

Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Ingeniería
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



“Nanopartículas de plata camufladas con nanovesículas derivadas de Staphylococcus aureus con potencial antiestafilocócico”

Tesis para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias

Presenta:

Maureen Scarlett Cruz Aguilar

Director de Tesis:

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Co-Director de Tesis:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, Baja California, diciembre 2024

Resumen

El rápido crecimiento de microorganismos patógenos y su multirresistencia frente a los antibióticos de primera línea, plantea un severo desafío para los profesionales de la salud y para el desarrollo de nuevos productos capaces de abordar este importante problema. Con base a esta información, en el presente trabajo se sintetizó nanovesículas a partir de cultivos de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y se incorporaron con nanopartículas (NPs) de plata (AgNPs) como agente antimicrobiano, con el fin de obtener NPs camufladas para promover así su actividad antibiótica. Esta estrategia se basó considerando que la gran diversidad bacteriana requiere de interacciones célula-célula para lograr generar comunicación entre el consorcio celular y el medio que lo rodea. Inicialmente, se prepararon cultivos axénicos de *S. aureus* los cuales se utilizaron como precursores para la síntesis de nanovesículas, aplicando el surfactante Tween 80 o ultrasonido como disruptor membranal físico. Las AgNPs fueron desarrolladas por vía electroquímica y proporcionadas por el Laboratorio de Química de Materiales. Los resultados indicaron que las AgNPs y las nanovesículas siguieron una distribución homogénea, con un diámetro promedio de 20 nm para las nanovesículas. Los métodos de síntesis de las vesículas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, evitando la recolonización. Al “enmascararse” las AgNPs con las nanovesículas se podía lograr obtener efecto antiestafilocócico manejando una proporción menor de AgNPs en relación con las nanovesículas estafilocócicas. Por otra parte, se aplicaron curvas de crecimiento bacteriano que indicaron que al utilizar proporciones al doble de nanovesículas con respecto a AgNPs, se podría acelerar la inhibición de *S. aureus*, proponiendo que la estrategia de camuflaje aplicada radicaba en acelerar la incorporación de las AgNPs. El presente estudio sugiere la aplicación de precursores bacterianos como medios de camuflaje/enmascarado de agentes antibacterianos para incrementar la actividad antimicrobiana.

Abstract

The fast growth of pathogenic microorganisms and their multi-resistance to first-line antibiotics poses a severe challenge for health professionals and for the development of new products capable of addressing this important problem. Based on this information, in the present work nanovesicles were synthesized from cultures of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and were incorporated with silver nanoparticles (AgNPs) as an antimicrobial agent, in order to obtain camouflaged NPs to promote its antibiotic activity. This strategy was based on considering that the great bacterial diversity requires cell-cell interactions to generate communication between the cellular consortium and the surrounding environment. Initially, axenic cultures of *S. aureus* were prepared and used as precursors for the synthesis of nanovesicles, applying the surfactant Tween 80 or ultrasound as a physical membrane disruptor. The AgNPs were developed electrochemically and provided by the Materials Chemistry Laboratory. The results indicated that the AgNPs and nanovesicles followed a homogeneous distribution, with an average diameter of 20 nm for the nanovesicles. The vesicle synthesis methods were able to inhibit the growth of *S. aureus*, preventing recolonization. By “masking” the AgNPs with the nanovesicles, it was possible to obtain an antistaphylococcal effect by handling a lower proportion of AgNPs in relation to the staphylococcal nanovesicles. On the other hand, bacterial growth curves were applied indicating that using double proportions of nanovesicles with respect to AgNPs, the inhibition of *S. aureus* could be accelerated, proposing that the camouflage strategy may accelerate the incorporation of the AgNPs. The present study suggests the application of bacterial precursors as means of camouflage/masking of antibacterial agents to increase antimicrobial activity.

Agradecimientos

En primer lugar, darle gracias a Dios por permitirme lograr un peldaño más en mi desempeño académico con salud, energía y felicidad.

Agradezco a mi tutor Dr. Ernesto Beltrán Partida por su confianza, paciencia, horas de trabajo extracurriculares, conocimiento aportado y disposición durante toda mi estadía en el Instituto de Ingeniería.

Al Dr. Benjamín Valdez Salas por abrirme las puertas de los Laboratorios del Departamento de Química del Instituto de Ingeniería en el inicio de mi residencia y hasta el día de hoy, estaré inmensamente agradecida pues sin ayuda no estaría hoy aquí.

Agradezco a mi familia por ser mi soporte en cada etapa de mi vida, a mis hermanos mayores por ser mi inspiración para lograr grandes cosas y a mi mamá por ser ejemplo de lucha y entrega.

Al Mtro. Jorge Salomón Salvador Carlos por su paciencia, consejos, enseñanzas brindadas dentro y fuera del laboratorio.

A la Mtra. Claudia Celeste Gutiérrez Pérez por toda su dedicación desde el día 1 de mi estadía en esta institución, por el conocimiento aportado hacia mi formación profesional, por su empatía, su apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A la Mtra. Lorena Vanessa Bolaños Sáenz por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, por sus enseñanzas, paciencia y sobre todo trabajo en equipo durante nuestra etapa formadora.

A todos los docentes que pertenecen al Laboratorio de Materiales Avanzados y semiconductores por siempre recibirme de la mejor manera y brindarme el espacio y disponibilidad de los equipos en el tiempo que requerí de su uso.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el proyecto No. A1-S-38368, “Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación” CB2017-2018, SEP-CONACYT, que financió parte de esta tesis y así mismo por el otorgamiento de una beca de maestría durante este proyecto.

Por último, agradezco a el Instituto de Ingeniería por brindarme las instalaciones para poder llevar a cabo este proyecto de investigación, a todos los docentes que a lo largo de estos dos años me brindaron conocimientos, compañeros y personal administrativo, gracias infinitas.

Dedicatoria

A mi padres, hermanos y amigos.

Simbología y abreviaturas

Abreviatura	Significado
Ag	Plata
AgNPs	Nanopartículas de plata
S. aureus	Staphylococcus aureus
AFM	Microscopia de fuerza atómica
DLS	Dispersión dinámica de luz
UV- VIS	Espectroscopia ultra violeta visible
CYTO VIVA	Microscopia de campo oscuro hiperespectral
Tween 80	Polisorbato 80
PBS	Tampón fosfato salino
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
°C	Grados Celsius
UFC	Unidades formadoras de colonias
D.O	Densidad óptica
UV	Ultravioleta
RPM	Revoluciones por minuto
EV	Vesículas extracelulares
NV	Nanovesículas
UNPs	Nanovesículas ultrasónicas

Originalidad de autoría de tesis

El presente trabajo aporta un nuevo método en lo que compete al área de nanomateriales haciendo una fusión con vesículas extracelulares a partir del microorganismo *Staphylococcus aureus* irrumpidas por métodos físicos y químicos de bajo costo, demostrando así una capacidad antimicrobiana eficaz y prometedora por medio de la técnica caballo de troya, aportando así al área industrial e investigación científica.

Índice de contenido

Contenido

Resumen	2
Abstract	3
Agradecimientos	4
Dedicatoria	6
Simbología y abreviaturas	7
Originalidad de autoría de tesis.....	8
Índice de contenido.....	9
1.1 Introducción.....	11
1.2 Objetivo General.....	14
1.3 Objetivos específicos	14
1.4 Hipótesis	14
Capítulo 2	15
2.1 Antecedentes.....	15
2.2 Marco teórico.....	18
2.2.1 Síntesis de Nanomateriales	18
2.2.2 Fisiología e implicaciones clínicas de Staphylococcus aureus.....	19
2.2.3 Método de Caballo de Troya.....	21
Capítulo 3	23
3.1 Introducción.....	23
3.2 Preparación de medios de cultivo microbiológico.	23
3.3 Cultivo y viabilidad de Staphylococcus aureus.....	23
3.4 Preparación de cultivos de S. aureus para la síntesis de nanopartículas camufladas.	24
3.3.1 Síntesis de nanopartículas camufladas de S. aureus por el método de ultrasonido.....	25
3.3.2 Síntesis de nanopartículas camufladas de S. aureus vía Tween 80.....	25
3.3.3 Evaluación de la viabilidad celular de las nanopartículas camufladas.....	25
3.3.4 Incorporación de AgNPs en las nanopartículas camufladas.	26

3.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas camufladas	26
3.4.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.	27
3.4.2 Análisis de Dispersión Dinámica de Luz.	27
3.4.3 Microscopia Hiperespectral de Campo Oscuro de las Nanopartículas.	27
3.4.4 Microscopia de Fuerza Atómica.	28
3.5.1 Difusión en agar.....	28
3.5.2 Análisis de la tasa de sobrevivencia bacteriana dependiente del tiempo.	28
3.6 Análisis estadístico	29
Capítulo 4	29
4.1 Resultados y discusión.....	29
Capítulo 5	41
5.1 Conclusiones.....	41

Capítulo 1

1.1 Introducción

El rápido crecimiento de microorganismos patógenos y su multirresistencia frente a los antibióticos de primera línea, plantea un severo desafío para los profesionales de la salud y para el desarrollo de nuevos productos capaces de abordar este importante problema. Actualmente, se están aplicando esfuerzos por diseñar nuevas estrategias para obtener nuevas generaciones de agentes antimicrobianos más efectivos, de mayor espectro, mejor versatilidad terapéutica y funcionalidad antibacteriana [1, 2]. Un indudable ejemplo de las nuevas y prometedoras estrategias para lograr estos objetivos es la fabricación y aplicación de nanopartículas utilizando diversas fuentes tanto orgánicas como inorgánicas, naturales o sintéticas, bajo diferentes parámetros fisicoquímicos que permitan regular las interacciones célula-material requeridas para lograr el control en la respuesta celular [3, 4].

Un importante agente microbiológico y patógeno asociado a un amplio rango de infecciones de importancia médica, veterinaria y de problemáticas en procesos industriales es *S. aureus* [5]. Debido a que el perfil bacteriano que juega *S. aureus* como modelo Gram Positivo y que lo caracteriza su estructura celular este puede jugar un papel preponderante en su capacidad para resistir la acción de un importante número de agentes antimicrobianos (Figura 1) [6]. Es crucial considerar que la configuración de la pared Gram Positiva data a una espesa y gruesa capa de peptidoglicano acompañada de ácidos teicoicos y lipoteicoicos principalmente.

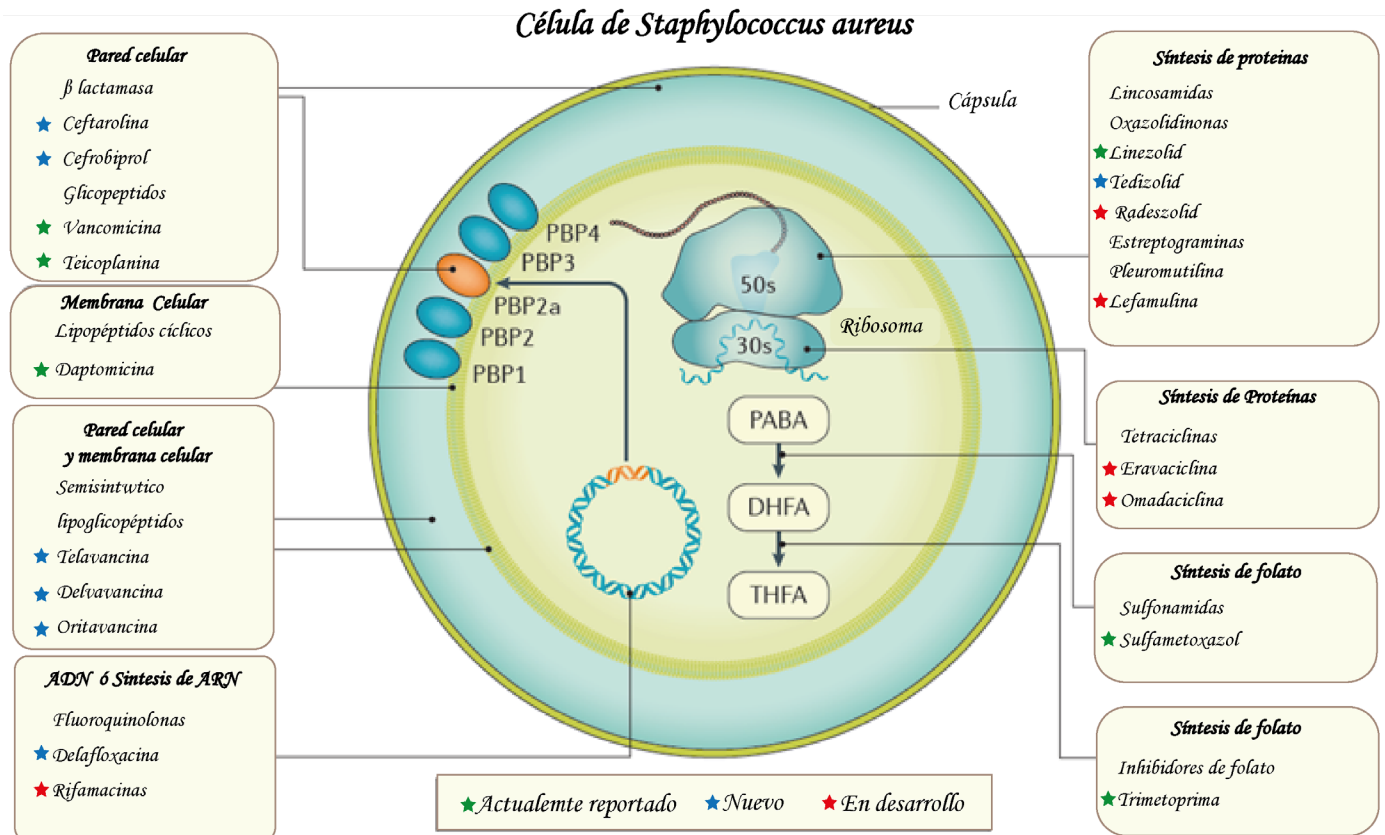


Figura 1. Puntos objetivo de antibióticos activos contra *S. aureus*, adaptado de [6].

