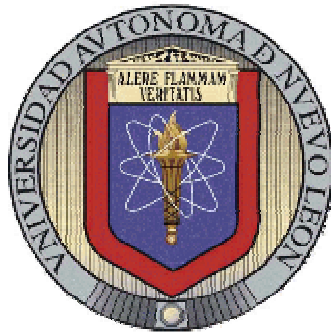


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO BACTERICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
SOBRE MICROORGANISMOS RESISTENTES
A LOS ANTIBIÓTICOS *IN VITRO*

Por

B.F. MÓNICA MARCELA JEREZ URRIOLAGOITIA

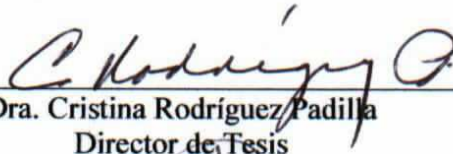
Como requisito parcial para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA

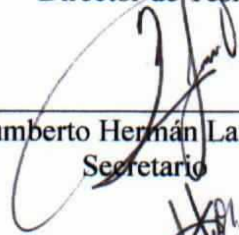
Febrero, 2007

EFFECTO BACTERICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
SOBRE MICROORGANISMOS RESISTENTES
A LOS ANTIBIÓTICOS *IN VITRO*

Comité de Tesis



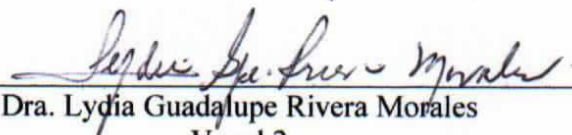
Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director de Tesis



Dr. Humberto Hernán Lara Villegas
Secretario



Dra. Liliana del Carmen Ixtapan Turrent
Vocal 1



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Vocal 2

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Secretaría de Relaciones Exteriores por hacer posible la realización de mis estudios de postgrado en México en la Universidad Autónoma de Nuevo León, a través de su programa de becas para alumnos extranjeros.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por darme la oportunidad de cursar la maestría en el laboratorio de Inmunología y Virología, por dirigir este trabajo y por todo el apoyo recibido.

Al Dr. Humberto Hermán Lara Villegas por permitirme trabajar en el laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 bajo su asesoramiento, por su apoyo incondicional, por todas sus enseñanzas, por su tiempo, por su paciencia y por ayudarme a ser cada día una mejor persona.

A la Dra. Liliana del Carmen Ixtapan Turrent por formar parte de mi comité de tesis y por toda su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales por formar parte de mi comité de tesis, por todos sus consejos y su apoyo.

A todos mis maestros por compartir conmigo su conocimiento y su experiencia que de una y otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeras Vanesa Ayala Núñez e Ivonné Martínez Carlín por su colaboración, por su amistad y por todas las experiencias que pasamos en el tiempo que estuve trabajando en el laboratorio BL-3.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos a quienes amo profundamente, en agradecimiento a su cariño, a toda la confianza que me dieron, por creer en mí, por ser siempre un estímulo para seguir adelante y por estar a mi lado en todo momento a pesar de la distancia.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 El Desarrollo de la Resistencia a los Antimicrobianos.....	5
4.2 Mecanismos de Resistencia a Antibióticos.....	7
4.2.1 Restricción de Acceso del Antibiótico a su Blanco	7
4.2.1.1 Porinas de la membrana externa.....	7
4.2.1.2 Paso reducido a través de la membrana citoplasmática.....	8
4.2.2 Inactivación Enzimática del Antibiótico	8
4.2.2.1 β -Lactamasas	8
4.2.2.2 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos.....	9
4.2.3 Expulsión Activa del Antibiótico.....	10
4.2.4 Modificación o Protección del Blanco del Antibiótico	10
4.2.4.1 Resistencia β -Lactámicos	10
4.2.4.2 Resistencia a Antibióticos Glicopéptidos	11
4.2.4.3 Resistencia a Tetraciclinas.....	11
4.2.4.4 Resistencia a Macrólidos, Estreptograminas y Lincosaminas.....	12
4.2.4.5 Resistencia a Quinolonas y Rifampicina	12
4.3 Emergencia de Bacterias Resistentes	12
4.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)	12
4.3.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> resistente a Eritromicina (SPRE).....	16
4.3.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 resistente a Ampicilina.....	17
4.3.4 <i>Pseudomona aeruginosa</i> multirresistente.....	19

