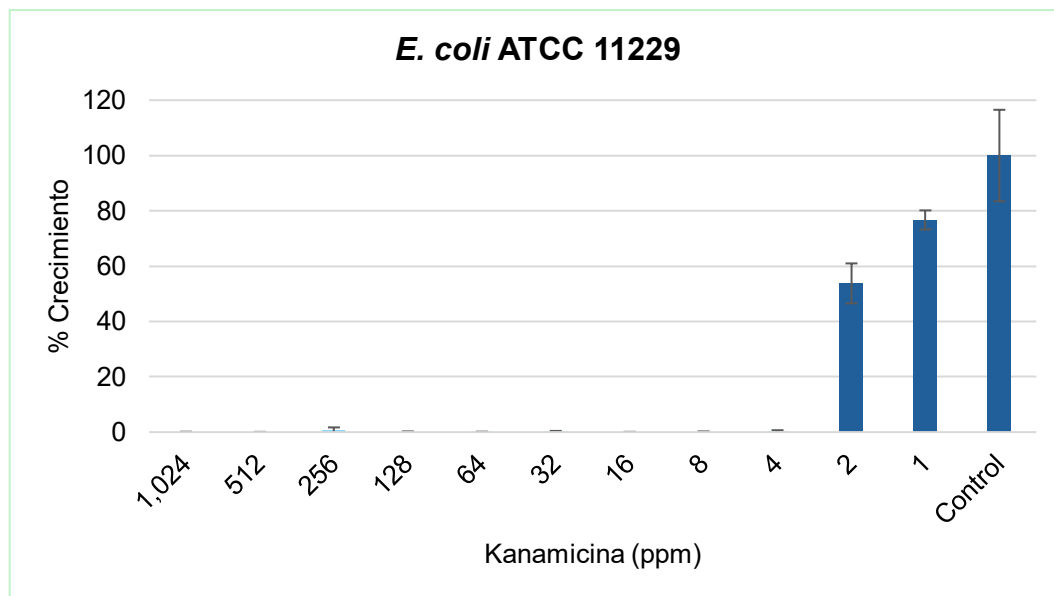


Figura 9. Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* ATCC 11229 no transformada. Porcentaje de crecimiento de *E. coli* ATCC 11229. Las barras de error representan la desviación estándar. Tratamientos realizados por triplicado.

5.3.4.2. Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* pUC57 Kan

A diferencia de la cepa control, la *E. coli* transformada con el plásmido pUC57-*KanR* exhibe un patrón de crecimiento drásticamente distinto, como se ilustra en la Figura 10.

El crecimiento es totalmente inhibido a 4,100 ppm, por lo tanto, fue la MIC considerada para este estudio. Comparando los resultados obtenidos, se determinó que la cepa transformada (*E. coli* pUC57-*KanR*) es 1,025 veces más resistente a la kanamicina que la cepa no transformada (*E. coli* ATCC 11229).

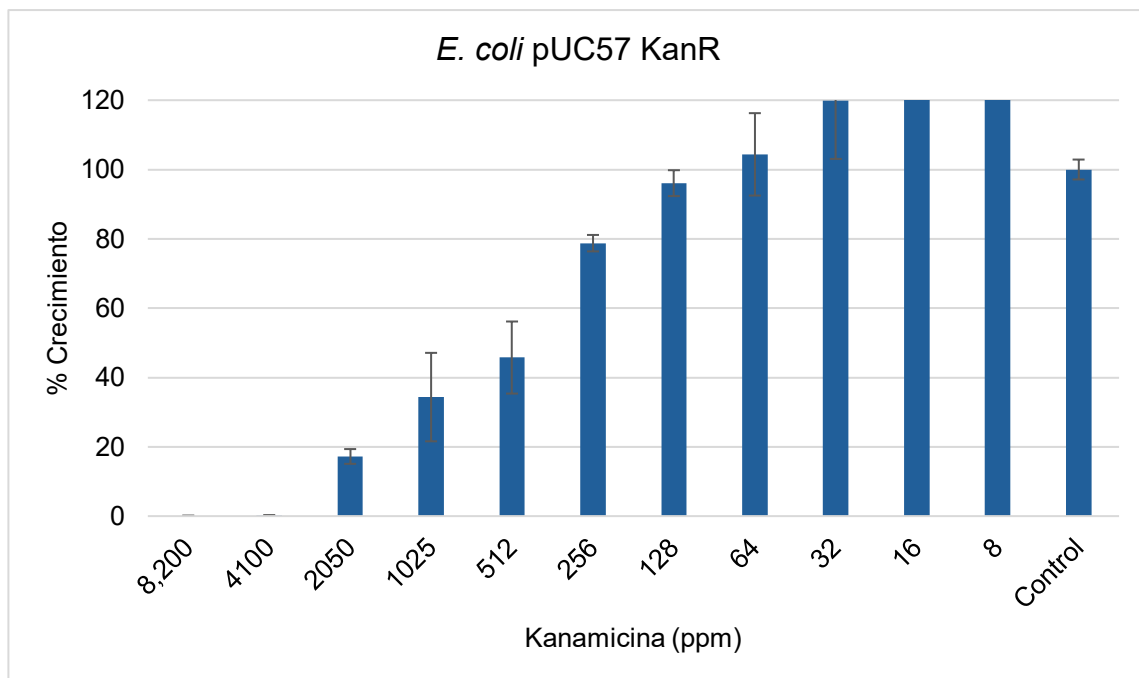


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria de *E. coli* resistente a *KanR*.

Porcentaje de crecimiento de *E. coli* pUC57- *KanR*. Las barras de error representan la desviación estándar. Tratamientos realizados por triplicado.

5.4. Pruebas combinatorias

Con el propósito de evaluar el efecto antimicrobiano de los conjugados AuNPs-ASOs1 y AuNPs-ASOs2, se realizaron ensayos combinatorios. Estos ensayos utilizaron una concentración de kanamicina equivalente a un cuarto de su MIC resultante, es decir, 1024 ppm (MIC= 4100 ppm), para estudiar la capacidad potenciadora de los ASOs.

Se eligió trabajar a esta concentración de 1024 ppm ya que, en ensayos preliminares (fig.10), se observó que a 4100 ppm la bacteria presentaba un crecimiento significativamente reducido, lo que habría enmascarado cualquier potencial efecto sinérgico o inhibitorio del conjugado.