Por otra parte, se debe considerar que *S. aureus* es responsable de un diverso número de casos asociados a infecciones subsecuentes a quemaduras en el humano, su capacidad de generar bacteriemias puede llegar a un 25%, posee una fuerte afinidad a adherirse a superficies y cuerpos extraños y que durante el proceso de bacteriemia es capaz de extenderse a otras regiones de cuerpo humano [7]. Tomando esta información es importante definir que por excelencia *S. aureus* es un colonizador de membranas mucosas, de la piel, y del tracto gastrointestinal siendo responsable de hasta un 80% de los casos que se reportan. Mientras que los casos que afectan la vía nasal y aérea se pueden amplificar cuando hay compromiso inmunológico, diabetes o diálisis, principalmente ocasionada por insuficiencia renal [8]. Por lo que ingeniar estrategias innovadoras es determinante para lograr suprimir la resistencia microbiana a los antibióticos que cada vez es más fuerte en la actualidad.

En el presente trabajo se sintetizó nanopartículas a partir de cultivos de *Staphylococcus aureus* y se incorporaron con nanopartículas de plata, con el fin de obtener nanopartículas camufladas para promover así su actividad antimicrobiana. Esta estrategia se basó considerando que la gran diversidad bacteriana requiere de interacciones célula-célula para lograr generar comunicación entre el consorcio celular y el medio que lo rodea. Por consiguiente, las AgNPs serán capaces de penetrar de forma más sencilla al interior bacteriano, por el reconocimiento de compuestos y estructuras de las vesículas de *S. aureus* camuflando a las de AgNPs. Las partículas disfrazadas no solo se considera que son capaces de pasar inadvertidas, sino también de aprovechar las propiedades naturales al máximo, ya que pueden actuar como organismos portadores de las soluciones seleccionadas para atacar microorganismo o actuar como nanoportadores capaces de reconocer a su mismo huésped todo esto en concentraciones controladas y tamaños nanométricos similares para su mayor reconocimiento, adherencia y eficacia.

Durante los últimos años la nanotecnología ha jugado un rol muy importante generando avances significativos con el diseño de nuevas técnicas para el tratamiento y aplicación de agentes antimicrobianos. Una novedosa técnica emergiendo y con aplicaciones de alto potencial para el control del crecimiento microbiano, consiste en el desarrollo de nanopartículas camufladas utilizando la membrana del mismo agente causal de la infección para el desarrollo de estrategias de Caballos de Troya [9, 10]. Es decir, aplicar las características de la membrana celular del mismo patógeno con el objetivo de engañar a la célula infecciosa para permitir la entrega del agente antimicrobiano en el interior celular [11]. De esta forma, consideramos que podremos potenciar el efecto antimicrobiano y además optimizar la selectividad de las partículas de entrega.

Cabe mencionar que este método de camuflado o disfraz es fuertemente prometedor, además en la literatura científica es escasa la información reportada sobre partículas camufladas y la aplicación del método caballo de troya en lo que refiere a implicaciones antimicrobianas. Principalmente, se reportan estas aplicaciones en vesículas extracelulares a partir de células mamíferas, por lo que asegura trabajo a futuro por ser una técnica prometedora para la respuesta de activada bactericida.

1.2 Objetivo General

Sintetizar a partir del modelo *Staphylococcus aureus* nanopartículas de origen bacteriano incorporados con nanopartículas de plata para promover su actividad antiestafilocócica.

1.3 Objetivos específicos

1. Estandarizar cultivos de *S. aureus* que permitan obtener suficiente concentración y viabilidad celular para la generación de nanopartículas camufladas.
2. Sintetizar nanopartículas bacterianas de *S. aureus* utilizando Tween como estrategia química por surfactantes.
3. Sintetizar nanopartículas bacterianas de *S. aureus* utilizando disrupción ultrasónica.
4. Estandarizar la incorporación de AgNPs a las nanopartículas bacterianas obtenidas por los dos métodos de síntesis para generar nanopartículas camufladas.
5. Caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas bacterianas y las camufladas de AgNPs.
6. Evaluar la actividad antibacteriana de los modelos nanoestructurados frente al precursor celular *S. aureus*.
7. Estudiar el efecto de las nanopartículas sintetizadas en la biología de crecimiento de *S. aureus* aplicando curvas de crecimiento en condiciones controladas.
8. Analizar los resultados y cambios estadísticos de la investigación.

1.4 Hipótesis

La aplicación de nanopartículas derivadas de *S. aureus* como estrategia de caballo de troya con incorporación de nanopartículas de plata promoverá el reconocimiento y actividad antiestafilocócico de las AgNPs, permitiendo mayor investigación en el desarrollo de modelos para aplicaciones antimicrobianas selectivas.

Capítulo 2

2.1 Antecedentes

La nanotecnología consiste en el estudio, análisis, estructuración, formación, diseño y operación de materiales a escalas moleculares, conocidos como nanomateriales [12, 13]. Por lo que la nanotecnología impacta directamente en otras áreas de la ciencia, por lo que actualmente juega un papel preponderante en las diferentes ramas interdisciplinarias. Actualmente, se afirma que el pronóstico de dichas innovaciones derivadas del desarrollo de nanomateriales y su subsecuente aplicación, dará respuesta y soluciones a muchos de los problemas que enfrenta la sociedad en la actualidad [14-16]. Asimismo, tanto las universidades como los centros de investigación están trabajando arduamente en la síntesis de nuevos nanomateriales y en el estudio de sus propiedades para aplicaciones en campos variados dentro de la medicina.

Por una parte, se ha descrito que las primeras generaciones de productos farmacológicos son los “nanofármacos” con una capacidad inédita de distribuirse de manera eficiente y específica [17-19]. Por otra parte, la funcionalización de estos compuestos para el desarrollo de avanzados medicamentos se ha obtenido como resultados formas eficaces de actividad farmacológica, con la capacidad de minimizar posibles daños colaterales que estos pudieran enfrentar [20, 21].

También es importante resaltar que la nanotecnología viene jugando un papel protagónico en cuanto a investigación y desarrollo científico refiere. Gracias a la transformación de un material a escala nanométrica, este adquiere propiedades y fenómenos totalmente novedosos los cuales se pueden modificar y manipular a la línea de conveniencia, que destacan significativamente de las que presentan a escala microscopía y macroscópica [22-24]. Considerando lo anteriormente discutido, cabe destacar que el impacto que ha ganado la nanotecnología para el tratamiento y erradicación en aplicaciones microbiológicas es de gran avance [25, 26]. Por lo que gracias a distintas técnicas de síntesis de nanomateriales es posible diseñar nuevas estrategias para atacar a distintos microorganismos oportunistas como lo es el género *Staphylococcus* [27-29], uno de los objetivos primordiales de la presente investigación.

Es importante describir el género *Staphylococcus* como un conjunto de microorganismos con morfología circular y definido como cocos Gram positivos, caracterizados por un diámetro aproximado de los 0.5- 1.5 μm [30-32]. Este género bacteriano adopta agrupaciones celulares únicas, creciendo en pares, tétradas, cadenas cortas o incluso formando racimos de uvas (Figura 1). Tomando estas características como referencia cabe destacar que son bacterias no móviles, no esporuladas, que no poseen capsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan capsula de limo, y son anaerobias facultativas [33, 34]. La mayoría de los estafilococos producen catalasa la cual es la enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre; característica que los diferencia de los estreptococos y enterococos [31].

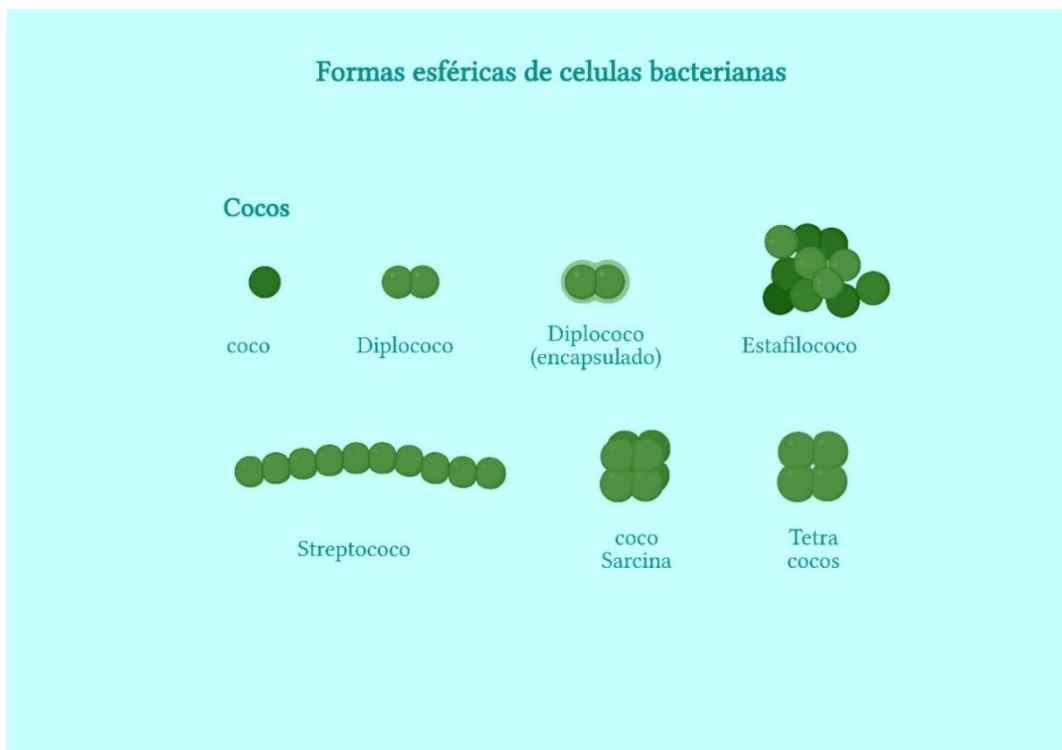


Figura 2. Representación gráfica de los arreglos celulares con los que crece el género *Staphylococcus*. Fuente:

Elaboración propia.

En la actualidad es muy común encontrar alojado *S. aureus* como parte del microbiota de la piel y mucosas en el ser humano. Estos microorganismos actúan como microorganismos oportunistas y además de que el género *Staphylococcus*

contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos [35, 36], algunas de estas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. Por otra parte, se describe a *Staphylococcus aureus* por su amplia participación en infecciones debido a la intervención de distintos factores de virulencia codificados en diversos genes que se ven activados en su ciclo de crecimiento celular [37]. Es por ello que dicho microorganismo puede ser complicado de erradicar desde el punto de vista terapéutico y aun así es capaz de colonizar e invadir células de su hospedero [38]. Estos factores de virulencia se encuentran asociados a mecanismos de alta resistencia como lo es la generación de exopolisacáridos que la mayoría de las veces se conforman por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos [5, 39, 40]. El resultado de que esta matriz no sea eliminada o inhibida tiene como consecuencia la nula interacción de los antibióticos y su subsecuente disminución del efecto terapéutico, ocasionado enfermedades infecciosas cada vez más severas.

En contraste con muchos otros patógenos bacterianos, que a menudo dependen de una o unas pocas toxinas para promover la enfermedad, *S. aureus* es capaz de generar una asombrosa variedad de factores de virulencia. Estos incluyen una plétora de toxinas y factores de evasión inmune, y una amplia gama de factores proteicos y no proteicos que permiten la colonización del huésped durante la infección [41-43]. Si bien siempre ha habido un gran interés en la virulencia de *S. aureus* desde que esta bacteria se reconoció por primera vez como un patógeno importante a fines del siglo XIX, los desarrollos recientes han aumentado los esfuerzos de investigación para desentrañar a este organismo en sus diferentes mecanismos de virulencia. Los nuevos desarrollos de materiales nanoestructurados consideran el aumento reportado a principios de la década de 2000 de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) asociado a la comunidad de cepas que combinan la resistencia a un amplio derivado de betalactámicos como las penicilinas con un alto potencial de resistencia de una manera previamente desconocida [44-46].

En los organismos multicelulares y pluricelulares (p.ej. consorcios bacterianos) las células distantes pueden intercambiar información mediante el envío de señales combinadas compuestas de moléculas individuales. Este proceso se ha descrito

recientemente que se puede ejecutar a través de paquetes de empaquetamiento complejos alimentado con una selección de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, llamados vesículas extracelulares (EV, por sus siglas en inglés) [47-49]

A medida que en las últimas décadas se ha expandido el campo de la administración dirigida de fármacos, la nanotecnología ha contribuido sustancialmente al desarrollo de estos portadores o sistemas de entrega inteligentes. En particular los nanoportadores basados en lípidos ofrecen una plataforma versátil para la encapsulación de fármacos, lo que ha llevado a su traducción y aplicación clínica con varias formulaciones [50, 51]. Además de los nanoportadores sintéticos, los derivados de células pueden actuar como importantes sistemas de transporte propios de la célula huésped o de comunicación, basados en EV. Por ejemplo, tanto las bacterias gramnegativas como las grampositivas liberan EV que contienen componentes de sus células madre. Las EV bacterianas son similares en tamaño a las EV derivadas de mamíferos y se cree que median las comunicaciones bacteria-huésped mediante el transporte de diversas moléculas bioactivas que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos [52, 53]. Las EV bacterianas se han implicado en las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-huésped, promoviendo la salud o causando diversas patologías. Aunque la ciencia de los EV bacterianos está menos desarrollada que la de los EV eucariotas, el número de estudios sobre EV bacterianos aumenta continuamente. El conocimiento de estos mecanismos puede traducirse en nuevas terapias y diagnósticos basados en EV bacterianas y su aplicación para la entrega dirigida de sustancias activas que permitan regular el control celular.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Síntesis de Nanomateriales

En función de la procedencia de los precursores base para la fabricación de los nanomateriales [54], estos se pueden clasificar en naturales, al ser generados con activos o moléculas provenientes de plantas, animales o células. También se consideran como “incidental” cuando surgen durante la combustión en vehículos y en procesos industriales [55]. Mientras que el más común es el artificial, producido por dos procesos de fabricación: descendentes/ascendentes [56].