4.4	La Nueva Era de los Agentes Antimicrobianos	22
4.5	Efecto antibacteriano de los compuestos de Plata.....	22
4.5.1	Propiedades antibacterianas de la Plata.....	22
4.5.2	Nitrato de Plata.....	23
4.5.3	Sulfadiazina de Plata	24
4.5.4	Mecanismo Antibacteriano de la Plata	26
4.5.5	Resistencia Bacteriana a Plata	27
4.5.6	Mecanismos de Resistencia a Plata.....	27
4.5.7	Otros Compuestos de Plata utilizados como Antimicrobianos.....	28
4.6	Nanociencia y Nanotecnología.....	29
4.6.1	Nanociencia.....	29
4.6.2	Nanotecnología	29
4.6.3	Nanobiotecnología	30
4.6.4	Nanomateriales.....	31
4.6.5	Aplicaciones de la Nanotecnología en Medicina	32
4.7	Introducción a las Nanopartículas	33
4.7.1	Técnicas de Producción de Nanopartículas	34
4.7.2	Condensación por Vapor	34
4.7.3	Síntesis Química.....	34
4.7.4	Procesos en Estado Sólido	35
4.7.5	Biosíntesis de Nanopartículas	35
4.7.6	Aplicaciones de las Nanopartículas.....	36
4.7.7	Las Nanopartículas de Plata como Agentes Antimicrobianos.....	37
5.	MÉTODOS	40
5.1	Material Biológico.....	40
5.1.1	Cepas Bacterianas	40
5.1.2	Conservación de Cepas Bacterianas.....	40
5.1.3	Procedimientos Previos a cada Ensayo	41
5.1.3.1	Preparación de la Campana de Flujo Laminar	41
5.1.3.2	Activación de Cepas Bacterianas	41
5.2	Preparación de Medios de Cultivo	41
5.3	Preparación de Reactivos.....	42
5.3.1	Reactivo de MTT	42
5.3.2	Reactivo de Trabajo para el Ensayo de MTT Bioluminiscencia	42
5.4	Determinación de la CIM de NPP por Método de Dilución en Tubo	43
5.4.1	Activación de Cepas Bacterianas	43
5.4.2	Preparación de Diluciones Seriadas de NPP.....	43
5.4.3	Preparación del Inóculo Bacteriano e Inoculación.....	44
5.4.4	Lectura e Interpretación de Resultados	44