Este diseño experimental comparó distintas concentraciones del conjugado a 2.5 μM y 5 μM , frente a nanopartículas de oro sin funcionalizar a las mismas concentraciones, las cuales su equivalencia en ppm serían las siguientes:

- AuNPs-ASOs-1: 15.95 ppm a 2.5 μM y 31.91 ppm a 5 μM .
- AuNPs-ASOs-2: 16.32 ppm a 2.5 μM y 32.63 ppm a 5 μM
- AuNPs-ASOs-3: 15.92 ppm a 2.5 μM y 31.83 ppm a 5 μM
- AuNPs sin funcionalizar: 16.5 ppm a 2.5 μM y 33.75 ppm a 5 μM

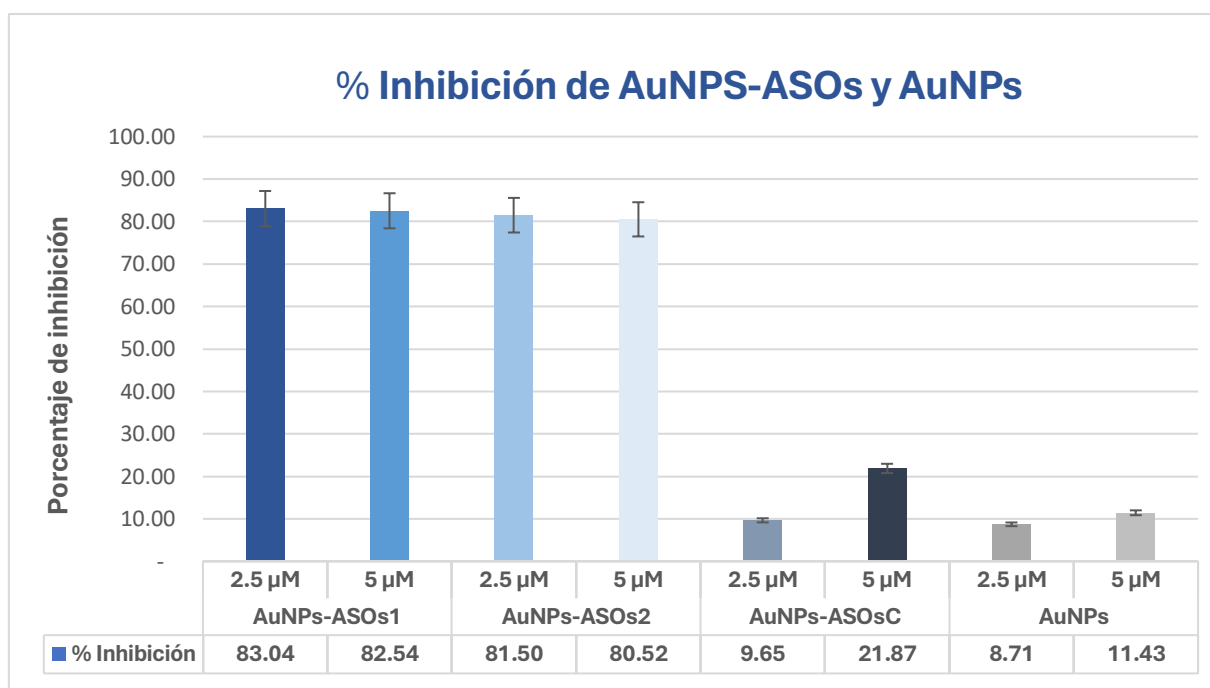


Figura 11. Porcentaje de inhibición de par de conjugados AuNPs-ASOs1, AuNPs-ASOs2, AuNPs-ASOsC y AuNPs a 1024 ppm de Kanamicina.

El objetivo fundamental de este ensayo fue determinar si la conjugación del oligonucleótido al nanocompuesto (AuNPs-ASOs-1 y AuNPs-ASOs-2, y AuNPs-ASOsC como control) potenciaba el efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano en

comparación con los componentes individuales. Además de demostrar si la posición de hibridación dentro del ARNm del gen *kanR* puede generar diferencias en la inhibición, aun cuando todas las secuencias se encuentren dentro del mismo marco de lectura.

Los resultados obtenidos en la Figura 11 muestra el porcentaje de inhibición de *E. coli* resistente tratadas con los conjugados ASO-AuNPs (ASO 1 y ASO 2) y nanopartículas de oro sin oligos (AuNPs). Los conjugados AuNPs-ASOs-1 y AuNPs-ASOs-2 se diseñaron para hibridar dentro del marco de lectura del gen *kanR* (Start1713–End2522), mientras que el oligonucleótido control AuNPs-ASOsC, se localiza fuera del gen, previo al origen de replicación del plásmido pUC57-kan (2579 pb). Los tratamientos se evaluaron a 2.5 y 5 μ M. Los datos representan la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Los AuNPs-ASOs-1 y AuNPs-ASOs-2, ambos diseñados para hibridar dentro del marco de lectura del gen *kanR*, mostraron porcentajes de inhibición elevados y comparables entre sí. AuNPs-ASOs-1 alcanzó inhibiciones del 83.04 % y 82.54 % a 2.5 y 5 μ M, respectivamente, mientras que AuNPs-ASOs-2 presentó valores del 81.50 % y 80.52 %. En ambos casos, el efecto inhibitorio fue consistente y no dependiente de la concentración evaluada.

En contraste, el oligo control AuNPs-ASOsC, dirigido a una región fuera del gen de resistencia (previo al origen de replicación), mostró una inhibición considerablemente menor, con valores de 9.65 % a 2.5 μ M y 21.87 % a 5 μ M.

Asimismo, las AuNPs presentaron porcentajes de inhibición bajos (8.71 % y 11.43 %), por lo que se considera que la inhibición observada está podría estar asociada

6tfprincipalmente a la presencia y localización específica de los ASOs. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se presentan como media \pm desviación estándar.

Capítulo 6

6. DISCUSIÓN

La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos representa una amenaza creciente para la salud pública global, en particular frente al uso extensivo de aminoglucósidos como la kanamicina (que actúa sobre la subunidad 30S ribosómica). Las bacterias pueden desarrollar resistencia a la kanamicina mediante mecanismos diversos, entre ellos la expresión de enzimas modificadoras (fosfotransferasas, adenililtransferasas, acetiltransferasas) que inactivan el fármaco (por ejemplo, la fosforilación del grupo amino) ⁶⁵.

En este contexto, los ASOs han sido explorados como herramientas para silenciar selectivamente genes bacterianos de resistencia, al hibridar con el ARNm diana e impedir su traducción o inducir su degradación (por ejemplo, mediante RNasa H) ⁶⁵. No obstante, su uso práctico en bacterias enfrenta importantes obstáculos: baja estabilidad frente a nucleasas, difícil penetración de la barrera celular y posible eliminación por mecanismos de defensa bacteriana.

Para superar estas limitaciones, las estrategias de vectorización con nanopartículas se han convertido en una opción atractiva. En particular, la conjugación de ASOs con nanopartículas de oro mediante enlaces tioluro (Au-S) permite una unión estable y la

formación de estructuras tipo ácido nucleico esférico (spherical nucleic acids) que pueden mejorar la penetración y protección del oligonucleótido (concepto de SNA) (ver discusión sobre SNA en literatura general). Además, las nanopartículas pueden facilitar la internalización celular y, al mismo tiempo, actuar sinérgicamente con mecanismos antimicrobianos⁶⁶.