Es importante destacar que las técnicas descendentes (Top-Down) consisten en la división de material macroscópico o grupo de materiales sólidos hasta llegar al tamaño nanométrico. Para seguir esta estrategia se usan métodos físicos como la molienda o el desgaste, métodos químicos y la volatilización de un sólido seguido por la condensación de los componentes volatilizados, hasta obtener una serie de ensambles que van siendo controlados con precisión hasta llegar al tamaño deseado [57]. Por otra parte, el método ascendente (Bottom-Up; Figura 2) principalmente se caracteriza por conducir a la unión y autoensamblado de átomos para formar estructuras moleculares con tamaño, morfología, estructura y composición química definida [58].

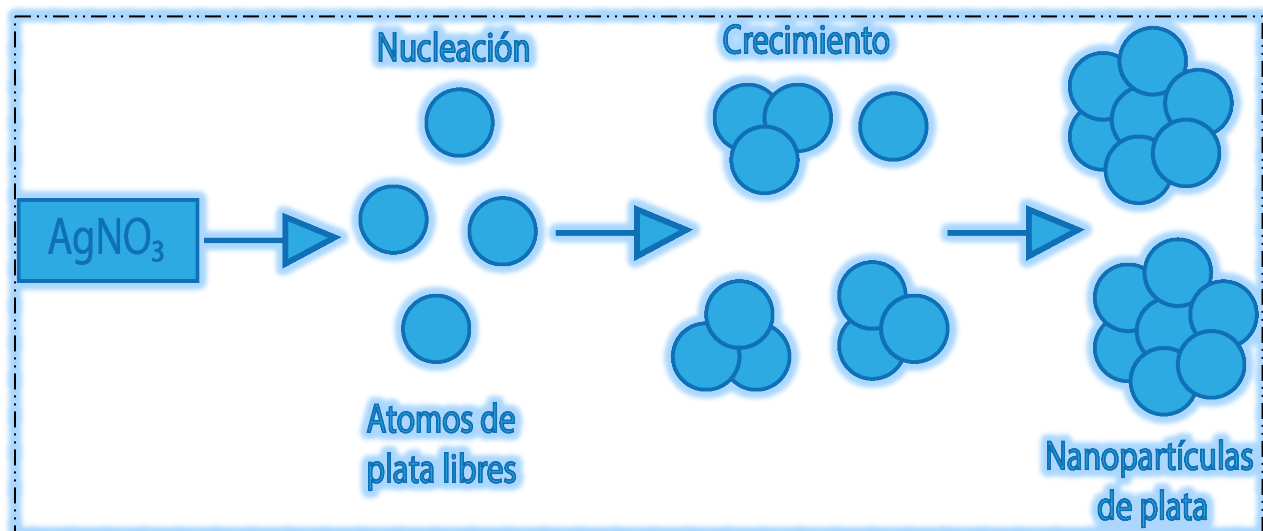


Figura 3. Síntesis de AgNPs por el método de bottom-up. Elaboración propia.

2.2.2 Fisiología e implicaciones clínicas de *Staphylococcus aureus*.

El *S. aureus* es un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. Este importante microorganismo Grampositivo es la especie de *Staphylococcus* es considerado dentro de su grupo como la

especie más virulenta por su estructura y composición superficial externa (Figura 3), responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida del ser humano [39, 59].

A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad asociada a infecciones ocasionadas por este microorganismo, a pesar del gran número de antibióticos disponibles [59, 60]. Además, *S. aureus* constituye parte de la flora normal del ser humano, y se considera que entre el 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo potencial de diseminación cuando se presentan desbalances inmunológicos [61]. Este microorganismo puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente, y en los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones asociadas a *S. aureus*, en especial por cepas predominantes de MRSA [62, 63].

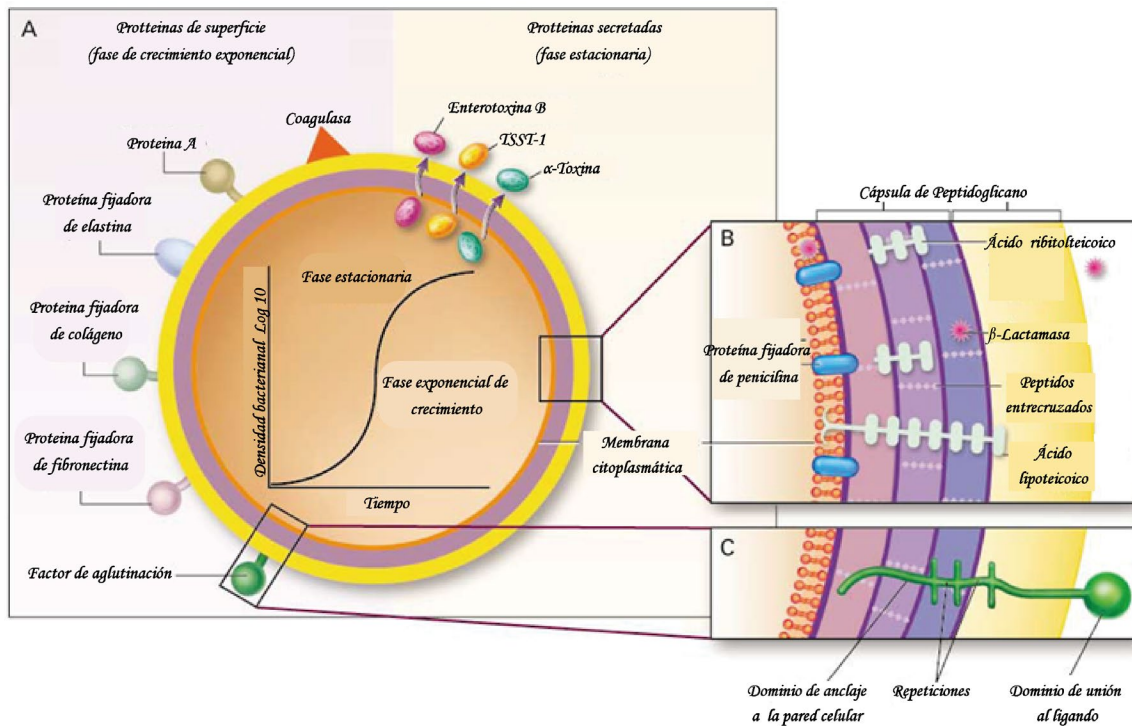


Figura 4. Estructura de *S. aureus* [61]. (Traducir el texto en la Figura)

2.2.3 Método de Caballo de Troya.

Alrededor del año 1200 d.C., la antigua Troya, actualmente parte del territorio turco, fue sitiado por el ejército griego durante aproximadamente 10 años. Al percatarse los griegos de que el asedio fue inútil, aparentemente se dieron por vencidos, no sin antes dar un último intento por conquistar Troya. Por lo que durante los siguientes tres días construyeron un alto caballo de madera como presente de despedida a los troyanos, el cual dejaron fuera de los muros de la ciudad. Una vez el ejército griego parecía retirarse de la ciudad de Troya, muy emocionados los troyanos abrieron las puertas de la ciudad, colocaron ruedas al gran caballo y lo introdujeron dentro de su pueblo. Inadvertidos los troyanos, dentro del caballo de madera se escondían soldados de elite griegos. Por lo que, al caer la noche, los soldados griegos desembarcaron del caballo y abrieron las entradas a la ciudad, dando acceso al ejército griego que había regresado a Troya durante la media noche. Por lo que el ejército griego entró a la ciudad, finalizando la guerra.

La aplicación de modelos y estructuras celulares como recipientes para el transporte, inserción e internalización de sustancias dentro de una célula blanco con el objetivo de alterarla o destruirla, es lo que actualmente definimos como estrategias de “caballo de troya” o transportadores camuflados [9]. Una importante demanda a nivel global que exige aplicar e idear innovaciones funcionales como la anteriormente mencionada es la resistencia bacteriana a los antibióticos, la cual ha crecido y convertido en una gran amenaza para la salud mundial, la economía de los países y la seguridad alimentaria [64]. Este importante factor que deteriora la salud pública progresa de forma exponencial, lo que concluirá agotando rápidamente las opciones terapéuticas y farmacológicas disponibles. La resistencia bacteriana puede afectar a todas las personas de cualquier edad, en cualquier región del mundo, sin distinguir clases sociales, razas y estilos de vida en un futuro próximo. Dicha resistencia a los antibióticos también comprometerá el progreso de la medicina moderna en áreas como el trasplante de órganos, la cirugía y la quimioterapia [65], por mencionar algunos ejemplos. Un amplio espectro de bacterias (Gram positivos y negativos) suelen ser menos sensibles a los antibióticos debido a las características de su membrana externa, que es una barrera de permeabilidad selectiva eficaz contra las moléculas tóxicas, incluidos muchos antimicrobianos. Por lo que considerar la estrategia de caballo de troya o diseño

de nanopartículas camufladas ha brindado evidencia en la eficacia y mejora promoviendo la acción antibacteriana de diferentes compuestos y materiales. Martin-Trasanco y colaboradores sintetizaron AgNPs capeadas con β -ciclodextrinepiclorhidrina como estrategia para conservar la estabilidad de las NPs y promover la internalización de la plata como estrategia de caballo de troya contra *Escherichia coli* [66], un modelo Gram Negativo. Por otra parte, la estrategia de formación de nanopartículas con propiedades de caballo de troya o camufladas también se ha aplicado para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En un estudio reciente Pang y colaboradores reportaron el diseño de nanopartículas de manganeso funcionalizadas con manosa y coordinadas con eumelanina como una estrategia de caballo de troya para localizar y aplicar terapia inmune-fototérmica [67].

Por otra parte, se reportó la aplicación de vesículas membranales extracelulares derivadas de *E. coli* y recubiertas con nanopartículas de oro (Figura 4) que al ser inyectadas por la vía subcutánea son capaces de activar rápidamente la respuesta y maduración de células dendríticas en los nodos linfáticos de ratones [68]. Por lo que el estudio demostró que es posible la aplicación de vesículas bacterianas como una prometedora estrategia de caballo de troya o camuflaje para generar vacunas o estrategias antibacterianas de alta efectividad.

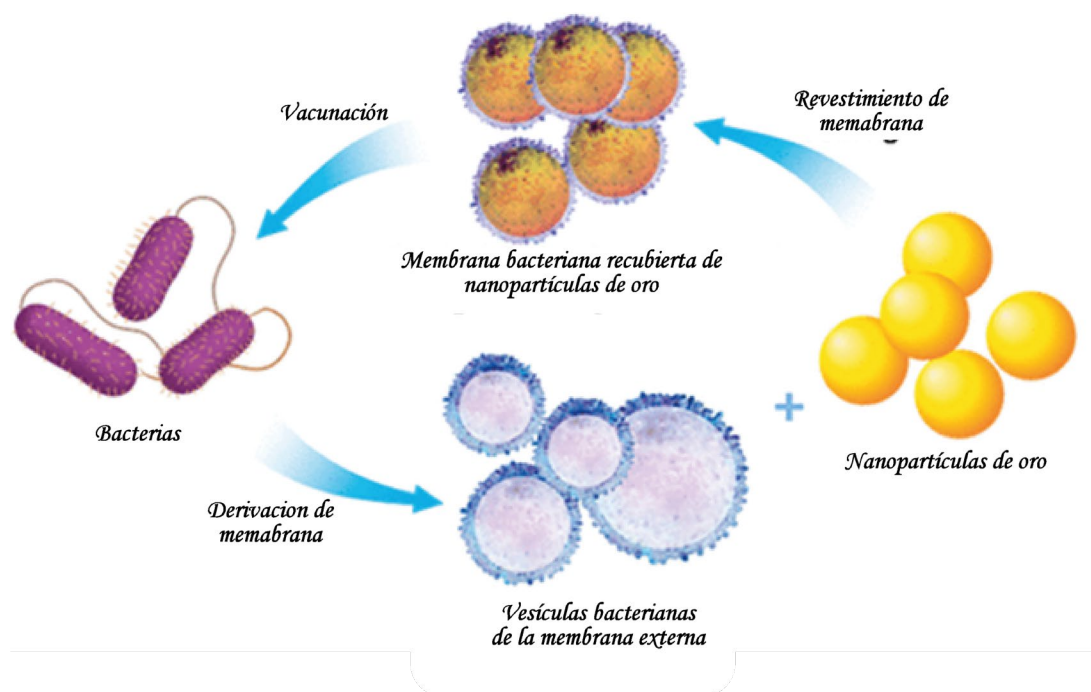


Figura 5. Diseño de nanopartículas derivadas de *E. coli* y recubiertas con AuNPs como estrategia de camuflaje para el desarrollo de vacunas y aplicaciones antibacterianas de alta efectividad, adaptado de [68].

Capítulo 3

3.1 Introducción

A continuación, se describe el proceso por el cual se obtuvieron las vesículas extra celulares, desde la síntesis, su acoplamiento con las AgNps y posteriormente las caracterizaciones y pruebas microbiológicas correspondientes que avalan el hallazgo y efecto de dichas nano vesículas.