5.5	Determinación de la CIM por el Método de Microdilución en Placa	44
5.5.1	Activación de Cepas Bacterianas	44
5.5.2	Preparación de Diluciones Seriadas de NPP.....	45
5.5.3	Preparación del Inóculo e Inoculación	45
5.5.4	Lectura e Interpretación de Resultados	45
5.6	Pruebas de Inhibición a Diferentes Concentraciones Bacterianas	46
5.6.1	Preparación de Diluciones Seriadas de NPP.....	46
5.6.2	Preparación de Inóculos Bacterianos e Inoculación.....	46
5.7	Determinación de la CBM de NPP por el método de la Capacidad formadora de colonias	47
5.8	Determinación de la CBM de NPP utilizando Pruebas de Viabilidad Celular Bacteriana	48
5.8.1	Ensayo Colorimétrico de MTT	49
5.8.1.1	Curva de linealidad del método.....	49
5.8.1.2	Determinación de la CBM de NPP	50
5.8.2	Ensayo de Bioluminiscencia.....	51
5.8.2.1	Curva de linealidad del método.....	52
5.8.2.2	Determinación de la CBM de NPP	52
5.9	Curvas de Muerte Bacteriana de las cepas Tratadas con NPP	53
5.9.1	Activación de Cepas Bacterianas	53
5.9.2	Preparación de Diluciones Seriadas de NPP.....	53
5.9.3	Preparación del Inóculo bacteriano	53
5.9.4	Cinética de Crecimiento de la Cepas Bacterianas con y sin Tratamiento.....	53
5.10	Determinación de CBM de NPP y Vancomicina sobre MRSA.....	54
5.11	Análisis Estadístico	54
6.	RESULTADOS.....	55
6.1	CIM de NPP sobre MRSA.....	55
6.2	CBM de NPP sobre MRSA.....	56
6.2.1	CBM de NPP sobre MRSA por el Método de la Capacidad Formadora de Colonias	57
6.2.2	CBM de NPP sobre MRSA por el Método de MTT	59
6.2.3	CBM de NPP sobre MRSA por el Método de Bioluminiscencia	61
6.3	Efecto Antibacteriano de NPP sobre diferentes Concentraciones de MRSA	63
6.4	Cinética de crecimiento de MRSA.....	68

6.5	Curvas de Muerte Bacteriana de MRSA tratado con NPP	69
6.6	Efecto Bactericida de NPP y Vancomicina sobre MRSA	71
6.7	CIM de NPP sobre SPRE por el método de microdilución en placa	72
6.8	CBM de NPP sobre SPRE por el método de MTT	72
6.9	CBM de NPP sobre SPRE por el método de Bioluminiscencia	74
6.10	CIM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el método de Microdilución en placa.....	75
6.11	CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el método de MTT.....	75
6.12	CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el Método de Bioluminiscencia	77
6.13	CIM de NPP sobre PAMR por el método de microdilución en placa.....	78
6.14	CBM de NPP sobre PAMR por el método de MTT.....	78
6.15	CBM de NPP sobre PAMR por el método de Bioluminiscencia.....	80
6.16	Efecto Bactericida de NPP sobre diferentes concentraciones de PAMR	81
7.	DISCUSIÓN	83
8.	CONCLUSIONES	87
9.	PERSPECTIVAS	88
	LITERATURA CITADA.....	90
	RESUMEN BIOGRÁFICO	96

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Concentraciones Bacterianas utilizadas en el Ensayo 5.7	47
II. Proliferación de Diferentes inóculos de MRSA después de 24 horas de tratamiento con NPP	63
III. Efecto Antibacteriano de NPP sobre diferentes Concentraciones de MRSA después de 24 horas de tratamiento	64
IV. Efecto Antibacteriano de NPP sobre diferentes Concentraciones de MRSA después de 48 horas de tratamiento	65
V. Efecto Antibacteriano de NPP sobre diferentes Concentraciones de PAMR después de 24 horas de tratamiento	81

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Datos Estadístico del CDC sobre MRSA hasta el 2003	15
2. Reacción de Luciferasa.....	51
3. CIM de NPP sobre MRSA por Dilución en Tubo	55
4. CIM de NPP sobre MRSA por Microdilución en Placa.....	56
5. Inhibición de la Capacidad Formadora de Colonias de MRSA por NPP.....	57
6. Recuento de Colonias de MRSA previamente tratadas con NPP	58
7. Relación entre el número de UFC de MRSA con la D.O. del Azul de Formazán	59
8. Porcentaje de Viabilidad celular de MRSA tratado con NPP por el método de MTT.....	60
9. Relación entre el número de UFC de MRSA viables y la Señal Luminiscente.....	61
10. Porcentaje de Viabilidad celular de MRSA tratado con NPP por el Método de Bioluminiscencia.....	62
11. Proliferación en Medio Líquido de diferentes Inóculos de MRSA tratados con NPP durante 24 horas.....	66
12. Proliferación en Medio Líquido de diferentes inóculos de MRSA tratados con NPP durante 48 horas.....	67
13. Cinética de Crecimiento de MRSA.....	68
14. Curvas de Muerte Bacteriana de MRSA tratado con NPP	70
15. CBM de NPP y Vancomicina sobre MRSA	71
16. Relación entre el número de UFC de SPRE y la D.O. del Azul de Formazán	73
17. CBM de NPP sobre SPRE por el método de MTT	73