La fase inicial de esta investigación requirió la modificación genética de la cepa bacteriana *E. coli* ATCC 11229 para transformarla en un organismo resistente a la kanamicina. Esta modificación fue esencial, ya que proporcionó el fenotipo seleccionable necesario para validar la funcionalidad del sistema de entrega de conjugados ASOs-AuNPs propuesto. La resistencia a la kanamicina se confirmó mediante la introducción del plásmido pUC57-*Kan* en la cepa sensible de *E. coli* (Fig. 2). La técnica empleada para la transferencia de este material genético fue la electroporación, un método de ingeniería genética de alta eficiencia que utiliza pulsos eléctricos para incrementar temporalmente la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, permitiendo la entrada del plásmido.

El objetivo primario de esta preparación fue crear un sistema de prueba robusto donde la resistencia a la kanamicina sirviera como marcador para evaluar la capacidad de entrega y la funcionalidad biológica de nuestro conjugado innovador: ASOs unidos a AuNPs.

Al modificar una bacteria genéticamente es posible que esta tenga efectos en su crecimiento, por lo que se caracterizó el crecimiento de esta por medio de una cinética de crecimiento. Como se observa en la figura 3, la adquisición de un plásmido que confirió resistencia antibiótica impuso costos de aptitud al hospedador bacteriano en

ausencia de la presión del antibiótico como lo es; menor tasa de crecimiento, periodos de latencia más largos, menor rendimiento en la fase estacionaria, en comparativa con la cepa no transformada. Este fenómeno se ha observado con plásmidos de resistencia múltiple en distintos sistemas bacterianos ⁷⁰.

La caracterización del plásmido pUC57-Kan mediante digestión enzimática (figura 4) permitió confirmar su integridad y tamaño esperado. De acuerdo con la figura 4 se puede observar que el plásmido presentó una banda principal alrededor de las 2,500 pb, lo cual concuerda con el tamaño teórico reportado por el fabricante Gene Universal (2,579 pb). La digestión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* generó fragmentos de aproximadamente 2,140 pb y 2,179 pb, respectivamente, lo que sugiere cortes únicos y específicos en el mapa de restricción del vector. Estos resultados concuerdan con los mapas plasmídicos reportados para pUC57-Kan depositados en bases de datos de Addgene y NCBI, donde se describe un sitio de restricción único para *BamHI* y *EcoRI* dentro de la región del clon múltiple (MCS) ^{71, 74}.

La concordancia entre los tamaños observados y los teóricos indica que la clonación del gen de resistencia *nptII* (*KanR*) se mantiene estable en el vector, lo cual es fundamental para garantizar la resistencia a kanamicina en las bacterias transformadas ⁷². Estudios previos han demostrado que los plásmidos derivados de pUC, debido a su alto número de copias, pueden alcanzar entre 100 y 500 copias por célula, lo que aumenta significativamente la expresión de genes de resistencia ^{73, 75}. Esto explica la diferencia observada entre la cepa transformada y la cepa control en los experimentos de cinética de crecimiento, donde *E. coli* pUC57-Kan mostró un

crecimiento sostenido en presencia de kanamicina, mientras que la cepa *E. coli* ATCC 11229 no fue capaz de proliferar bajo las mismas condiciones.

En conjunto, estos resultados confirman que el plásmido pUC57-Kan se encuentra correctamente digerido y funcional, y que su tamaño y comportamiento coinciden con los descritos en la literatura para vectores de alta copia portadores del gen *nptII*, responsable de la fosforilación y desactivación de la kanamicina ⁷⁶.

La caracterización espectroscópica y morfológica de las AuNPs sintetizadas evidenció la formación de estructuras metálicas bien definidas, aunque con cierta heterogeneidad en tamaño. El espectro UV-Visible (fig. 5) mostró un pico de absorbancia máximo (SPR) a 527 nm, característico de nanopartículas de oro esféricas con tamaño entre 10 y 25 nm ^{82,84}. Este desplazamiento al rojo respecto al valor típico de 520 nm sugiere un incremento en el tamaño medio de partícula o la modificación del entorno superficial, posiblemente asociado a la unión de ligandos estabilizantes o de los ASOs por enlaces tiol-oro, lo cual modifica el índice de refracción local ^{77,81}.

El análisis FTIR (figura 6) reveló bandas de vibración características de grupos carboxilato (COO^-) entre 1570–1600 cm^{-1} (estiramiento asimétrico) y 1360–1400 cm^{-1} (simétrico), así como una banda de flexión fuera del plano entre 850–900 cm^{-1} , además de señales correspondientes a estiramientos C–H (2900–3000 cm^{-1}) y O–H (3200–3600 cm^{-1}). Estas señales indican la presencia de grupos funcionales típicos del agente reductor utilizado, siendo este el citrato de sodio, los cuales juegan un papel esencial en la nucleación y estabilización de las AuNPs ⁸³. La presencia de estos grupos hidroxilo y carboxilato sugiere una superficie activa susceptible de interacción

con biomoléculas cargadas negativamente, como los ASOs, lo que favorece la conjugación mediante enlaces Au-S⁷⁹.

Los resultados del análisis por DLS confirmaron esta heterogeneidad (figura 7). El tamaño hidrodinámico promedio (Z-average) fue de 12.33 nm, con un PDI de 1.732, lo cual indica una dispersión muy amplia en la distribución de tamaños. Según lo descrito por Bhattacharjee (2016), valores de PDI > 0.7 reflejan una población altamente polidispersa, lo que coincide con la presencia de dos poblaciones principales detectadas: una de partículas pequeñas (~5.49 nm) y otra de mayor tamaño (~21.7 nm)⁷⁸. La fracción dominante (60.7 %) pertenece a las nanopartículas pequeñas, lo que sugiere que el proceso de nucleación inicial fue eficiente, aunque se produjo cierta agregación o crecimiento secundario en el sistema. Este comportamiento ha sido previamente observado en sistemas similares donde la estabilización superficial es incompleta o heterogénea^{84,86}.

El valor de Mean Volume Diameter (MV) de 16.57 nm respalda que la mayoría de las partículas se encuentran en el rango esperado para AuNPs con un máximo de absorbancia alrededor de 525–530 nm^{77,81}, por lo que los resultados de DLS y UV-Vis son consistentes entre sí. Sin embargo, el PDI elevado indica que la muestra contiene una mezcla de nanopartículas individuales y posibles agregados menores, lo que puede repercutir en la reproducibilidad del conjugado ASO-AuNPs, un aspecto crítico para aplicaciones biológicas⁸⁵.

Finalmente, las imágenes obtenidas por TEM corroboraron la formación de nanopartículas predominantemente esféricas, aunque con algunas formas poligonales irregulares (figura 8). El análisis de tamaño mediante ImageJ indicó un diámetro

promedio de 15.04 nm, valor que se encuentra en concordancia con los resultados espectroscópicos y de DLS (figura 8. B). Esta correspondencia entre las tres técnicas confirma que la síntesis produjo nanopartículas metálicas de tamaño nanométrico adecuado y que la dispersión de tamaños observada por DLS refleja principalmente diferencias en la hidratación superficial y no un crecimiento macroscópico descontrolado. Resultados similares han sido reportados por Jain *et al.* (2011) y Paramelle *et al.* (2014), quienes observaron que AuNPs de 10–20 nm presentan picos SPR entre 520–530 nm y buena estabilidad coloidal siempre que exista un recubrimiento funcional adecuado^{80,84}.