3.2 Preparación de medios de cultivo microbiológico.

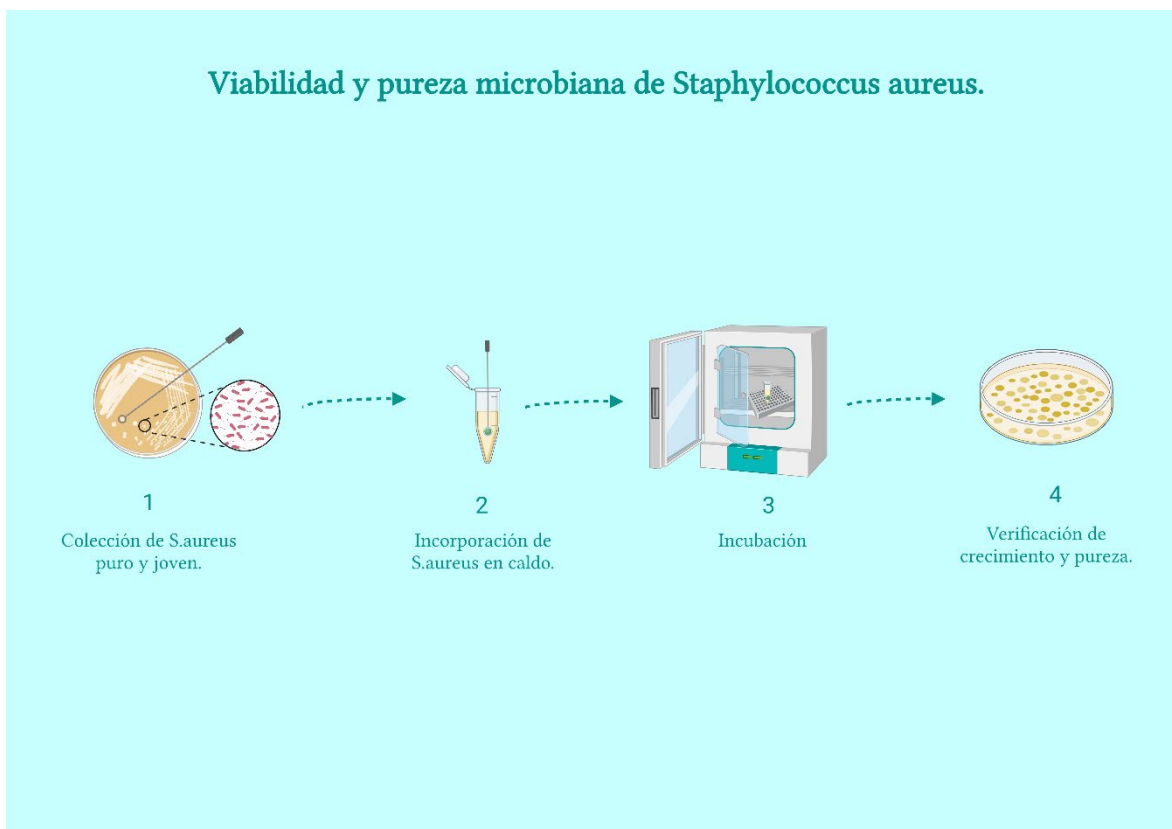
Se prepararon cajas de Petri con agar soya tripticaseína de acuerdo a lo indicado por el proveedor. Inicialmente, para 1 L de agar de soya tripticaseína (BD Bioxon, México) en agua destilada se pesaron 40 g del medio deshidratado. Posteriormente, se dejó humedecer el polvo en condiciones estáticas por 15 min, se calentó a 85 °C hasta lograr la completa disolución del medio. Después, se colocó el agar en fase líquida en el interior de una autoclave de vapor (Yamato SN300C) y se esterilizó a 121 °C. 15 psi, por 15 min. Una vez cumplido estos parámetros, se retiró el medio y se vació en cajas de Petri de 100 mm (VWR, USA) a un volumen de 25 mL por caja, en el interior de una campana de flujo laminar.

En el caso del caldo de cultivo soya tripticaseína para un volumen de 1 L se utilizó g de medio deshidratado, se disolvió en agitación constante y se esterilizó siguiendo el procedimiento para el medio en agar.

3.3 Cultivo y viabilidad de *Staphylococcus aureus*.

Con el objetivo de obtener cultivos axénicos del modelo utilizado para la generación de las vesículas, en el interior de una campana de flujo laminar se tomaron de 3 a 4 colonias de *S. aureus* (ATCC 25923) con 12 h previas de cultivo en

agar soya tripticaseína y se inocularon en 10 MI de caldo soya tripticaseína para incrementar el número de células en suspensión con las que se obtendrán las vesículas [69]. A continuación, la suspensión se colocó en el interior de una incubadora aerobia a 37 °C por 24 h (esquema 1).



Esquema 1. Procedimiento para el cultivo de *S. aureus* con alta viabilidad celular. Elaboración propia.

3.4 Preparación de cultivos de *S. aureus* para la síntesis de nanopartículas camufladas.

Para la preparación de las nanopartículas camufladas, a partir de las suspensiones previamente inoculadas, éstas se centrifugaron a 10,000 RPM por 15 min y se lavaron con agua destilada estéril, este procedimiento se repitió tres veces para obtener células vivas y descartar las muertas, así como los fragmentos y restos de células lisadas [70]. A continuación, se realizaron suspensiones celulares a una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a 600 nm, esto con el objetivo de

tener una concentración celular de aproximadamente 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, y utilizarse como concentración estándar bacteriana de trabajo.

3.3.1 Síntesis de nanopartículas camufladas de *S. aureus* por el método de ultrasonido.

A partir de la solución bacteriana inicial se realizaron alícuotas de 2 mL las cuales se colocaron en tubos microcentrífugas de 2 mL (Eppendorf, USA), se montaron en una gradilla para tubos microcentrífuga y se posicionaron en el interior de una cámara de abatimiento acústico equipada con un homogeneizador de punta (OMNI International, Sonic Ruptor 400, USA) aplicando 0.2 pulsos por segundo por 15 min a temperatura ambiente.

3.3.2 Síntesis de nanopartículas camufladas de *S. aureus* vía Tween 80.

Una vez obtenida la solución bacteriana se prepararon alícuotas de 2 mL de la muestra de *S. aureus* y se mezclaron con 30 μ L del surfactante Tween 80 (Sigma Aldrich, USA) a temperatura ambiente en el interior de una campana de flujo laminar. Cada alícuota se resuspendió repetidas ocasiones con la ayuda de una micropipeta hasta obtener completa homogeneidad.

3.3.3 Evaluación de la viabilidad celular de las nanopartículas camufladas

Con el fin de identificar que la viabilidad bacteriana se haya erradicado por completo durante el procedimiento de síntesis de las nanopartículas camufladas, se procedió a realizar cultivos de cada una de las muestras. Inicialmente, se tomaron 100 μ L de cada una de las suspensiones y se colocaron en el interior de un tubo con 10 mL de caldo infusión cerebro corazón, se incubaron a 37 °C por 5 días en condiciones estáticas y ambiente aerobio. Posteriormente, se verifica

que no exista la formación de precipitados o turbidez en el caldo de cultivo, para sembrar 100 μL del medio en agar soya tripticaseína sin dilución alguna e incubar a 37 °C por 48 h. Esta parte del procedimiento se aplicó para confirmar la ausencia de viabilidad celular, después de la generación de las vesículas bacterianas.

Por otra parte, al realizar cada preparación de nanopartículas camufladas se verificaba la viabilidad celular realizando la siembra directa de 50 μL de la suspensión en agar soya tripticaseína, incubándose a 37 °C, en condiciones aerobias por 72 h.

3.3.4 Incorporación de AgNPs en las nanopartículas camufladas.

Para la incorporación de las AgNPs dentro de las vesículas de *S. aureus* sintetizadas por los diferentes métodos, se realizó mezclas entre ambas suspensiones a proporciones 1:2, 1:1 y 2:1 (V/V). Por lo que se realizaron pruebas de microbiología para cada una de las soluciones generadas, esto con el objetivo de identificar la eficacia antibacteriana en función a la proporción [71]

3.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas camufladas

Las nanopartículas de plata se sintetizaron empleando NaBH_4 como reductor primario y citrato sodio como agente estabilizador. Primero se preparó el volumen el NaBH_4 (2 μM) y citrato de sodio (2 μM) en agua destilada y se calentó a 60 °C durante 30 minutos en la oscuridad con agitación vigorosa para asegurar una solución homogénea. Al final de los

30 minutos, se añadió gota a gota una solución de AgNO_3 (1.5Mm). Después de otros 30 minutos bajo agitación y calentamiento, la suspensión de nanopartículas se dejó enfriar a temperatura ambiente.

3.4.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.

Cada una de las muestras (AgNPs, NPs camufladas en Tween 80 y Sonicadas) se suspendieron en agua destilada y se colocaron dentro de una celda de cuarzo transparente para ser analizadas en un espectrofotómetro UV-Vis (UV-2600, Shimadzu, Japón) en la región de 300 a 600 nm con una resolución de 1 nm a temperatura ambiente [72].

3.4.2 Análisis de Dispersión Dinámica de Luz.

Con el objetivo de cuantificar el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas camufladas (Tween 80 y por Ultrasonido) en suspensión, se prepararon soluciones acuosas de cada una y se colocaron 3 mL de cada muestra por separado para analizarse en un Nanotrak Wave II (Microtrac, North Wales, PA, USA) con un tiempo de lectura de 30 segundos a temperatura ambiente [69, 73].

3.4.3 Microscopia Hiperespectral de Campo Oscuro de las Nanopartículas.

Para analizar la incorporación de AgNPs dentro de las nanopartículas camufladas (T80NPs y UNPs) se utilizó un sistema de iluminación en campo oscuro (Cytoviva® 150 Resolution Imaging System, Auburn, AI, USA) equipado en un microscopio vertical (Olympus BX-41, Japón), contando con un objetivo de 100x de inmersión de aceite (Olympus, Japón). Las muestras se prepararon colocando individualmente 10 μL de cada una de las muestras de estudio sobre portaobjetos de vidrio (VWR, USA), con un cubreobjetos de vidrio (0.145 mm de grosor; VWR, USA) y sellados con esmalte de uñas comercial para evitar la desecación de las muestras [69]. Cada portaobjetos se dejó reposar por una hora para ser posteriormente montado en el equipo Cytoviva para obtener las micrografías de las partículas y el plasmón de resonancia de las AgNPs.

3.4.4 Microscopia de Fuerza Atómica.

Para los estudios morfológicos de las nanopartículas por microscopia de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) se depositaron las suspensiones de AgNPs, UNPs y T80NPs en cubreobjetos de vidrio y se colocaron en desecador hasta completa sequedad. A continuación, las muestras se montaron en un porta muestras para AFM, posicionándolas en un AFM (NX10, Park Systems, Suwon, República de Corea) equipado con una caja antiacústica y mesa antivibratoria. Para los análisis se aplicó una fuerza constante de 42 N/m, la frecuencia de resonancia fue de 330 kHz, la tasa de escaneo fue de 0.2 Hz y el área de análisis fue de 0.5 μm^2 , empleando una punta tipo PPP-NCHR en modo de no contacto [74].

3.5.1 Difusión en agar.

Se aplicó la técnica de difusión en agar para evaluar la capacidad antibacteriana de las nanopartículas experimentales y los cambios de estos en función a la estrategia de caballo de troya que se aplicó [11, 75, 76]. Inicialmente, se sembró 0.1 mL de *S. aureus* en cajas de petri con agar soya tripticaseína y se dejó reposar por 30 min. A continuación, se generaron pozos de 7 mm de diámetro y 4 mm de profundidad utilizando un cilindro metálico estéril. Posteriormente, se colocaron 30 μL de cada una de las muestras experimentales en pozos individuales y se incubaron en condiciones aerobias y estáticas a 37 °C por 24 h [77]. Los halos de inhibición resultantes se midieron utilizando un vernier electrónico digital y las cajas de Petri se fotografiaron en un contador de colonias de campo oscuro (Reichert, NY, NY, USA).

3.5.2 Análisis de la tasa de sobrevivencia bacteriana dependiente del tiempo.

Para la evaluación del comportamiento en el crecimiento bacteriano en función al tiempo por exposición de las AgNPs camufladas con NPs derivadas de *S. aureus*, se realizaron curvas de crecimiento para monitorear los cambios y respuestas celulares. Inicialmente, se prepararon stocks individuales de AgNPs, UNPs, T80NPs, AgNPs/UNPs (2:1),

AgNPs/UNPs (1:1), AgNPs/T80NPs (2:1) y AgNPs/T80NPs (1:1) en agua destilada estéril, dentro de tubos microcentrífuga de 2 mL temperados a 37 °C. A continuación, se agregaron 20 µL de una suspensión fresca de *S. aureus* (1×10^6 UFC/mL) en H₂O destilada (previamente esterilizada) a cada uno de los stocks preparados por separado con las AgNPs y los modelos camuflados (con y sin AgNPs). Después, se incubaron todas las muestras a 37 ± 0.1 °C, en condiciones estáticas y aerobias por un periodo de 24 h. Durante la incubación, se realizó mediciones de D.O. a 600 nm cada 60 min a 37 ± 0.1 °C, utilizando un lector de microplacas equipado con control de incubación (Thermoskan, Thermo Fisher Scientific, USA). Como referencia del crecimiento bacteriano, se utilizó una suspensión libre de tratamiento alguno, y como señales de línea base se analizó las suspensiones sin contenido bacteriano durante cada punto de lectura, y se normalizó sustrayendo el blanco [69, 78].

3.6 Análisis estadístico

Los datos de cada experimento se analizaron aplicando el análisis de varianzas de una vía seguido por el método de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el programa estadístico (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Cuando $P < 0.05$, los datos se consideraron estadísticamente significativos, siendo expresados como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado [79].

Capítulo 4

4.1 Resultados y discusión

Inicialmente, se realizaron varios pasajes celulares para comprobar el grado de pureza de los cultivos de la cepa *S. aureus* que se utilizaron para el estudio, identificando que las colonias conservaran el color dorado característico [7, 44], siempre uniformes, bien distribuidas y de reciente cultivo para su aplicación (Figura 6). De esta forma, se validó la homogeneidad en los parámetros biológicos de las nanovesículas generadas a partir de las cepas de *S. aureus*. Sin

embargo, después de aplicar alrededor de 8 pasajes celulares, se realizaba un cultivo en agar Staphylococcus No. 110 como método de control de calidad y conservación de la pureza celular (datos no mostrados).

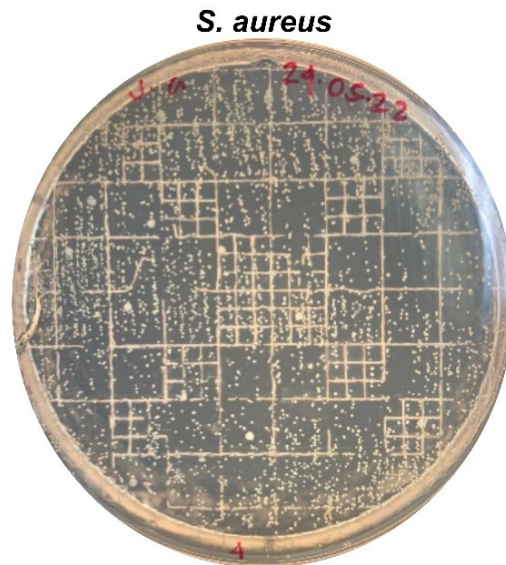


Figura 6. Cultivo axénico de *S. aureus* utilizado para el presente estudio.