18. CBM de NPP sobre SPRE por el método de Bioluminiscencia.	74
19. Relación entre el número de UFC de ECO157: H7-RA y la D.O. del Azul de Formazán.	75
20. CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el método de MTT	76
21. CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el Método de Bioluminiscencia	77
22. Relación del número de UFC de PAMR y la D.O. del Azul de Formazán	78
23. CBM de NPP sobre PAMR por el método de MTT	79
24. CBM de NPP sobre PAMR por el método de Bioluminiscencia.....	80
25. Efecto bactericida de NPP sobre diferentes concentraciones de PAMR después de 24 horas de tratamiento	82

NOMENCLATURA

Ag+	Iones Plata
ATP	Adenosina Trifosfato
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CDC	Control Disease Center
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
DO	Densidad Óptica
ECO157:H7-RA	<i>Escherichia coli</i> O157-H7 Resistente a Ampicilina
° C	Grados Celsius
LB	Luria Bertani
µg	Microgramos
Mg ++	Iones Magnesio
ml	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
MTT	(4,5 dimethyliazol-2-il)-2,5 diphenil tetrazolium Bromide
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPP	Nanopartículas de Plata
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMR	<i>Pseudomona aeruginosa</i> multirresistente
RUL	Unidades Relativas de Luminiscencia
SPRE	<i>Streptococcus pyogenes</i> Resistente a Eritromicina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

La emergencia de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos constituye un problema de distribución mundial y cada vez es más difícil combatir a este tipo de microorganismos, por esta razón surge la necesidad de encontrar otras alternativas para el tratamiento de estas infecciones. En base a las propiedades bactericidas de los compuestos de plata (Ag^+) ampliamente conocidas y a las características físicas y químicas únicas que presentan los materiales obtenidos por Nanotecnología (nanomateriales), varias investigaciones han reportado las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata. En este trabajo se determinó el efecto bactericida de las nanopartículas de plata (NPP) sobre bacterias resistentes a los antibióticos *in vitro*, se utilizaron cuatro cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA), *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina (SPRE), *Escherichia coli* O157: H7 resistente a Ampicilina y *Pseudomona aeruginosa* multirresistente. La CIM de estos compuestos sobre cada bacteria fue determinada por el método de dilución en tubo y el de microdilución en placa, la CBM fue establecida a través del método de la capacidad formadora de colonias (CFC) y las pruebas de viabilidad celular de MTT y Bioluminiscencia. Los resultados obtenidos mostraron un efecto bactericida de las nanopartículas de plata sobre las cuatro cepas bacterianas independientemente de su resistencia a los antibióticos a una concentración mínima de 25 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de las bacterias Gram positivas y de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ para las bacterias Gram negativas, el efecto antibacteriano fue dependiente de la concentración de NPP utilizadas y del número de UFC bacterianas que se expusieron a ellas, como se esperaba a menores concentraciones bacterianas menores concentraciones de NPP fueron necesarias para producir un efecto bactericida. Entre 2 y 8 horas de tratamiento fueron suficientes para conseguir el 100% de inhibición del inóculo estandarizado de MRSA con 100, 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP respectivamente. Finalmente el efecto bactericida de las NPP sobre MRSA fue comparado con el de la Vancomicina, cuya diferencia entre ellos fue significativa ($P < 0.05$).