En conjunto, los resultados de UV-Vis, DLS, FTIR y TEM demuestran la formación exitosa de AuNPs y confirman su potencial para aplicaciones biotecnológicas. No obstante, el valor elevado de PDI sugiere que la optimización del tiempo de reacción y del agente estabilizante podría mejorar la monodispersidad y la uniformidad de los conjugados.

La determinación de la MIC mostró que la cepa *E. coli* ATCC 11229 presentó una MIC de 4 ppm, lo que concuerda con la sensibilidad esperada para cepas no resistentes a kanamicina (figura 9). Según la base de datos EUCAST (2024), las cepas de *E. coli* consideradas sensibles presentan valores de MIC ≤ 8 ppm, confirmando que esta cepa actúa como un control adecuado para la evaluación de resistencia antibiótica⁸⁸. En contraste, la cepa *E. coli* transformada con el plásmido pUC57–*KanR* (2579 pb) mostró una MIC de 4100 ppm, evidenciando un incremento de aproximadamente 1025 veces en la resistencia (figura 10). Este comportamiento es coherente con lo reportado por Beck *et al.* (2020) y Watanabe *et al.* (2021), quienes demostraron que el gen *nptIII*

(*KanR*) confiere resistencia a aminoglucósidos mediante la fosforilación de la kanamicina en el carbono 3' del anillo A, lo que impide su unión al ribosoma 30S y, por tanto, evita la inhibición de la síntesis proteica^{87,94}.

La notable diferencia en la MIC entre ambas cepas válida funcionalmente la expresión del gen de resistencia en el plásmido, y proporciona un sistema modelo ideal para evaluar la eficacia de los ASO dirigido contra *KanR*.

Los ensayos combinatorios con los conjugados AuNPs-ASOs1, AuNPs-ASOs2 y AuNPs-ASOc, mostraron un patrón inhibitorio significativo respecto al control (AuNPs sin funcionalizar). Como se observa en la figura 11, el análisis de la actividad antimicrobiana reveló una inhibición del crecimiento bacteriano significativo para los conjugados funcionales. Los resultados mostraron que las formulaciones AuNPs-ASO1 y AuNPs-ASO2 presentaron altos niveles de inhibición génica, alcanzando valores 83.04 % y 82.54 % y 81.50 % y 80.52 %, a concentraciones de 2.5 y 5 μ M respectivamente. Estos resultados son consistentes con la posibilidad de una interferencia directa en la expresión del gen de resistencia, aunque el mecanismo molecular específico no fue evaluado en este estudio.

En contraste, la secuencia control (AuNPs-ASOc) mostró una inhibición significativamente menor (9.65 % a 2.5 μ M y 21.87 % a 5 μ M.), mientras que las nanopartículas sin ASO exhibieron una inhibición mínima (8.71 % y 11.43 %). Estos resultados indican que el efecto inhibitorio observado se podría deberse principalmente a la acción específica de los ASOs dirigidos contra el gen *KanR*, y no a las nanopartículas por sí solas. Los AuNPs-ASOs al estar dirigidos a regiones internas del marco de lectura del gen *kanR* pudieron inducir una inhibición marcada

en el crecimiento bacteriano, lo cual sugiere un bloqueo directo de la expresión génica a nivel molecular. La hibridación del oligonucleótido antisentido con el ARN mensajero del gen *kanR* probablemente interfiere con la elongación ribosomal o promueve la degradación del transcrito, impidiendo la síntesis de la enzima responsable de la resistencia a kanamicina, la aminoglucósido-3'-fosfotransferasa (APH(3')).

Además, no se observó un efecto significativo dependiente de la concentración, ya que los valores de inhibición no aumentaron significativamente a 2.5 μM en comparación con 5 μM . Este comportamiento concuerda con estudios previos que han demostrado una relación dosis-respuesta en el silenciamiento génico mediado por ASOs conjugados a nanopartículas ⁹⁸.

En contraste, el AuNPs-ASOsC fue diseñado para hibridar en una región extracodificante del plásmido, localizada antes del ori. Estas regiones cumplen funciones estructurales y regulatorias relacionadas con la replicación plasmídica, pero no participan en la traducción de proteínas. Por lo tanto, la ausencia de un efecto inhibitorio significativo al emplear AuNPs-ASOsC sugiere que la simple unión del ASO al ADN plasmídico no es suficiente para inducir silenciamiento, y que la localización dentro del marco de lectura del gen blanco es un requisito crítico para la eficacia del tratamiento.

El mecanismo de inhibición observado podría ser explicado por la hibridación específica del ASOs al ARNm del gen *KanR*, impidiendo su traducción y reduciendo la producción de la enzima aminoglucósido fosfotransferasa tipo II (APH(3')-IIa). Esto conduce a una pérdida de resistencia, volviendo a la bacteria susceptible a la

kanamicina. Resultados similares fueron observados por Hernández-Cruz *et al.* (2021), quienes lograron disminuir la resistencia a β -lactámicos mediante ASOs dirigidos a genes de β -lactamasas conjugados con AuNPs, confirmando que la conjugación con nanopartículas facilita la entrada del oligo en la célula bacteriana, superando las limitaciones de permeabilidad que suelen dificultar la eficacia de los ASOs libres ⁸⁹.

La ligera disminución en la eficacia a 5 μ M también puede deberse a la formación de agregados coloidales o saturación del sistema, que reduce la interacción efectiva con el mRNA blanco ⁹⁵. Además, estudios de DLS y UV-Vis previos en este mismo trabajo revelaron cierta tendencia a la polidispersión y presencia de agregados en concentraciones elevadas, lo que apoya esta hipótesis.

Entre las dos secuencias dirigidas, presentan porcentajes de inhibición muy similares, cercanos al 80 %, sin diferencias significativas entre ellos, aun cuando los oligonucleótidos fueron diseñados para hibridar en regiones distintas del gen *kanR*. Este comportamiento sugiere que, al menos bajo las condiciones experimentales evaluadas, la localización exacta dentro del marco de lectura no parece ser un factor determinante para la magnitud del efecto inhibitorio, siempre que el ASO se dirija a una región funcional del gen.

No obstante, en estudios previos han demostrado que las secuencias situadas cerca del inicio de traducción o del sitio de unión ribosomal (RBS) presentan una mayor eficacia al bloquear la iniciación de la traducción ^{65,99}. Regiones con menor plegamiento o apareamiento intramolecular suelen ser más accesibles y permiten una hibridación más estable con el oligonucleótido ¹⁰⁰. En este estudio, ASO1 se dirige a

la región 1767–1786, mientras que ASO2 lo hace a 1953–1922 del gen *KanR*; esta última podría coincidir con una zona de mayor relevancia funcional o accesibilidad estructural para el bloqueo de la elongación del ARNm.