Por otra parte, se estandarizó la generación de nanovesículas generadas por las cepas de *S. aureus* como resultado de la ejecución de réplicas de los métodos, en lo que se descubrió que ni el método por Tween 80 (T80NPs) y ultrasonido (UNPs) permitieron conservar la viabilidad celular

Método de Tween 80

Método de Ultrasonido

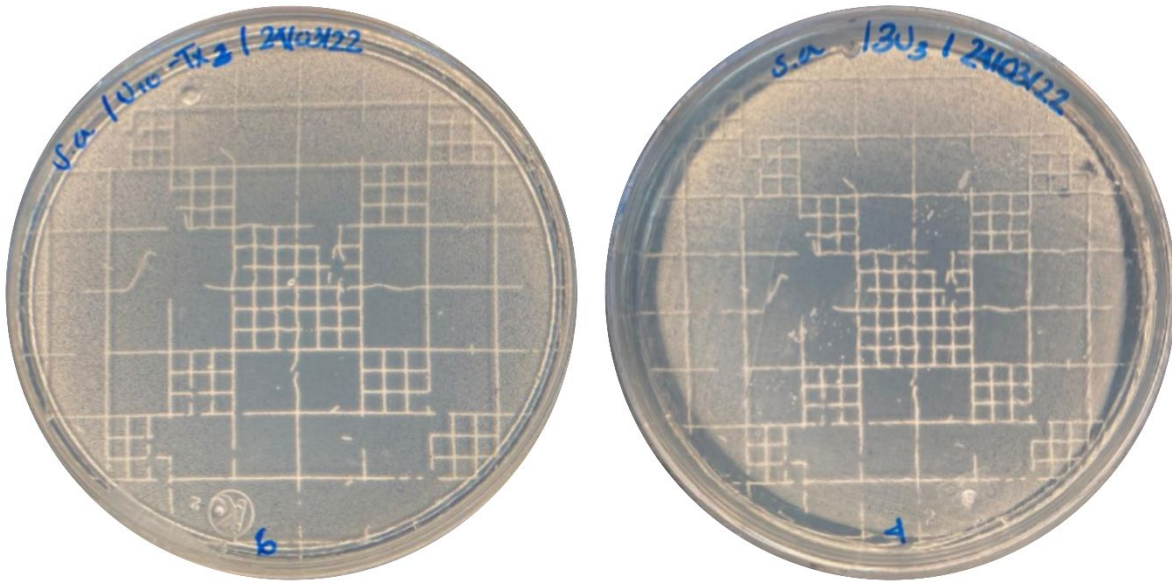


Figura 7. Análisis de la viabilidad de *S. aureus* posterior a los protocolos de generación de nanovesículas bacterianas.

Nótese la falta de crecimiento y formación de colonias.

Después de lograr estandarizar la preparación de las nanovesículas bacterianas y demostrar que los métodos aplicados logran erradicar la viabilidad celular, lo que resulta como indicativo que elimina la posibilidad de contaminación celular y propagación por aplicación de este novedoso tratamiento.

A continuación, se aplicó la técnica de DLS con el objetivo de caracterizar el diámetro hidrodinámico de las vesículas, resultando en 6-9 nm. Es importante resaltar que el tamaño promedio de un coco Gram positivo como es el modelo *S. aureus* es de 0.5 – 1 μm [80], lo que indica que al aplicar los métodos de generación de nanovesículas reportado en este estudio, se reduce significativamente el tamaño celular (Figura 8). Por otra parte, es importante discutir que ambos métodos no solo se caracterizaron por reducir el tamaño celular (generando nano-vesículas), sino también se detectó que la uniformidad en la distribución de tamaño es muy baja, indicando que la mayor tasa de las vesículas generadas se encuentra distribuidas en un rango de 5 – 15 nm (T80NPs) y 5 – 20 nm (UNPs).

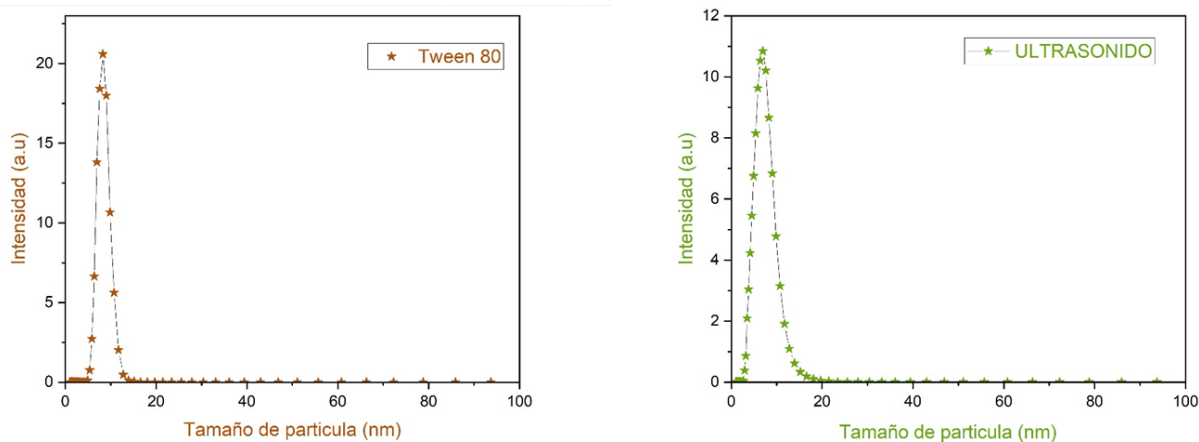


Figura 8. Análisis de DLS de las nanovesículas derivadas de *S. aureus* sintetizadas por los dos métodos experimentales.

Se ha reportado en la literatura que las células bacterianas en función a su género, tamaño, componentes particulares y a su naturaleza en la composición extracelular pueden generar diferentes espectros de absorción en el plano UV-Visible [81-83]. Por lo que se evaluó los posibles cambios espectrofotométricos que pudieran originarse entre *S. aureus* y las nanovesículas resultantes de las estrategias sintéticas experimentales (Figura 9). Las curvas espectrofotométricas indicaron que se presentaron ligeros cambios en las regiones de absorción de 250 – 280 nm entre ambos tipos de vesículas (UNPs y T80NPs) y *S. aureus* en suspensión. Este interesante efecto puede deberse a las alteraciones a nivel de membrana celular debido al proceso de ultrasonido y a la emulsificación molecular ocasionado por el Tween 80. Es importante resaltar que el ultrasonido consiste en la emisión de ondas sonoras que generan alta energía permitiendo alterar la estructura de diferentes sustancias químicas, principalmente compuestos orgánicos. Un estudio reciente sugirió que el tratamiento ultrasónico inhibe el crecimiento de *E. coli* O157:H7 (modelo de interés en la industria alimentaria), por medio de la disrupción de la integridad de membrana, aberración en la morfología celular y alteraciones ultraestructurales que llevan al vaciamiento celular [84]. Además, los investigadores reportaron que la aplicación de ultrasonido puede generar permeabilidad y subsecuente alteración en la polaridad membranal, en conjunto inhibiendo el crecimiento de *E. coli*. Esta información propone que el ultrasonido pudo ocasionar una leve alteración bioquímica de los componentes celulares, lo que podría explicar los cambios ligeros ilustrados por el UV-Vis.

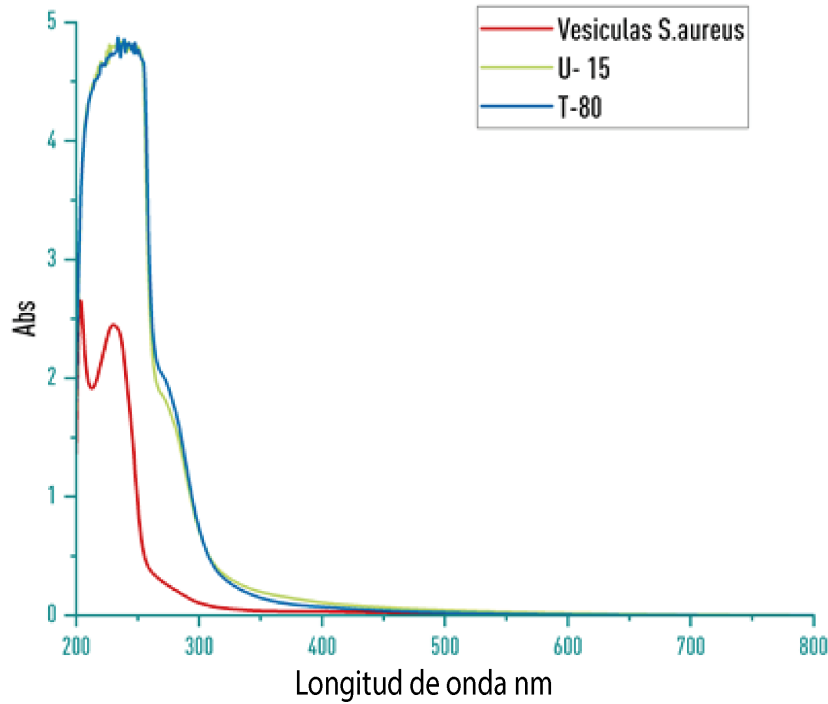


Figura 9. Espectro ultravioleta-visible que muestra el comportamiento de absorción entre las nanovesículas y la bacteria precursora.

Reitermeyers et al., reportó que la aplicación de Tween 80 en cultivos de *Lactobacillus platarum* puede afectar la fisiología y estrés celular generando alteraciones en el perfil de ácidos grasos celulares [85]. Los estudios transcriptómicos descritos por los investigadores indicaron que se presenta una disminución en la ruta de la biosíntesis de ácidos grasos, acompañado de liberación de proteínas y permeabilización membranal. Esta información en parte ayuda a explicar la pérdida de la viabilidad celular y el comportamiento similar en el espectro UV-Vis observado para estos tratamientos.

Como se describió anteriormente, en este estudio se aplicaron AgNPs electroquímicas (5 – 10 nm en diámetro, proporcionadas por el Laboratorio de Corrosión y Materiales Avanzados) como agente antibacteriano y de enmascarado. Con el objetivo de ubicar el plasmón de resonancia de las AgNPs, se aplicó espectroscopia de UV-Vis, demostrando que el pico máximo se ubica en 400 nm, información que coincide con lo reportado en la literatura.

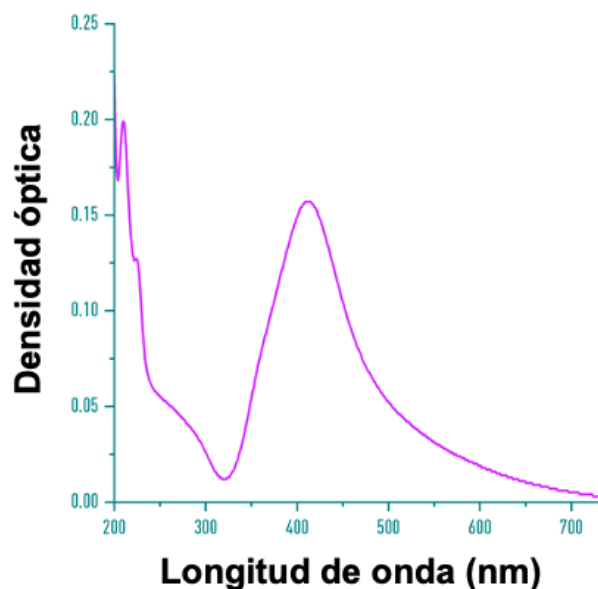


Figura 10. Espectro UV-Vis de las AgNPs utilizadas para camuflar con las nanovesículas de *S.*

Con el objetivo de identificar la formación de vesículas y la incorporación de las AgNPs a estas, se caracterizaron las nanovesículas sintetizadas por ambos métodos y la incorporación de AgNPs (Figura 11).

Es interesante describir que el método de ultrasonido (UNPs) generó la formación de estructuras vesiculares altamente definidas por el Cytoviva, ilustrando alta homogeneidad y dispersión de las muestras. Asimismo, las T80NPs sugirieron presentar mayor presencia de fragmentos celulares y restos provenientes de las mismas bacterias. Sin embargo, es importante indicar que los procesos de lavado y tratamiento sugirieron ser altamente efectivos, ya que comparado con los controles bacterianos (datos no mostrados) no se encontró la presencia de restos de exopolisacáridos, partículas de alto tamaño que indicará la presencia de células intactas y tampoco la formación de grandes conglomerados

membranales. Por otra parte, al analizar las AgNPs fue claramente evidente la presencia de partículas completamente diferentes a las observadas en las nanovesículas.

Las AgNPs ilustraron partículas de diferentes colores, que de acuerdo con estudios de otros grupos se debe a diferencias en el tamaño de la nanopartícula y ligeros desplazamientos en los plasmones superficiales de resonancia [86, 87].

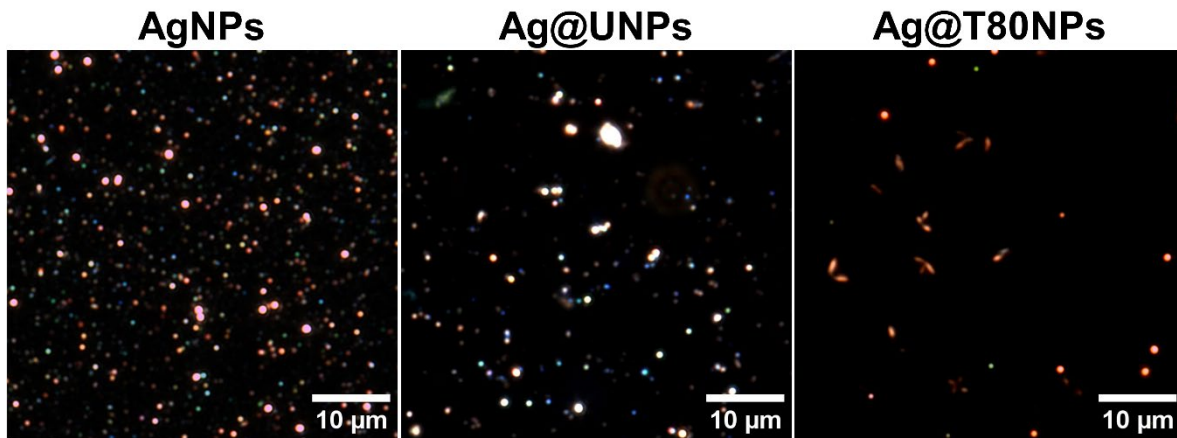


Figura 11. Micrografías de campo oscuro hiperespectral (Cytoviva) de las nanovesículas funcionalizadas y AgNPs.