ABSTRACT

The emergency of antibiotic-resistant strains constitutes a world problem and the combat against these microorganisms is more difficult today, that's why to find others alternatives therapies is very necessary. In base of many researches it is known the silver (Ag⁺) has bactericidal properties and the materials obtained by Nanotechnology (nanomaterials) present unique physical and chemical properties. In addition the antibacterial properties of silver nanoparticles had been reported in a lot of scientific articles. The *in vitro* bactericidal effect of Silver Nanoparticles against antibiotic-resistant bacteria was determined in this thesis, four bacterial strains were used: methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), erythromycin resistant *Streptococcus pyogenes* (ERSP), ampicillin resistant *Escherichia coli* O157: H7 and multidrugs-resistant *Pseudomona aeruginosa*. In order to determine the MIC of silver nanoparticles against each strain, the macro-dilution in tube and micro-dilution in plaque methods were used, the MBC was determined estimating the number of bacteria on a solid surface and the cell viability after treatment was established using the MTT and Bioluminescence assays. The results showed a bactericidal effect of silver nanoparticles against the four bacteria proved, this effect was independent of resistance features to antibiotics, the minimum bactericidal concentration was 25 µg/ml and 12.5 µg/ml for Gram positives and Gram negatives bacteria respectively, the antibacterial effect was dependent as the concentration of nanoparticles as number of UFC used, how was expected for fewer bacterial concentrations, fewer concentrations of silver nanoparticles were used in order to get a bactericidal effect. The results obtained in the bacterial death curves showed that between two and eight hours of incubation were enough for getting 100% of inhibition of standardized inoculums of MRSA with 100, 50 and 25 µg/ml of nanoparticles respectively. Finally the bactericidal effect of silver nanoparticles was compared with vancomicine and the results found were significantly different (P<0.05).

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo tecnológico pone a nuestro alcance herramientas que nos permiten buscar soluciones a una diversidad de problemas que aquejan a la humanidad, el descubrimiento de los antibióticos en 1940 constituyó uno de los acontecimientos más importantes en la historia de la medicina, su uso ha permitido el tratamiento de las enfermedades infecciosas desde aquel tiempo hasta nuestros días. Sin embargo a lo largo de los años muchos factores principalmente la capacidad de adaptación de las bacterias y el uso indiscriminado o inadecuado de los agentes antimicrobianos han conducido al desarrollo de resistencia y a la emergencia de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos que ya no responden a las terapias con antibióticos comunes.

Este hecho constituye un problema de salud pública de distribución mundial el cual además tiene implicaciones importantes desde el punto de vista económico y social. De acuerdo a datos publicados por el Centro de Control de Enfermedades en el 2004 se sabe que:

- Cerca de 2 millones de pacientes en los Estados Unidos contraen una infección en el hospital cada año.
- De estos pacientes, alrededor de 90.000 mueren cada año como resultado de la sobreinfección.
- Más del 70 por ciento de las enfermedades adquiridas en los hospitales son resistentes por lo menos a uno de los antibióticos comúnmente usados para tratarlas.
- Las personas infectadas con microorganismos resistentes a antibióticos, tienden a permanecer por más tiempo en los hospitales y requieren un tratamiento con dos o tres antibióticos que puede resultar menos efectivo, más tóxico y más caro.

Entre las bacterias resistentes a antibióticos más comúnmente aisladas en los hospitales se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y más recientemente *Acinetobacter*, por otro lado se encuentran las bacterias multirresistentes que producen enfermedades infecciones adquiridas en la comunidad como *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes*. (CDC, 2004).

Las investigaciones dirigidas a la búsqueda de otras alternativas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas incrementan cada día y es enorme el número de compuestos cuyas propiedades antibacterianas están siendo evaluadas. Los materiales sintetizados por Nanotecnología (nanomateriales) tales como nanotubos, nanoalambres, nanocápsulas, dendrímeros, nanoemulsiones y nanopartículas tienen hoy en día muchas aplicaciones en diferentes áreas, muchos de ellos se han podido combinar con sistemas biológicos para ser utilizados como sistemas liberadores de fármacos, el uso de algunos de estos materiales como agentes antibacterianos ha despertado el interés de muchos investigadores, constituyéndose actualmente en una línea de investigación muy novedosa.