Una posible explicación es que ambas secuencias blanco se encuentren en zonas del ARNm accesibles estructuralmente, permitiendo una hibridación eficiente del ASO independientemente de su posición relativa dentro del transcrito. En este escenario, tanto ASO1 como ASO2 podrían interferir de manera comparable con procesos clave como la elongación ribosomal o la estabilidad del ARNm, resultando en niveles similares de inhibición. Estudios similares han reportado que modificaciones químicas y una correcta orientación del ASO en relación con la estructura del ARNm son determinantes para obtener una inhibición eficiente ^{100,103}.

Otra posibilidad es que el mecanismo predominante de acción no dependa de la interrupción de una región funcional específica del gen, sino más bien de la formación del dúplex ASO–ARNm, que podría favorecer la acción de RNasa H o provocar una obstrucción estérica general de la traducción ^{99,103,104}. Bajo este supuesto, la eficiencia del silenciamiento estaría más relacionada con la capacidad de unión del ASO y su estabilidad intracelular, que con la posición precisa de la secuencia blanco dentro del gen *kanR* ^{106, 107}.

Asimismo, la ausencia de diferencias significativas podría estar influenciada por factores experimentales asociados al uso de nanopartículas de oro como sistema de entrega. Las AuNPs podrían homogeneizar la biodisponibilidad intracelular de ambos ASOs, reduciendo posibles variaciones atribuibles a la secuencia o posición del oligo

¹⁰⁸. Esto sugiere que el sistema AuNPs–ASO podría amortiguar diferencias finas en el diseño del ASO, al menos dentro del rango de concentraciones evaluado.

Finalmente, no puede descartarse que el efecto observado represente un fenómeno de saturación, en el cual concentraciones de 2.5 μ M ya serían suficientes para alcanzar un nivel máximo de inhibición detectable mediante el ensayo de crecimiento, ocultando diferencias más sutiles entre ASO1 y ASO2 ^{109, 110}. En este caso, estudios a concentraciones menores o análisis cinéticos tempranos podrían revelar variaciones que no son evidentes en las condiciones actuales.

En cuanto a la inhibición parcial observada con la secuencia control (hasta 21,87 %) podría deberse a efectos inespecíficos o a interacciones electrostáticas entre el complejo AuNP-ASO y componentes celulares, lo cual ha sido documentado también por otros autores ¹⁰¹, pero no a un mecanismo de silenciamiento génico dirigido. Esto se ve reforzado por los bajos porcentajes de inhibición obtenidos con las AuNPs sin oligos. Sin embargo, la diferencia significativa respecto a las secuencias dirigidas podría abrir camino a la especificidad de los ASOs diseñados contra *KanR*.

En conjunto, estos hallazgos sugieren, pero no demuestran de manera concluyente, que la estrategia terapéutica basada en AuNPs-ASOs depende del diseño racional de oligonucleótidos antisentido que hibriden específicamente dentro de regiones funcionales del gen de resistencia, aprovechando la organización molecular del plásmido. Este enfoque permite discriminar entre efectos estructurales plasmídicos y silenciamiento génico real, consolidando a las AuNPs-ASOs como una posible plataforma precisa y dirigida para revertir la resistencia antimicrobiana.

Capítulo 7

7. CONCLUSIONES

En esencia, la resistencia adquirida permitió plantear un sistema experimental en el que la posible interrupción o modulación específica de dicha resistencia por el conjugado ASOs–AuNPs pudiera ser observada y cuantificada bajo condiciones de selección con antibiótico. Este enfoque facilitó la evaluación indirecta del impacto del tratamiento sobre el fenotipo de resistencia a kanamicina.

Los resultados obtenidos sugieren que el conjugado ASO–AuNPs podría inhibir de manera significativa la expresión del gen de resistencia *KanR*, reduciendo la resistencia a la kanamicina en *E. coli* transformada bajo presión selectiva. En particular el tratamiento a 2.5 μM podría representar una condición óptima, al mostrar una alta eficiencia antisentido sin evidencia clara de actividad antimicrobiana atribuible exclusivamente a las nanopartículas de oro. Estos efectos podrían estar asociados a una reducción funcional de la resistencia, reflejada en cambios en la MIC y en la dinámica de crecimiento bacteriano; sin embargo, estos parámetros requieren validación directa. Estos hallazgos respaldan el potencial del uso de nanopartículas funcionalizadas con oligonucleótidos antisentido como estrategia innovadora para revertir la resistencia antimicrobiana, en concordancia con lo reportado por estudios recientes sobre terapias génicas bacterianas. El conjugado propuesto pudo mediar la interrupción de la traducción del ARNm de *KanR* por la inducción de RNasa H, dado a la estabilidad de los oligonucleótidos y su liberación en el citoplasma.

La conjugación de ASOs a nanopartículas de oro mediante grupos tiol podrían representar constituye una estrategia eficaz para mejorar la entrega intracelular y la estabilidad de los oligonucleótidos. Las interacciones Au-S podrían conferir una unión estable y resistente a condiciones fisiológicas, mientras que el núcleo metálico de las AuNPs podría actuar como un vector pasivo que puede difundir o interactuar con las membranas bacterianas, aumentando la probabilidad de internalización. De esta forma, los ASOs-AuNPs podrían combinar la especificidad genética del antisentido con las ventajas fisicoquímicas de la nanotecnología, generando un efecto sinérgico frente a cepas resistentes.

Los resultados obtenidos sugieren que las formulaciones AuNPs-ASO1 y AuNPs-ASO2 podrían inducir una inhibición significativa del gen *KanR*, evidenciando la eficacia del uso de oligonucleótidos antisentido conjugados con nanopartículas de oro para silenciar genes de resistencia antibiótica. En particular, tanto el ASO1 y ASO2 no mostraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de inhibición, lo que sugiere que la eficacia en la inhibición de la expresión génica no está relacionada a la disrupción de un dominio funcional crítico dentro del marco de lectura del gen. Por el contrario, el éxito del silenciamiento podría depender de la formación de heterodúplex termodinámicamente estables, los cuales desencadenarían la degradación mediada por RNasa H o el impedimento físico del complejo ribosomal. En consecuencia, el rendimiento de los ASOs estaría determinado primordialmente por su afinidad de unión y su vida útil intracelular, restando relevancia a la cartografía posicional de la secuencia diana en el locus *Kan R*.

La similitud en la inhibición observada para ASO1 y ASO2 no contradice la hipótesis de silenciamiento dirigido, sino que sugiere que múltiples regiones dentro del marco de lectura del gen *kanR* podrían ser igualmente susceptibles a la intervención antisentido. Sin embargo, para discriminar con mayor precisión la contribución de la posición del ASO, sería necesario complementar estos resultados con análisis de accesibilidad estructural del ARNm, cuantificación directa del ARNm y la proteína *KanR*, así como estudios de dosis-respuesta y cinética de inhibición, además de análisis de estructura secundaria del ARNm, cuantificación del nivel de proteína *KanR* y ensayos fenotípicos de sensibilidad a kanamicina para encaminar la acción del modelo propuesto

En conjunto, los datos respaldan el potencial de la tecnología AuNPs-ASO podrían ser empleados como una estrategia prometedora para combatir la resistencia a antibióticos, pero subrayan la importancia de optimizar la selección del sitio diana en el diseño de ASOs.