Tomando toda esta evidencia, se evaluó la presencia de las AgNPs en conjunto con las nanovesículas obtenidas por ultrasonido (Ag@UNPs) y por Tween 80 (Ag@T80NPs). Las micrografías propusieron que las Ag@UNPs se redujeron en tamaño al entrar en contacto con las AgNPs, sin embargo, incorporando a las AgNPs en el interior y la periferia membranal. Incluso las Ag@T80NPs siguieron un patrón similar, mostrando la presencia de las AgNPs en conjunto con las vesículas, pero también con los fragmentos celulares resultantes del tratamiento.

Con el objetivo de caracterizar la morfología de las nanovesículas y las AgNPs, éstas se prepararon y montaron para AFM (Figura 12). Las micrografías indicaron que las AgNPs siguieron una morfología esférica, con una distribución homogénea caracterizadas por estructuras regulares en altura y diámetro. Por otra parte, las UNPs mostraron la formación de vesículas semiesféricas ligeramente e irregulares, pero distribuidas siguiendo una misma orientación. La altura de las UNPs fue muy similar entre el grupo analizado, de acuerdo a lo mostrados por las micrografías en 3D

obtenidas. En el caso de las T80NPs se apreció la formación de vesículas de mayor tamaño en comparación con las UNPs y también las AgNPs (Figura 12), sugiriendo que la presencia del surfactante podría permitir la generación de intercalaciones entre membranas que pudieran resultar en vesículas de mayor tamaño [88].

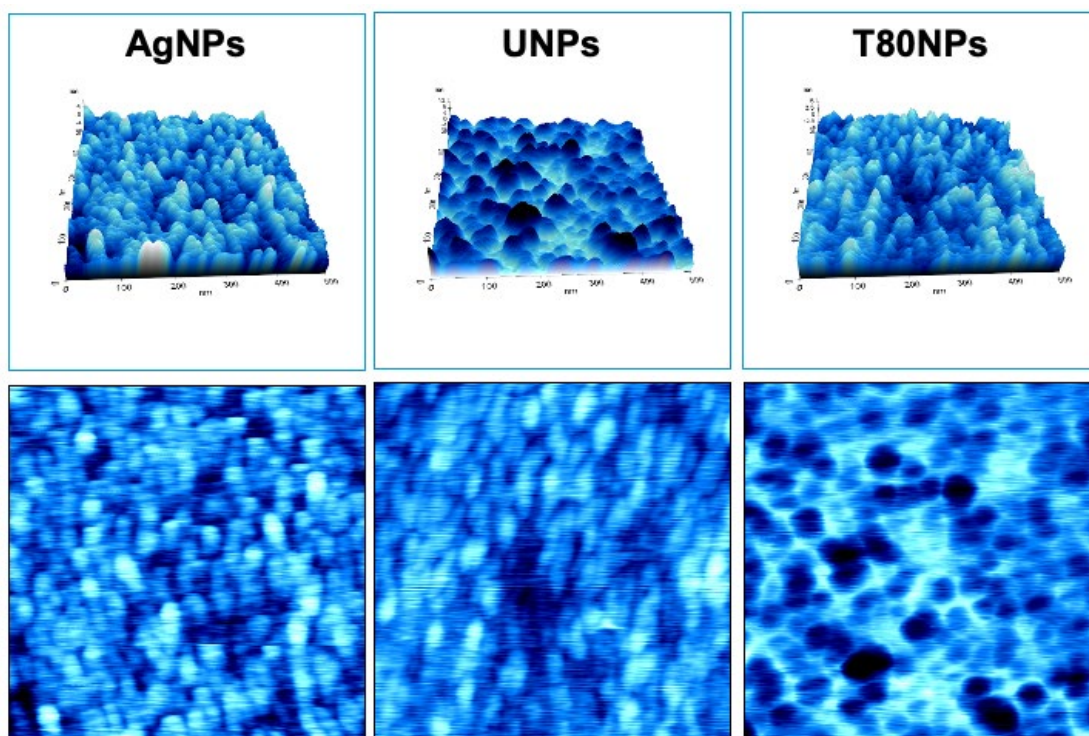


Figura 12. Micrografías de AFM mostrando la morfología de los nanomateriales experimentales.

Con el objetivo de identificar la actividad antiestafilocócica de las nanopartículas experimentales, se procedió a ejecutar la prueba de difusión en agar Kriby-Bauer (Figura 13). Los resultados indicaron que la presencia de las nanovesículas obtenidas por ambos métodos no disminuían la actividad antibacteriana de las AgNPs en su concentración total (sin diluir). Mientras que las AgNPs incorporadas a las nanovesículas se mezclaron en una proporción 1:1 (V/V), por lo que la actividad de las AgNPs se conservó. Estos interesantes resultados en parte pueden explicarse debido a una posible fusión de las nanovesículas generadas por ambos métodos que se integran de forma rápidas con las superficies membranales de *S. aureus*. Por lo que en consecuencia se da un proceso de absorción/fusión generando la

permeabilización de la membrana bacteriana, lo que permite la penetración de las AgNPs incorporadas dentro y fuera de las nanovesículas (UNPs y T80NPs), mejorando el flujo de penetración del “nanoantibacteriano” [89].

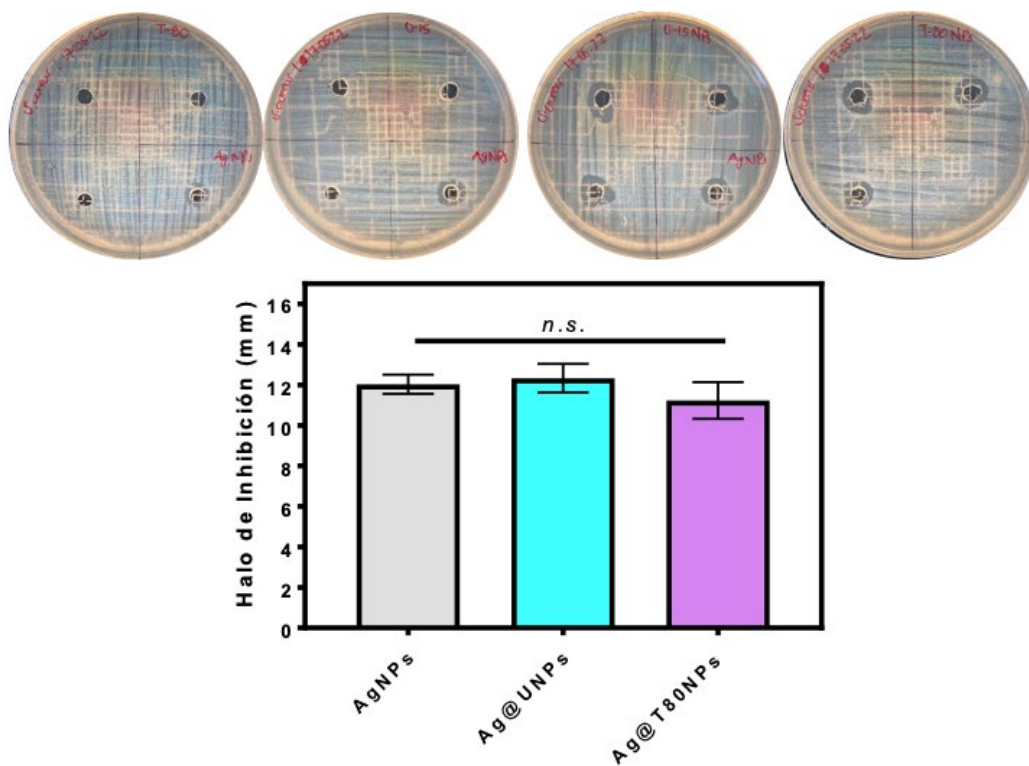


Figura 13. Análisis de actividad antibacteriana de las nanopartículas experimentales contra *S. aureus*. n.s. indica cambios sin significancia estadística.

Por otra parte, se evaluó la actividad antibacteriana de los modelos experimentales variando las proporciones de nanovesículas con respecto a las AgNPs (1:1 y 2:1). Los resultados indicaron que tanto las Ag@UNPs y Ag@T80NPs conservaron su actividad sin cambios estadísticamente significativos (Figura 14). Estos resultados son importantes debido a que sugieren que el potencial de acción de las AgNPs se puede conservar al camuflarse con las nanovesículas, requiriendo de menor concentración de acción y potencializando la capacidad de penetración celular contra *S. aureus*.

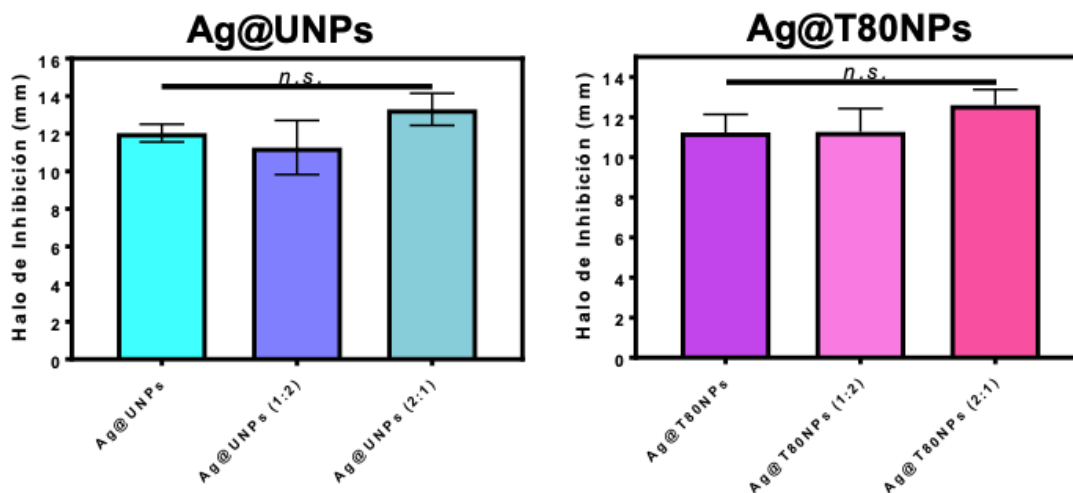


Figura 14. Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas experimentales funcionalizadas con AgNPs a diferentes proporciones. n.s. indica cambios sin significancia estadística.

Con el objetivo de analizar el impacto de los nanomateriales y parte de su mecanismo de acción frente a *S. aureus*, se estudió la capacidad de crecimiento bacterianos en función al tiempo (Figura 15). Es interesante resaltar el sorprendente poder antibacteriano que se detectó desde el inicio del tratamiento, ya que los microorganismos no lograron crecer en ninguno de los modelos nanoestructurados evaluados. Este importante efecto se monitoreó por cinco horas continuas, para identificar si podría darse alguna recuperación celular o solamente se tratara de un desplazamiento en la capacidad de crecimiento bacteriano [69]. Por lo que esta información sugiere que parte del mecanismo de efecto antibacteriano puede estar regulado por la eficiencia de penetración célula-nanomaterial [72, 90, 91].

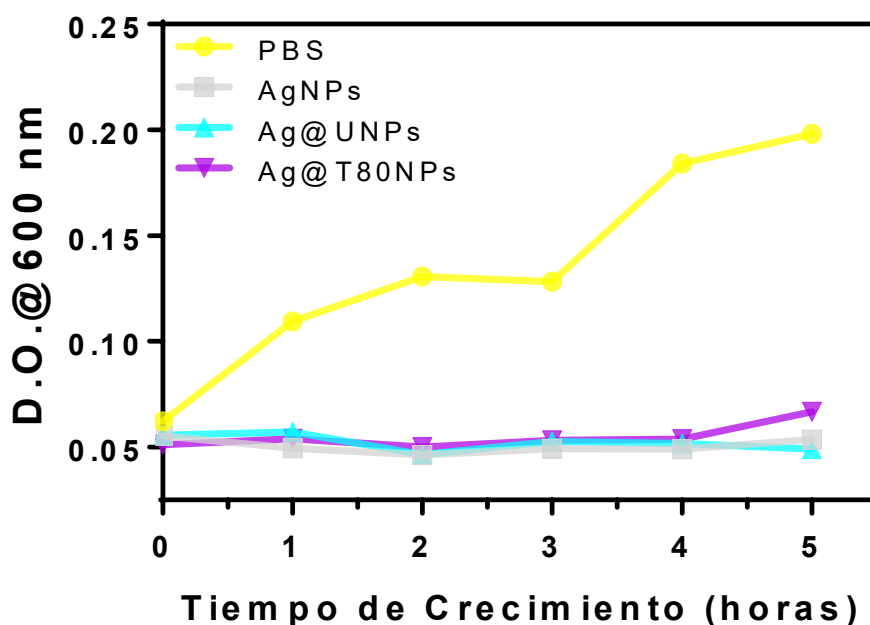


Figura 15. Curva de crecimiento bacteriano mostrando el comportamiento antibacteriano de las NPs experimentales durante la fase de evolución exponencial. Nótese un comportamiento similar entre los nanomateriales.

Para caracterizar si el efecto en la actividad antibacteriana de los nanomateriales en función al tiempo y fase de crecimiento estaba relacionado a la proporción AgNPs/nanovesículas, se ejecutaron curvas de crecimiento bacterianos utilizando proporciones variadas de cada uno de los nanomateriales (Figura 16). Los resultados indicaron un interesante decaimiento a la primera hora de tratamiento entre AgNPs y su contraparte funcionalizadas con las nanovesículas en proporción 2:1. Este efecto podría deberse a que al contar con mayor disponibilidad de AgNPs se potenciaría el efecto antibacteriano, sin embargo, no fue así para las puras AgNPs, por lo que se hipotetiza que la presencia de las nanovesículas facilitaron la penetración de un mayor número de AgNPs, potenciando así el efecto de primer paso, dando mejor difusión y penetración, sin permitir un crecimiento constante bacteriano. Por otra parte, al aplicarse los tratamientos en relación AgNPs/nanovesículas (1:2) se encontró el que el comportamiento inhibitorio fue similar durante las seis horas de monitoreo (Figura 16). Lo que este comportamiento fue similar al observado al utilizar la relación 1:1

anteriormente discutida (Figura 15). Este efecto en parte refuerza la hipótesis del manejo de nanorevestimientos (camuflados) derivados de *S. aureus* como mecanismo de promoción y reconocimiento antibacteriano.