Las nanopartículas de plata constituyen el objeto de estudio de este trabajo, estos nanomateriales tienen actualmente muchas aplicaciones debido a las propiedades inherentes a su tamaño, principalmente un incremento en la relación de superficie con respecto a volumen, por otra parte el hecho de que la plata posee propiedades antimicrobianas conocidas desde hace mucho tiempo, hace factible su utilización como agente antibacteriano en materiales cerámicos, catéteres y otros. El interés de este trabajo radica en probar el efecto bactericida de las Nanopartículas de Plata sobre bacterias resistentes a ciertos antibióticos como: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina, *Escherichia coli* O157:H7 resistente a Ampicilina y *Pseudomona aeruginosa* multirresistente como patógenos comúnmente aislados en los hospitales y que representan un problema de salud pública a nivel mundial.

2. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata tienen un efecto bactericida contra bacterias resistentes a los antibióticos favorecidas por sus propiedades en la escala nanométrica que les confiere una mayor capacidad de reacción con las células bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata sobre bacterias resistentes a los antibióticos por ensayos *in vitro*.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) de nanopartículas de plata sobre bacterias resistentes a antibióticos *in vitro*.
2. Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CBM) de nanopartículas de plata sobre bacterias resistentes a antibióticos *in vitro*.
3. Determinar el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre diferentes concentraciones de las cepas bacterianas.
4. Determinar la viabilidad celular de las bacterias después del tratamiento con nanopartículas plata por el método de MTT y de bioluminiscencia.
5. Determinar el tiempo mínimo de tratamiento necesario para conseguir el efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre bacterias resistentes a los antibióticos, mediante curvas de muerte bacteriana.

4. ANTECEDENTES

4.1 El Desarrollo de la Resistencia a los Antimicrobianos

La década de la resistencia a los antimicrobianos comenzó en el año 1990 cuando se presentaron los primeros reportes de este acontecimiento. Antes de que esto sucediera, los médicos le habían restado importancia a las cepas bacterianas causantes de enfermedades que presentaban resistencia a antibióticos, debido a que en todos los casos aún existían muchos antibióticos que podían utilizarse contra ellas. El hecho de recurrir a un segundo antibiótico para tratar una enfermedad infecciosa era considerado un tratamiento fallido. Gradualmente, la definición de falla en el tratamiento cambió a falla para encontrar un antibiótico exitoso después de probar varios antibióticos. Sin embargo, en algunos casos, los pacientes con infecciones sistémicas serias sufrían daños irreversibles a diferentes órganos o derrame cerebral debido a que la infección no era controlada lo suficientemente rápido para evitarlo.

Probablemente los primeros en publicar hechos relacionados con la resistencia a los antibióticos fueron las compañías de seguro y las organizaciones de mantenimiento de la salud. Las infecciones causadas por bacterias eran muy costosas no solamente para los gobiernos locales sino también para los estatales. A la ciudad de New York le costó cerca de un billón de dólares controlar el brote de tuberculosis mutirresistente a drogas que se produjo a mediados de 1990. En este mismo momento, la Cámara de Comercio de New York aprobó que los legisladores estatales estuvieran al tanto que lo que estuviera haciendo sobre la resistencia a antibióticos. Aún en ausencia de una epidemia de categoría alta, los negocios perdieron mucho dinero debido a que los empleados faltaban varios días de trabajo y el costo de los seguros de salud era bastante alto y el problema parecía no tener final.

Los titulares como “El fin de los Antibióticos” y “El regreso a la Era Pre-antibiótica” empezaron a salir en las nuevas revistas y el contenido de estos artículos era sensacionalista y escalofriante. Los medios posteriormente descubrieron el uso difundido de antibióticos en la agricultura, y el posible impacto de este uso en la salud humana comenzó a ser el punto de discusión de nuevos artículos y programas de televisión. Los grupos que apoyan el medio ambiente comenzaron a considerar el uso de antibióticos y la resistencia a antibióticos un hecho sobre el que necesitaban tomar parte. Las sociedades humanas se involucraron porque sus miembros se dieron cuenta que restringir severamente el uso de antibióticos en la agricultura podría forzar a una higiene desmejorada y reducir las facilidades de producción de varios animales.