Además, debe considerarse que el grado de inhibición molecular no siempre se traduce directamente en una pérdida proporcional de resistencia fenotípica. Sería necesario evaluar la viabilidad bacteriana en presencia de kanamicina y cuantificar la proteína *KanR* para confirmar la correlación entre inhibición génica y restauración de sensibilidad antibiótica.

ANEXOS

Los residuos generados durante esta investigación se dispondrán de acuerdo con las características de éstos. Se utilizarán los recipientes proporcionados por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas, basados en la Norma PR-CLB-SRR/001, quienes se aseguraron de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos.

Las bacterias resistentes fueron inactivadas por esterilización por calor húmedo, para eliminar la viabilidad de los microorganismos, se separaron de otros residuos en bolsas rojas. En cuanto el resto de las nanopartículas de oro, se recupera lo mayor cantidad posible por medio de precipitación para luego almacenarlo para uso futuro y el residuo se maneja como un residuo peligroso como lo indica el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Singh, S., Numan, A., & Cinti, S. (2022). Point-of-Care for Evaluating Antimicrobial Resistance through the Adoption of Functional Materials. *Analytical chemistry*, 94(1), 26–40. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03856>.
2. Tekintaş, Y., & Temel, A. (2024). Antisense oligonucleotides: a promising therapeutic option against infectious diseases. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 43(1), 1–39. <https://doi.org/10.1080/15257770.2023.2228841>.
3. Payne, J. N., Waghvani, H. K., Connor, M. G., Hamilton, W., Tockstein, S., Moolani, H., & Dakshinamurthy, R. (2016). Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. *Frontiers in microbiology*, 7, 173.
4. Xue, Y., Li, X., Li, H., & Zhang, W. (2014). Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *Nature Communications*, 5(1), 4348. <https://doi.org/10.1038/ncomms5348>.
5. Nakano MM, Butsuya I, Ogawara H. (1989) Expression of the kanamycin resistance gene in a kanamycin-producing strain of *Streptomyces kanamyceticus*. *J Antibiot (Tokyo)*; 42(3):423-30. doi: 10.7164/antibiotics.42.423. PMID: 2708136.
6. Delong, R. K., Reynolds, C. M., Malcolm, Y., Schaeffer, A., Severs, T., & Wanekaya, A. (2010). Functionalized gold nanoparticles for the binding, stabilization, and delivery of therapeutic DNA, RNA, and other biological

macromolecules. *Nanotechnology, Science and Applications*, 3, 53–63.
<https://doi.org/10.2147/NSA.S8984>.

7. Jamdagni, P., Khatri, P., & Rana, J. S. (2016). Nanoparticles based DNA conjugates for detection of pathogenic microorganisms. *International Nano Letters*, 6(3), 139–146. <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0177->.
8. Di Lodovico, S., Fasciana, T., Di Giulio, M., Cellini, L., Giammanco, A., Rossolini, G. M., & Antonelli, A. (2022). Spread of Multidrug-Resistant Microorganisms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(7), 832. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070832>.
9. Van Duin, D., & Paterson, D. L. (2016). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: Trends and Lessons Learned. *Infectious disease clinics of North America*, 30(2), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.004>.
10. World Health Organization, [WHO]. (2017). Who Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. Retrieved January 30, 2020, from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-forwhich-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
11. Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., ... Baloch, (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
12. Rotger R, Martínez M. (2016) *Fármacos antimicrobianos: mecanismos de acción y resistencia*. Madrid: Dextra.
13. Cordiés Jackson L, Machado Reyes LA, Hamilton Cordiés ML. (1998) Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Med*; 8(1):13-27.

14. Couvalin AJ. (1988) El final de la edad de oro de los antibióticos. *Ther Nat*; 314 (3):50-2.
15. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.
16. Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.
17. Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
18. M.L. Sobel, G.A. McKay, K. Poole. (2009) Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47, pp. 3202-3207.
19. Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392-402.
20. Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., & Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*, 39(6), 2460–2504. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.21591>
21. Hassuna, N. A., Darwish, M. K., Sayed, M., & Ibrahim, R. A. (2020). Molecular Epidemiology and Mechanisms of High-Level Resistance to Meropenem and Imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 285–293. <https://doi.org/10.2147/IDR.S233808>.

22. Pardo, M. G., Rodríguez, F. M., Sancho, J. B., & Alfaro, E. M. (2002). Antibióticos aminoglucósidos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 8(65), 3470-3479.
23. Katzung Bertram G, Masters S. Trevor A, (2010) *Pharmacology basic y clinic*, Mc Graw Hill, 11va Ed, 807-14
24. Fernández-García, L. (2015). Estudio de genes de resistencia a aminoglucósidos en cepas hospitalarias de " *Acinetobacter baumannii*".
25. Morales, A., García, F., Morales, M. R., Leal, L., & López, P. (2014). Resistencia a aminoglicosidos y quinolonas en un equino con esofagitis reporte de un caso. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 33(3), 84-87.
26. Doi, Y., Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics*, 30(2), 523-537.
27. Salimizand, H., Zomorodi, A. R., Mansury, D., Khakshoor, M., Azizi, O., Khodaparast, S., ... & Sadeghian, H. (2018). Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of *aadA1* and *armA*. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 195-199.
28. Guliy, O. I., Zaitsev, B. D., Karavaeva, O. A., Shirokov, A. A., Teplykh, A. A., & Borodina, I. A. (2023). Microbial sensor system for rapid kanamycin detection in conducting solutions. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 14, 100334.
29. León-Buitimea, A., Garza-Cárdenas, C. R., Garza-Cervantes, J. A., Lerma-Escalera, J. A., & Morones-Ramírez, J. R. (2020). The Demand for New Antibiotics: Antimicrobial Peptides, Nanoparticles, and Combinatorial Therapies

- as Future Strategies in Antibacterial Agent Design. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01669>.
30. Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014>.
31. Hegarty, J. P., & Stewart, D. B. (2018). Advances in therapeutic bacterial antisense biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1055–1065. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8671-0>.
32. Xue, X.-Y., Mao, X.-G., Zhou, Y., Chen, Z., Hu, Y., Hou, Z., ... Luo, X.-X. (2018). Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(3), 745–758. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.12.026>.
33. Liu, B., & Liu, J. (2017). Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Analytical Methods*, 9(18), 2633–2643. <https://doi.org/10.1039/C7AY00368D>.
34. Mayorga-Ramos, A., *et al.* (2023). CRISPR-Cas-Based Antimicrobials: Design, Challenges, and Prospects. *ACS Infectious Diseases*.
35. Lee, D., Muir, P., Lundberg, S., *et al.* (2025). Un sistema CRISPR-Cas9 que protege a *E. coli* contra la adquisición de genes de resistencia a antibióticos. *Scientific Reports*, 15, 1545. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-85334-2> (35)
36. Wojciechowska, M., *et al.* (2020). Antibacterial Peptide Nucleic Acids — Facts and Perspectives. *Molecules*, 25(3), 559.