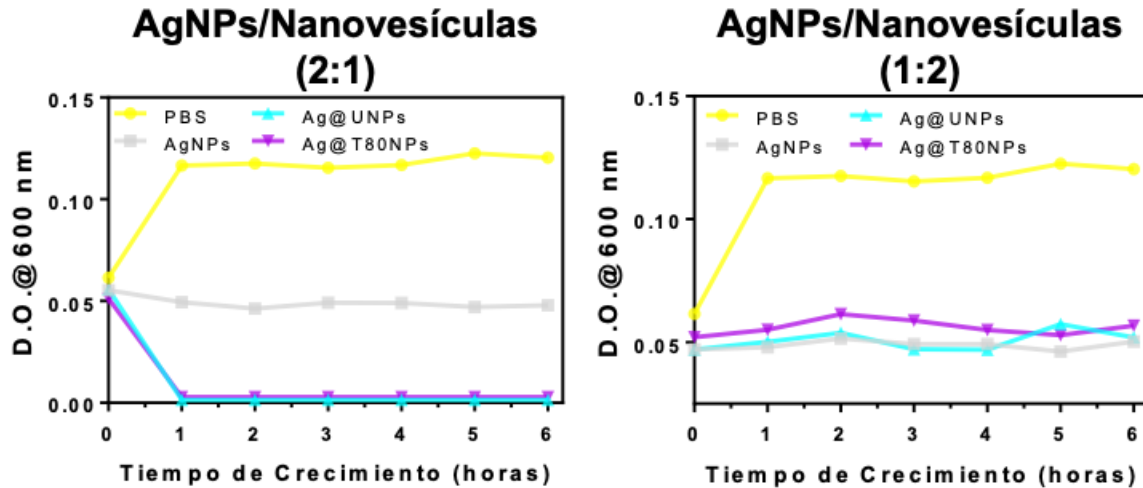


Figura 16. Curvas de crecimiento de *S. aureus* mostrando el comportamiento antibacteriano de las NPs

experimentales en proporciones variadas, durante la fase de proliferación exponencial.

Estos resultados sugieren que la aplicación de nanovesículas derivadas de la fuente bacteriana puede incrementar la capacidad de acción de los tratamientos antimicrobianos, disminuyendo así el requerimiento de altas concentraciones e incrementando la biodisponibilidad de estos. Además, es interesante que el enmascarar (camuflar) las AgNPs, más que incrementar su capacidad de acción, podría acelerar el efecto destructor bacteriano, lo que sugiere que las AgNPs mantendrán su efecto, pero el tiempo de respuesta podrá ser menor. Se recomienda caracterizar las nanovesículas y sus contrapartes funcionalizadas por microscopía electrónica de transmisión, identificar la penetración de AgNPs a las células por Cytoviva y estudiar los componentes metabólicos y proteómicos de las nanovesículas obtenidas por ambos tratamientos. Los resultados obtenidos en este estudio abren puerta a continuar con las investigaciones en estrategias de “caballo de Troya” para el desarrollo y aplicación de nuevas metodologías de acción antiestafilocócica y antimicrobial.

Capítulo 5

5.1 Conclusiones

Las estrategias de “camuflaje” de agentes antimicrobianos es una novedosa tendencia en crecimiento para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos que se viene desarrollando desde hace ya más de cinco décadas. Por lo que en el presente estudio se desarrolló nanovesículas derivadas de *S. aureus* con el objetivo de “enmascarar” agentes antimicrobianos que puedan ser incorporados a las células objetivo y promover así el efecto antiestafilocócico buscado. Los resultados indicaron que utilizar el surfactante Tween 80 se altera la estructura y comportamiento de las partículas bacterianas de *S. aureus*, permitiendo generar nanovesículas con distribución homogénea, inhibiendo el crecimiento y recolonización celular. Además, el método de ultrasonido también fue efectivo para la obtención de nanovesículas provenientes de *S. aureus*. Al incorporar las AgNPs con las nanovesículas en diferentes proporciones, se encontró que la capacidad antibacteriana de la plata no se ve comprometida, por lo contrario, se requirieron menores niveles de AgNPs para lograr efectos similares. Los estudios de crecimiento bacteriano sugieren que la presencia de las AgNPs camufladas pueden acelerar la captación, subsecuente absorción/difusión de las AgNPs, disminuyendo el tiempo de acción, como lo propuso las curvas de crecimiento. Por otra parte, las pruebas preliminares de las Ag@UNPs y Ag@T80NPs mostraron escasa/nula inhibición contra *E. coli* (datos no mostrados), lo que sugiere que el método desarrollado puede ser altamente específico para dirigirse contra microorganismos de interés. Se recomienda caracterizar por métodos ómicos los componentes bioquímicos de las nanovesículas, aplicar TEM para estudiar los cambios estructurales de las NPs camufladas y extender el estudio con otros modelos bacterianos.

Referencias

1. Wasan, H.; Reeta, K. H.; Gupta, Y. K., Strategies to improve antibiotic access and a way forward for lower middle-income countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2023**, 79, (1), 1-10.
2. Moreira, L.; Guimarães, N. M.; Santos, R. S.; Loureiro, J. A.; Pereira, M. C.; Azevedo, N. F., Promising strategies employing nucleic acids as antimicrobial drugs. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **2024**.
3. Pauli, B.; Ajmera, S.; Kost, C., Determinants of synergistic cell-cell interactions in bacteria. *Biological Chemistry* **2023**, 404, (5), 521-534.
4. van Hoogstraten, S. W. G.; Kuik, C.; Arts, J. J. C.; Cillero-Pastor, B., Molecular imaging of bacterial biofilms—a systematic review. *Critical Reviews in Microbiology* **2023**, 1-22.

5. Wilson, T. K.; Zishiri, O. T.; El Zowalaty, M. E., Molecular detection of virulence genes in *Staphylococcus aureus* isolated from wild pigeons (*Columba domestica livia*) in KwaZulu-Natal in South Africa. *One Health* **2024**, 18, 100656.
6. Lee, A. S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers* **2018**, 4, (1), 18033.
7. Lam, J. C.; Stokes, W., The Golden Grapes of Wrath – *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Clinical Review. *The American Journal of Medicine* **2023**, 136, (1), 19-26.
8. Kluytmans, J.; Belkum, A. v.; Verbrugh, H., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* **1997**, 10, (3), 505-520.
9. Stenzel, M. H., The Trojan Horse Goes Wild: The Effect of Drug Loading on the Behavior of Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, 60, (5), 2202-2206.
10. Zhao, Q.; Sun, X.; Wu, B.; Shang, Y.; Huang, X.; Dong, H.; Liu, H.; Chen, W.; Gui, R.; Li, J., Construction of homologous cancer cell membrane camouflage in a nano-drug delivery system for the treatment of lymphoma. *Journal of Nanobiotechnology* **2021**, 19, (1), 8.
11. Park, E.-J.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Park, K., Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* **2010**, 24, (3), 872-878.
12. Awogbemi, O.; Kallon, D. V. V., Recent advances in the application of nanomaterials for improved biodiesel, biogas, biohydrogen, and bioethanol production. *Fuel* **2024**, 358, 130261.
13. Karthikeyan, B.; Velvizhi, G., A state-of-the-art on the application of nanotechnology for enhanced biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* **2024**, 52, 536-554.
14. Peng, Y.; Yang, Z.; Li, J.; Liu, S., Research progress on nanotechnology of traditional Chinese medicine to enhance the therapeutic effect of osteoarthritis. *Drug Delivery and Translational Research* **2024**.
15. Justo-Hanani, R.; Justo-Hanani, R., *Governing Nanotechnology Safety: The Politics of Risk Regulation in Europe and the United States Governing Nanotechnology Safety*. Edward Elgar Publishing: **2024**; p 39-56.

16. Agrawal, N.; De, M.; Kulkarni, S. A.; Singh, L.; Tripathy, S. K., Nanotechnology and Its Applications in Biomedical Sciences. In *Cutting-Edge Applications of Nanomaterials in Biomedical Sciences*, Prabhakar, P. K.; Prakash, A., Eds. IGI Global: Hershey, PA, USA, **2024**; pp 86-111.
17. Shi, Y.; He, D.; Zhang, X.; Yuan, M.; Liu, X., Research Progress in Nanopharmaceuticals with Different Delivery Routes in the Antivirus Field. *Current Pharmaceutical Design* **2023**, *29*, (25), 1975-1991.
18. Yadav, H. K. S.; Al mohammedawi, F.; Abujarad, R. J. I., Applications and Prospects of Nanopharmaceuticals Delivery. In *Advances in Novel Formulations for Drug Delivery*, **2023**; pp 45-66.
19. Adams, F.; Zimmermann, C. M.; Luciani, P.; Merkel, O. M., Chapter 9 - Microfluidics for nanopharmaceutical and medical applications. In *Microfluidics for Cellular Applications*, Perozziello, G.; Krühne, U.; Luciani, P., Eds. Elsevier: **2023**; pp 343-408.
20. Liu, F.; Xiang, Q.; Luo, Y.; Luo, Y.; Luo, W.; Xie, Q.; Fan, J.; Ran, H.; Wang, Z.; Sun, Y., A hybrid nanopharmaceutical for specific-amplifying oxidative stress to initiate a cascade of catalytic therapy for pancreatic cancer. *Journal of Nanobiotechnology* **2023**, *21*, (1), 165.
21. Moghimi, S. M.; Haroon, H. B.; Yaghmur, A.; Hunter, A. C.; Papini, E.; Farhangrazi, Z. S.; Simberg, D.; Trohopoulos, P. N., Perspectives on complement and phagocytic cell responses to nanoparticles: From fundamentals to adverse reactions. *Journal of Controlled Release* **2023**, *356*, 115-129.
22. Malik, S.; Muhammad, K.; Waheed, Y., Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* **2023**, *28*, (2), 661.
23. Kumar, R.; Kumar, M.; Luthra, G., Fundamental approaches and applications of nanotechnology: A mini review. *Materials Today: Proceedings* **2023**.
24. Chehelgerdi, M.; Chehelgerdi, M.; Allela, O. Q. B.; Pecho, R. D. C.; Jayasankar, N.; Rao, D. P.; Thamaraikani, T.; Vasanthan, M.; Viktor, P.; Lakshmaiya, N.; Saadh, M. J.; Amajd, A.; Abo-Zaid, M. A.; Castillo-Acobo, R. Y.; Ismail, A. H.; Amin, A. H.; Akhavan-Sigari, R., Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Molecular Cancer* **2023**, *22*, (1), 169.

25. Kaittanis, C.; Santra, S.; Perez, J. M., Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, (4), 408-423.
26. Ball, A. S.; Patil, S.; Soni, S., Chapter 1 - Introduction into nanotechnology and microbiology. In *Methods in Microbiology*, Gurtler, V.; Ball, A. S.; Soni, S., Eds. Academic Press: 2019; Vol. 46, pp 1-18.
27. Patil, R.; Dehari, D.; Chaudhuri, A.; Kumar, D. N.; Kumar, D.; Singh, S.; Nath, G.; Agrawal, A. K., Recent advancements in nanotechnology-based bacteriophage delivery strategies against bacterial ocular infections. *Microbiological Research* **2023**, 273, 127413.
28. Gao, Y.; Chen, Y.; Cao, Y.; Mo, A.; Peng, Q., Potentials of nanotechnology in treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 213, 113056.
29. Singh, S.; Numan, A.; Somaini, H. H.; Gorain, B.; Ranjan, S.; Rilla, K.; Siddique, H. R.; Kesharwani, P., Nano-enabled strategies to combat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, 129, 112384.
30. J. Foster, T., 39 - *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Medical Microbiology*, Sussman, M., Ed. Academic Press: London, 2002; pp 839-888.
31. Boyce, J. M.; Cookson, B.; Christiansen, K.; Hori, S.; Vuopio-Varkila, J.; Kocagöz, S.; Öztop, A. Y.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Harbarth, S.; Pittet, D., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases* **2005**, 5, (10), 653-663.
32. Howden, B. P.; Giulieri, S. G.; Wong Fok Lung, T.; Baines, S. L.; Sharkey, L. K.; Lee, J. Y. H.; Hachani, A.; Monk, I. R.; Stinear, T. P., *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology* **2023**, 21, (6), 380-395.
33. Wang, X.; Wu, X.; Shen, L.; Rao, L.; Wang, B.; Zhao, H.; Zhang, J.; Xiao, Y.; Guo, Y.; Xu, Y.; Chen, L.; Yu, F., Phylogenetic Analysis and Virulence Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST45 in China: a Hyper-Virulent Clone Associated with Bloodstream Infections. *mSystems* **2023**, 8, (2), e00029-23.

34. Loftus, R. W.; Dexter, F.; Brown, J., The importance of targeting intraoperative transmission of bacteria with antibiotic resistance and strain characteristics. *American Journal of Infection Control* **2023**, 51, (6), 612-618.
35. Severn, M. M.; Horswill, A. R., Staphylococcus epidermidis and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews Microbiology* **2023**, 21, (2), 97-111.
36. Szczuka, E.; Wesołowska, M.; Krawiec, A.; Kosicki, J. Z., Staphylococcal species composition in the skin microbiota of domestic pigeons (*Columba livia domestica*). *PLOS ONE* **2023**, 18, (7), e0287261.
37. Barbuti, M. D.; Myrbråten, I. S.; Morales Angeles, D.; Kjos, M., The cell cycle of Staphylococcus aureus: An updated review. *MicrobiologyOpen* **2023**, 12, (1), e1338.
38. Otto, M., Critical Assessment of the Prospects of Quorum-Quenching Therapy for Staphylococcus aureus Infection. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, (4), 4025.
39. Ibrahim, R. A.; Berhe, N.; Mekuria, Z.; Seyoum, E. T.; Balada-Llasat, J.-M.; Abebe, T.; Mariam, S. H.; Tsige, E.; Fentaw Dinku, S.; Wang, S.-H., Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Profile of Clinical Staphylococcus aureus: A Multi-Center Study from Ethiopia. *Infection and Drug Resistance* **2023**, 16, (null), 4835-4844.
40. Nikolic, P.; Mudgil, P., The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of Staphylococcus aureus and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms* **2023**, 11, (2), 259.
41. Zhang, H.; Zhang, Z.; Li, J.; Qin, G., New Strategies for Biocontrol of Bacterial Toxins and Virulence: Focusing on Quorum-Sensing Interference and Biofilm Inhibition. *Toxins* **2023**, 15, (9), 570.
42. Wittekind, M. A.; Briaud, P.; Smith, J. L.; Tennant, J. R.; Carroll, R. K., The Small Protein ScrA Influences Staphylococcus aureus Virulence-Related Processes via the SaeRS System. *Microbiology Spectrum* **2023**, 11, (3), e05255-22.
43. Xu, J.; Wang, Y.; Liu, F.; Duan, G.; Yang, H., Genome mining reveals the prevalence and extensive diversity of toxin–antitoxin systems in Staphylococcus aureus. *Frontiers in Microbiology* **2023**, 14.