Irónicamente, el único grupo que parecía estar a un lado del crecimiento de la conciencia del problema fue la comunidad científica. Muchos científicos pensaron que los intensos esfuerzos de investigación montados en 1980 para definir los mecanismos de resistencia a antibióticos y caracterizar los elementos transmisibles que acarreaban los genes de resistencia a antibióticos no había cubierto todo lo que valía la pena conocer sobre las bacterias resistentes a los antibióticos.

El campo de investigación sobre la resistencia a antibióticos comenzó a ser visto como algo que había pasado de moda y el número de científicos que continuaban trabajando en esa área declinó a niveles muy bajos.

Desafortunadamente, un gran número de preguntas importantes quedaron sin responder. Cuando los cocos Gram positivos comenzaron a ser importantes como la causa más seria de infecciones humanas, se hizo evidente que no se conocía nada de su mecanismo de resistencia o sobre su mecanismo de transferencia de genes de resistencia. Por otra parte, muchas de las preguntas que empezaban a ser dominantes en los debates sobre patrones de uso de antibióticos y posibles estrategias preventivas en la medicina humana y la agricultura llevaban a hacer cuestionamientos sobre la ecología de las bacterias resistentes a los antibióticos y sus genes.

En el 2001, los Institutos Nacionales de Salud, el CDC y otras agencias estatales anunciaron una fuerte tarea combinada para la publicación sobre resistencia antimicrobiana, un esfuerzo que puede ayudar a resolver el problema de la resistencia (Salyers y Whitt, 2002). La OMS y la FDA han puesto en marcha programas destinados a la detección temprana de cepas resistentes y a promover el uso adecuado de los antimicrobianos para tratar de frenar este problema. (Kardar, 2005).

4.2. Mecanismos de Resistencia a Antibióticos

Los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden estar agrupados en 4 categorías principales:

1. Restricción del acceso del antibiótico a su blanco.
2. Inactivación Enzimática del antibiótico.
3. Bombeo activo del antibiótico (efecto Efflux).
4. Modificación o protección del blanco del antibiótico.

4.2.1 Restricción de Acceso del Antibiótico a su Blanco

Las bacterias pueden limitar el acceso de los antibióticos hacia su blanco de diferentes maneras:

4.2.1.1 Porinas de la membrana externa.

La mayoría de los antibióticos primero llegan a su blanco para tener un efecto. Los antibióticos β -lactámicos deben transitar la membrana externa de las bacterias Gram negativas para llegar al citoplasma en donde están localizadas las proteínas de unión a penicilinas (PBPs). La presencia de la membrana externa en las bacterias Gram negativas puede funcionar como barrera para evitar la entrada de los antibióticos, precisamente la razón por la que la Vancomicina, que es muy efectiva contra las bacterias Gram positivas, no tiene efecto en las Gram negativas es que se trata de una molécula demasiado grande como para difundir a través de las porinas de la membrana externa de estas bacterias.

La ventaja natural que las porinas le dan a las bacterias Gram negativas puede incrementar por mutaciones que limiten en mayor grado la difusión de los antibióticos, y ya que algunos tipos de porinas son relativamente no selectivas, una mutación simple en ellas puede conferir resistencia a más de un tipo de antibióticos (Salyers y Whitt, 2002).