37. Good, L. & Nielsen, P. E. (1999). Peptide Nucleic Acid (PNA) Antisense Effects in *Escherichia coli*. *Current Issues in Molecular Biology*, 1(2), 111–116. <https://doi.org/10.21775/cimb.001.111>
38. Popella, L., *et al.* (2022). Comprehensive analysis of PNA-based antisense inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli*.
39. Patel, R. R., *et al.* (2017). Exploration of Using Antisense Peptide Nucleic Acid (PNA) as Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*.
40. Aunins, T. R., *et al.* (2020). Transcriptome-based design of antisense inhibitors for bacterial growth inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16068–16075. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922187117>
41. Hao, M., *et al.* (2020). CRISPR-Cas9-Mediated Carbapenemase Gene and Plasmid Curing in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.00843-20>
42. Sarno, R., Ha, H., Weinschel, N., & Tolmasky, M. E. (2003). Inhibition of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance by antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3296–3304. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3296-3304.2003>.
43. Soler-Bistué, A. J. C., Ha, H., Sarno, R., Don, M., Zorreguieta, A., & Tolmasky, M. E. (2007). External guide sequences targeting the aac(6')-Ib mRNA induce inhibition of amikacin resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 1918–1925. <https://doi.org/10.1128/AAC.01500-06>.
44. Soler-Bistué, A. J. C., Martín, F. A., Voza, N., Ha, H., Joaquín, J. C., Zorreguieta, A., & Tolmasky, M. E. (2009). Inhibition of AAC(6')-Ib-mediated amikacin resistance by nuclease-resistant external guide sequences in bacteria. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, 106(32), 13230–13235.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906529106>.
45. López, C., Arivett, B. A., Actis, L. A., & Tolmasky, M. E. (2015). Inhibition of AAC(6')-Ib-mediated resistance to amikacin in *Acinetobacter baumannii* by an antisense peptide-conjugated 2',4'-bridged nucleic acid-NC-DNA hybrid oligomer. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(9), 5798–5803.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01304-15>.
46. Tang, J., Chen, X., & Cheng, J. (2018). Advances in the delivery of antisense oligonucleotides for combating bacterial infectious diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 24(3), 329-340.
<https://doi.org/10.2174/1381612824666180126105307>.
47. Srivastava, S. K., Singh, S., & Singh, S. (2024). Antisense Oligonucleotide-Capped Gold Nanoparticles as a Potential Strategy for Tackling Antimicrobial Resistance. *Medicina*, 16(3), 70. <https://doi.org/10.3390/medicina16030070>
48. El-Sayed, R. A., Youssef, E. A., Abuelela, K. M., & Khedr, A. I. (2024). Recent advances in the development of antibiotics-coated gold nanoparticles to combat antimicrobial resistance. *Antibiotics*, 13(2), 124.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics13020124>.
49. Beha, M. J., Ryu, J. S., Kim, Y. S., & Chung, H. J. (2021). Delivery of antisense oligonucleotides using multi-layer coated gold nanoparticles to methicillin-resistant *S. aureus* for combinatorial treatment. *Materials Science and Engineering: C*, 126, 112167. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112167>.
50. Woegerbauer, M., *et al.* (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa (nptII)* in bacterial isolates:

- a European multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6484–6489. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24194558/>
51. Mella, S., Sepúlveda, M., González, G., Bello, H., Domínguez, M., Zemelman, R. y Ramírez, C. 2004. Antimicrobianos Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología* 21 (4): 330-338.
52. Sundar, I. and Sakthivel, N. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. *Plant Physiology* 165: 1698-1716.
53. Goldstein, D., Tinland, B., Gilbertson, A., Staub, J., Bannon, G., Goodman, R., McCoy, R. and Silvanovich, A. 2005. Human safety and genetically modified plants: a review of antibiotic resistance markers and future transformation selection technologies. *Applied Microbiology* 10: 1365-2672.
54. Saeli, N., *et al.* (2024). Prevalence and mechanisms of aminoglycoside resistance among clinical isolates: molecular characterization of aminoglycoside-modifying enzyme genes. *BMC Infectious Diseases*, 24, Article 958. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09585-6>.
55. Dobrescu, MŞ., *et al.* (2024). How antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* contribute to clinical treatment failure: prevalence of modifying enzymes and resistance genes. *Biomolecules*, 15(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biomolecules15010001>
56. Guan, L., *et al.* (2024). Global status of antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecalis*: a meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23, Article 28. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00728-w>

57. Miller, S. A. (2022). Antimicrobial resistance marker genes as environmental contaminants: prevalence of aph(3')-IIa (*nptII*) in agriculture and potential ecological impact. *Agriculture*, 12(2), 289. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020289>.
58. Woegerbauer, M., *et al.* (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes aph(3')-IIIa and aph(3')-IIa (*nptII*) in bacterial isolates: a European multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 6484–6489. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24194558/>
59. Mwikuma, G., *et al.* (2023). Determination of the prevalence and antimicrobial resistance genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Antibiotics*, 12(4), 657. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040657>.
60. Hoynes-O'Connor, A., & Moon, T. S. (2016). Development of Design Rules for Reliable Antisense RNA Behavior in *E. coli*. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1441–1454. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00036> (34)
61. Tu, Q., Yin, J., Fu, J., Herrmann, J., Li, Y., Yin, Y., ... Zhang, Y. (2016). Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific Reports*, 6(1), 24648. <https://doi.org/10.1038/srep24648> (35)
62. Ghaffari, E., Rezaatofghi, S. E., Ardakani, M. R., & Rastegarzadeh, S. (2019). Delivery of antisense peptide nucleic acid by gold nanoparticles for the inhibition of virus replication. *Nanomedicine*, 14(14), 1827–1840. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0520>.

63. Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K. R., & Mirkin, C. A. (2006). Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8313–8318. <https://doi.org/10.1021/ac0613582>
64. Balasubramanian, S. K., Yang, L., Yung, L.-Y. L., Ong, C.-N., Ong, W.-Y., & Yu, L. E. (2010). Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*, 31(34), 9023–9030. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.012>.
65. Jani, S., Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2021). Silencing Antibiotic Resistance with Antisense Oligonucleotides. *Biomedicines*, 9(4), 416. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040416>.
66. Kamat, S., & Kumari, M. (2023). Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies. *Frontiers in microbiology*, 14, 1102615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1102615>.
67. Ribeiro, A. I., Dias, A. M., & Zille, A. (2022). Synergistic Effects Between Metal Nanoparticles and Commercial Antimicrobial Agents: A Review. *ACS Applied Nano Materials*, 5(3), 3030–3064. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c03891>.
68. Garza-Cardenas, C. R., Leon-Buitimea, A., Siller-Ceniceros, A. A., & Morones-Ramirez, J. R. (2025). Antisense Oligonucleotide-Capped Gold Nanoparticles as a Potential Strategy for Tackling Antimicrobial Resistance. *Microbiology Research*, 16(3), 70. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16030070>
69. Kamat, S., & Kumari, M. (2023). Emergence of microbial resistance against nanoparticles: Mechanisms and strategies. *Frontiers in microbiology*, 14, 1102615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1102615>.