44. Stefani, S.; Chung, D. R.; Lindsay, J. A.; Friedrich, A. W.; Kearns, A. M.; Westh, H.; MacKenzie, F. M., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**, 39, (4), 273-282.
45. Gould, I. M.; David, M. Z.; Esposito, S.; Garau, J.; Lina, G.; Mazzei, T.; Peters, G., New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2012**, 39, (2), 96-104.
46. Enright, M. C.; Robinson, D. A.; Randle, G.; Feil, E. J.; Grundmann, H.; Spratt, B. G., The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, (11), 7687-7692.
47. Schorey, J. S.; Cheng, Y.; Singh, P. P.; Smith, V. L., Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports* **2015**, 16, (1), 24-43.
48. Kim, J. H.; Lee, J.; Park, J.; Gho, Y. S., Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2015**, 40, 97-104.
49. Ñahui Palomino, R. A.; Vanpouille, C.; Costantini, P. E.; Margolis, L., Microbiota-host communications: Bacterial extracellular vesicles as a common language. *PLOS Pathogens* **2021**, 17, (5), e1009508.
50. Pimentel-Moral, S.; Teixeira, M. C.; Fernandes, A. R.; Arráez-Román, D.; Martínez-Férez, A.; Segura-Carretero, A.; Souto, E. B., Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, 260, 85-94.
51. Mishra, D. K.; Shandilya, R.; Mishra, P. K., Lipid based nanocarriers: a translational perspective. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2018**, 14, (7), 2023-2050.
52. Liu, Y.; Defourny, K. A. Y.; Smid, E. J.; Abee, T., Gram-Positive Bacterial Extracellular Vesicles and Their Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology* **2018**, 9.
53. Xie, J.; Li, Q.; Haesebrouck, F.; Van Hoecke, L.; Vandembroucke, R. E., The tremendous biomedical potential of bacterial extracellular vesicles. *Trends in Biotechnology* **2022**, 40, (10), 1173-1194.

54. Peralta-Videa, J. R.; Zhao, L.; Lopez-Moreno, M. L.; de la Rosa, G.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J. L., Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 186, (1), 1-15.
55. Khin, M. M.; Nair, A. S.; Babu, V. J.; Murugan, R.; Ramakrishna, S., A review on nanomaterials for environmental remediation. *Energy & Environmental Science* **2012**, 5, (8), 8075-8109.
56. Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* **2006**, 35, (7), 583-592.
57. Abid, N.; Khan, A. M.; Shujait, S.; Chaudhary, K.; Ikram, M.; Imran, M.; Haider, J.; Khan, M.; Khan, Q.; Maqbool, M., Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2022**, 300, 102597.
58. Ijaz, I.; Gilani, E.; Nazir, A.; Bukhari, A., Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews* **2020**, 13, (3), 223-245.
59. Abdollahi, A.; Nojomi, M.; Karimi, Y.; Ranjbar, M., Mortality patterns in patients with Staphylococcus aureus bacteremia during the COVID-19 pandemic: Predictors and insights. *Heliyon* **2024**, 10, (2), e24511.
60. Bai, A. D.; Lo, C. K. L.; Komorowski, A. S.; Suresh, M.; Guo, K.; Garg, A.; Tandon, P.; Senecal, J.; Corpo, O. D.; Stefanova, I.; Fogarty, C.; Butler-Laporte, G.; McDonald, E. G.; Cheng, M. P.; Morris, A. M.; Loeb, M.; Lee, T. C., Staphylococcus aureus bacteremia mortality across country income groups: A secondary analysis of a systematic review. *International Journal of Infectious Diseases* **2022**, 122, 405-411.
61. Lowy, F. D., Staphylococcus aureus Infections. *New England Journal of Medicine* **1998**, 339, (8), 520-532.
62. Ismael, Y. H.; Pacheco e Castilho, H. G.; Zhen, F.; Yamaguto, G. E.; Moriya, V. L.; Maestri, A. C.; Kussen, G. M. B.; Nogueira, M. B.; Petterle, R.; Shimidt, A. L. A.; Moreira, F. N.; da Silva Nogueira, K.; Raboni, S. M., Clinical and microbiological profile of health care-associated infections in a tertiary hospital: Comparison

- between a cohort of hospitalized patients during pre-pandemic and COVID-19 pandemic periods. *American Journal of Infection Control* **2024**.
63. Chelkeba, L.; Melaku, T., Epidemiology of staphylococci species and their antimicrobial-resistance among patients with wound infection in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **2022**, 29, 483-498.
64. Fair, R. J.; Tor, Y., Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry* **2014**, 6, PMC.S14459.
65. Pantosti, A.; Sanchini, A.; Monaco, M., Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology* **2007**, 2, (3), 323-334.
66. Martin-Trasanco, R.; Anziani-Ostuni, G.; Esparza-Ponce, H. E.; Ortiz, P.; Montero-Cabrera, M. E.; Oyarzún, D. P.; Zúñiga, C.; Pérez-Donoso, J. M.; Pizarro, G. d. C.; Arratia-Pérez, R., From Concentrated Dispersion to Solid β -Cyclodextrin Polymer-Capped Silver Nanoparticle Formulation: A Trojan Horse Against *Escherichia coli*. *ChemistrySelect* **2019**, 4, (34), 10092-10096.
67. Pang, X.; Xu, H.; Geng, Q.; Han, Y.; Zhang, H.; Liu, H.; Zhang, X.; Miao, M., Nanotheranostic Trojan Horse for visualization and photo-immunotherapy of multidrug-resistant bacterial infection. *Journal of Nanobiotechnology* **2023**, 21, (1), 492.
68. Gao, W.; Fang, R. H.; Thamphiwatana, S.; Luk, B. T.; Li, J.; Angsantikul, P.; Zhang, Q.; Hu, C.-M. J.; Zhang, L., Modulating Antibacterial Immunity via Bacterial Membrane-Coated Nanoparticles. *Nano Letters* **2015**, 15, (2), 1403-1409.
69. Valdez-Salas, B.; Beltrán-Partida, E.; Zlatev, R.; Stoytcheva, M.; Gonzalez-Mendoza, D.; Salvador-Carlos, J.; Moreno-Ulloa, A.; Cheng, N., Structure-activity relationship of diameter controlled Ag@Cu nanoparticles in broad-spectrum antibacterial mechanism. *Materials Science and Engineering: C* **2021**, 119, 111501.

70. Yu, S.; Zhao, Z.; Xu, X.; Li, M.; Li, P., Characterization of three different types of extracellular vesicles and their impact on bacterial growth. *Food Chemistry* **2019**, *272*, 372-378.
71. Castangia, I.; Marongiu, F.; Manca, M. L.; Pompei, R.; Angius, F.; Ardu, A.; Fadda, A. M.; Manconi, M.; Ennas, G., Combination of grape extract-silver nanoparticles and liposomes: A totally green approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2017**, *97*, 62-69.
72. Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; Valdez-Salas, E.; Pérez-Cortéz, G.; Nedev, N., Synthesis, Characterization, and In Situ Antifungal and Cytotoxicity Evaluation of Ascorbic Acid-Capped Copper Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials* **2019**, *2019*, 5287632.
73. Valdez-Salas, B.; Beltran-Partida, E.; Cheng, N.; Salvador-Carlos, J.; Valdez-Salas, E. A.; Curiel-Alvarez, M.; Ibarra-Wiley, R., Promotion of Surgical Masks Antimicrobial Activity by Disinfection and Impregnation with Disinfectant Silver Nanoparticles. *Int J Nanomedicine* **2021**, *16*, 2689-2702.
74. Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; García-López Portillo, M.; Gutierrez-Perez, C.; Castillo-Uribe, S.; Salvador-Carlos, J.; Alcocer-Cañez, J.; Cheng, N., Atherosclerotic-Derived Endothelial Cell Response Conducted by Titanium Oxide Nanotubes. *Materials* **2023**, *16*, (2), 794.
75. Jang, S. C.; Kim, S. R.; Yoon, Y. J.; Park, K.-S.; Kim, J. H.; Lee, J.; Kim, O. Y.; Choi, E.-J.; Kim, D.-K.; Choi, D.-S.; Kim, Y.-K.; Park, J.; Di Vizio, D.; Gho, Y. S., In vivo Kinetic Biodistribution of Nano-Sized Outer Membrane Vesicles Derived from Bacteria. *Small* **2015**, *11*, (4), 456-461.
76. Hsiao, I. L.; Hsieh, Y.-K.; Wang, C.-F.; Chen, I. C.; Huang, Y.-J., Trojan-Horse Mechanism in the Cellular Uptake of Silver Nanoparticles Verified by Direct Intra- and Extracellular Silver Speciation Analysis. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49*, (6), 3813-3821.
77. Rivera-Martinez, T.; Valdez-Salas, B.; Salvador-Carlos, J.; Stoytcheva, M.; Zlatev, R.; Beltrán-Partida, E., Improvement of the antibacterial and skin-protective performance of alcohol-based sanitizers using hydroglycolic phytocompounds. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2023**, *37*, (1), 2253927.

78. Su, Y.; Zhao, L.; Meng, F.; Wang, Q.; Yao, Y.; Luo, J., Silver nanoparticles decorated lipase-sensitive polyurethane micelles for on-demand release of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, 152, 238-244.
79. Beltrán-Partida, E.; Valdez-Salas, B.; Escamilla, A.; Moreno-Ulloa, A.; Burtseva, L.; Valdez-Salas, E.; Curiel Alvarez, M.; Nedev, N., The Promotion of Antibacterial Effects of Ti6Al4V Alloy Modified with TiO₂ Nanotubes Using a Superoxidized Solution. *Journal of Nanomaterials* **2015**, 2015, 818565.
80. Myrbråten, I. S.; Stamsås, G. A.; Chan, H.; Angeles, D. M.; Knutsen, T. M.; Salehian, Z.; Shapaval, V.; Straume, D.; Kjos, M., SmdA is a Novel Cell Morphology Determinant in Staphylococcus aureus. *mBio* **2022**, 13, (2), e03404-21.
81. McBirney, S. E.; Trinh, K.; Wong-Beringer, A.; Armani, A. M., Wavelength-normalized spectroscopic analysis of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa growth rates. *Biomed. Opt. Express* **2016**, 7, (10), 4034-4042.
82. Liu, X.; Jing, X.; Ye, Y.; Zhan, J.; Ye, J.; Zhou, S., Bacterial Vesicles Mediate Extracellular Electron Transfer. *Environmental Science & Technology Letters* **2020**, 7, (1), 27-34.
83. An, H.-W.; Fei, Y.; Yan, T.-D.; Lu, C.-Q.; Wang, M.-D.; Ma, T.; Zhao, B.-Y.; Nie, J.-M.; Tseng, H.-R.; Li, L.-L.; Wang, H., Gram-Positive Bacteria Cell Wall Driven Self-Disassembled Nanovesicles against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Advanced Therapeutics* **2020**, 3, (6), 1900217.
84. He, Q.; Liu, D.; Ashokkumar, M.; Ye, X.; Jin, T. Z.; Guo, M., Antibacterial mechanism of ultrasound against Escherichia coli: Alterations in membrane microstructures and properties. *Ultrasonics Sonochemistry* **2021**, 73, 105509.
85. Reitermayer, D.; Kafka, T. A.; Lenz, C. A.; Vogel, R. F., Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of Lactobacillus plantarum. *BMC Microbiology* **2018**, 18, (1), 72.

86. Wang, X.; Xu, L.; Ma, M.; Xu, M.; Zhou, Q.; Liu, S.; Jiang, G., A Novel Strategy for Visualizing, Tracing, and Measuring the Gastrointestinal Absorption of Silver Nanoparticles. *Advanced Functional Materials* **2023**, *33*, (40), 2302366.
87. Paluri, S. L. A.; Ryan, J. D.; Lam, N. H.; Nepal, D.; Sizemore, I. E., Analytical-Based Methodologies for Examining the In Vitro Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination (ADME) of Silver Nanoparticles. *Small* **2017**, *13*, (23), 1603093.
88. Liu, J.; You, Q.; Liang, F.; Ma, L.; Zhu, L.; Wang, C.; Yang, Y., Ultrasound-nanovesicles interplay for theranostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2024**, *205*, 115176.
89. Abo Kamer, A. M.; Amer, N. M.; Abdelmegeed, A. A.; El Maghraby, G. M.; Gamaleldin, N. M., Surfactant nanovesicles for augmented antibacterial activity against carbapenemase resistant enterobacteriaceae and extended spectrum beta-lactamases producing bacteria: in vitro and in vivo evaluation. *BMC Microbiology* **2023**, *23*, (1), 73.
90. Gurunathan, S.; Thangaraj, P.; Das, J.; Kim, J.-H., Antibacterial and antibiofilm effects of *Pseudomonas aeruginosa* derived outer membrane vesicles against *Streptococcus mutans*. *Heliyon* **2023**, *9*, (12).
91. Dilxat, D.; Xie, D.; Wang, J.; Habibul, N.; Zhang, H.-C.; Sheng, G.-P.; Wang, Y., Molecular design of ultrafiltration membranes with antibacterial properties for the inactivation of antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Membrane Science* **2024**, *690*, 122131.