70. Hall, J. P. J., Wright, R. C. T., Harrison, E., Muddiman, K. J., Wood, A. J., Paterson, S., & Brockhurst, M. A. (2021). Plasmid fitness costs are caused by specific genetic conflicts enabling resolution by compensatory mutation. *PLoS biology*, 19(10), e3001225. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001225>
71. Addgene. (2024). pUC57-Kan vector map and sequence. Recuperado de <https://www.addgene.org>
72. Bechhofer, D. H., & Stasinopoulos, S. J. (2021). Plasmid replication and maintenance. *Microbiology Spectrum*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0010-2020>.
73. Lin-Chao, S., Chen, W. T., & Wong, T. T. (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Molecular Microbiology*, 6(22), 3385–3393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x>
74. NCBI. (2023). pUC57-Kan complete sequence. National Center for Biotechnology Information. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>
75. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
76. Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163. <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>.

77. Amendola, V., & Meneghetti, M. (2009). Size evaluation of gold nanoparticles by UV–vis spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(11), 4277–4285. <https://doi.org/10.1021/jp8082425>
78. Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
79. Cai, W., Gao, T., Hong, H., & Sun, J. (2008). Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnology, Science and Applications*, 1, 17–32. <https://doi.org/10.2147/NSA.S3784>
80. Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2011). Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics*, 7(2), 87–96. <https://doi.org/10.1007/s11468-011-9228-1>
81. Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212–4217. <https://doi.org/10.1021/jp984796o>
82. Liz-Marzán, L. M. (2020). Colloidal gold nanoparticles: From synthesis to applications. *ACS Nano*, 14(6), 6359–6365. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03569>
83. Pacioni, N. L., Veglia, A. V., Zamarreño, C. R., & Becerra, M. C. (2015). Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in drug delivery. *Journal of Nanotechnology*, 2015, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/418349>
84. Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., & Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver

- nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analytical Methods*, 6(11), 4405–4413. <https://doi.org/10.1039/C4AY00573F>
85. Sánchez-Iglesias, A., *et al.* (2010). Hydrophobic interactions modulate self-assembly of gold nanoparticles. *ACS Nano*, 4(4), 1887–1896. <https://doi.org/10.1021/nn9016757>
86. Xie, J., Lee, J. Y., & Wang, D. I. C. (2007). Seedless, surfactantless, high-yield synthesis of branched gold nanocrystals in HEPES buffer solution. *Chemistry of Materials*, 19(11), 2823–2830. <https://doi.org/10.1021/cm070132>
87. Beck, S., Mühlig, A., & Brückner, R. (2020). Molecular mechanism of aminoglycoside resistance mediated by aminoglycoside phosphotransferase APH(3')-IIa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(9), e00574-20.
88. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 14.0.
89. Hernández-Cruz, A., López-Sánchez, J. A., & Ramírez-Vélez, R. (2021). Antisense oligonucleotide–gold nanoparticle conjugates reduce antibiotic resistance gene expression in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 667234.
90. Kim, J. H., Park, J., & Choi, Y. (2021). Optimizing antisense oligonucleotide density on gold nanoparticles for efficient gene silencing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(4), 5065–5076.
91. Kumar, S., Yadav, P., & Singh, R. (2023). Concentration-dependent aggregation and antibacterial activity of gold nanoparticles conjugated with DNA oligonucleotides. *Nanomaterials*, 13(6), 1152.

92. Liu, X., Li, C., & Zhang, Y. (2019). Gold nanoparticle–antisense conjugates as gene silencers in bacteria: Effect of surface modification and concentration. *Bioconjugate Chemistry*, 30(7), 1842–1851.
93. Taghdisi, S. M., Danesh, N. M., & Ramezani, M. (2020). DNA- and RNA-based nanostructures for bacterial gene silencing. *Trends in Biotechnology*, 38(7), 742–756.
94. Watanabe, T., Ohta, T., & Mori, M. (2021). Mechanistic insights into kanamycin resistance mediated by *nptIII* gene products in *E. coli*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 184–192.
95. Zhou, M., Yang, F., & Wang, Q. (2022). Aggregation behavior and antibacterial efficiency of gold nanoparticles functionalized with nucleic acids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 218, 112775.
96. Al-Khafaji, M. A., Gaál, A., Wacha, A., Bóta, A., & Varga, Z. (2020). Particle Size Distribution of Bimodal Silica Nanoparticles: A Comparison of Different Measurement Techniques. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(14), 3101. <https://doi.org/10.3390/ma13143101>.
97. Sonia, T. A., Sharma, C. P., & Jayakumar, R. (2018). Nanoparticle-based antisense therapy for multidrug-resistant bacteria. *Journal of Controlled Release*, 283, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.028>.
98. Garza-Cárdenas, C. R., et al. (2025). *Antisense oligonucleotide-capped gold nanoparticles as a potential strategy for tackling antimicrobial resistance. Nanomaterials*, 16(3), 70. <https://doi.org/10.3390/nano16030070>.

99. Collotta, A., Tomasello, G., & Damiani, F. (2023). Antisense oligonucleotides: A novel frontier in gene therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 112–121. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.10900781>.
100. Crooke, S. T., Liang, X., Baker, B. F., & Crooke, R. M. (2021). Antisense technology: A review. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100416. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100416>.
101. Huang, C., Zhao, Z., & Zhang, Y. (2022). *Gold nanoparticle-based delivery of antisense oligonucleotides for bacterial gene silencing. Biomaterials Research*, 26(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00292-4>
102. Jani, R., Tilley, L. D., & Ghosh, S. (2021). *Silencing antibiotic resistance with antisense strategies: Current advances and future directions. Frontiers in Microbiology*, 12, 677403. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.677403>.
103. Kang, S. H., Cho, M. J., & Kole, R. (2004). *Up-regulation of MDR1 expression with antisense oligonucleotides targeting the 5'-end of the mRNA. Nucleic Acids Research*, 32(14), 4411–4419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh774>.
104. Wagner & Flärth (2002). Antisense RNAs everywhere? *Trends in Genetics*.
105. Kole et al. (2012). RNA therapeutics: beyond antisense. *Nature Reviews Drug Discovery*.
106. Ding & Lawrence (2003). A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. *Nucleic Acids Research*.

107. Schubert et al. (2015). RNA structure and antisense targeting. *RNA Biology*.
108. Rosi et al. (2006). *Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular delivery*. *Science*.
109. Stein & Castanotto (2017). FDA-approved oligonucleotide therapies. *Molecular Therapy*.
110. Bennett & Swayze (2010). RNA targeting therapeutics. *Annual Review of Pharmacology*.