4.2.1.2 Paso Reducido a Través de la Membrana Citoplasmática

Un camino obvio que le permite a la bacteria resistir la acción de un antibiótico cuyo blanco se encuentra en el citoplasma (ribosomas o ADN girasa) es reducir el transporte del antibiótico a través de la membrana citoplasmática. Todavía es un mecanismo de resistencia poco común. Interesantemente en algunos casos como la *Escherichia coli* se ha observado que su crecimiento en condiciones anaerobias incrementa la resistencia a los aminoglucósidos hasta 10 veces y muchos microorganismos anaerobios son totalmente resistentes a estos antibióticos. En ambos casos, la resistencia probablemente sea debida a la drástica reducción del paso del antibiótico al interior de la célula (Salyers y Whitt, 2002).

4.2.2 Inactivación Enzimática del Antibiótico.

4.2.2.1 β -Lactamasas.

El mecanismo más importante de resistencia a los antibióticos β -lactámicos, especialmente en bacterias Gram negativas, es la presencia de β -lactamasa, una enzima que rompe el anillo β -lactámico e inactiva el antibiótico. Las β -lactamasas son secretadas en el espacio periplásmico por las bacterias Gram negativas y dentro del fluido extracelular por las bacterias Gram positivas.

Debido a que las bacterias Gram negativas tienen sus β -lactamasas en el espacio periplásmico y además presentan en la membrana externa porinas que restringen la entrada de los antibióticos pueden lograr el mismo nivel de resistencia con un menor nivel de enzima que las bacterias Gram positivas.

A diferencia de las mutaciones en las porinas, que pueden conferir resistencia a muchos antibióticos diferentes, las β -lactamasas pueden ser mucho más específicas y son usualmente activas sólo contra un grupo de antibióticos β -lactámicos. La principal razón por la que ahora existe un gran número de β -lactámicos en el mercado es la necesidad de nuevos antibióticos de este tipo que no sean clivados por β -lactamasas. Una estrategia para contrarrestar la acción de las β -lactamasas es mezclar el antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasas, tales como el ácido clavulánico y el Sulbactam. En general los inhibidores de β -lactamasas tienen un amplio espectro de acción y han hecho posible que se utilicen nuevamente muchos β -lactámicos como la Ampicilina que estaban en riesgo de convertirse en obsoletos. Sin embargo, ahora existen β -lactamasas que son resistentes a la inhibición tanto del ácido clavulánico como del sulbactam.

Recientemente ha sido reportado otro mecanismo bacteriano para la resistencia a la mezcla de ácido clavulánico y β -lactámico, se trata de un gen cromosomal que codifica β -lactamasa que fue duplicado muchas veces para proveer un nivel mucho mayor de producción de enzima (Salyers y Whitt, 2002).

4.2.2.2 Enzimas Modificadoras de Aminoglucósidos

El principal mecanismo de resistencia a los aminoglucósidos es la inactivación del antibiótico. En este caso las enzimas modifican al aminoglucósido por adición de grupos (fosforil, adenil o acetil) al antibiótico y de esta manera lo inactivan. En las bacterias Gram negativas las enzimas modificadoras de aminoglucósidos se cree que están localizadas en el exterior de la membrana citoplasmática y por lo tanto la modificación de los antibióticos reduce su transporte dentro de la célula. La localización de estas enzimas en las bacterias Gram positivas no ha sido establecida, pero deben estar ya sea liberadas dentro del fluido extracelular o ligadas a la membrana citoplasmática. Entre estas enzimas se encuentran la cloranfenicol acetil-transferasa, la estreptogramina acetil-transferasa y últimamente la oxidasa de tetraciclinas.

4.2.3 Expulsión Activa del Antibiótico

Muchos antibióticos habitualmente usados inhiben la síntesis de proteínas, para que estos antibióticos actúen, deben ingresar al citoplasma celular y acumularse a una concentración suficiente que les permita unirse a los ribosomas.

Una estrategia bacteriana que previene que los antibióticos consigan una concentración suficientemente alta en el citoplasma es bombear el antibiótico fuera del citoplasma tan rápidamente como es captado por la célula. Estas bombas proteicas son llamadas bombas de expulsión (efflux pumps). Este mecanismo media la resistencia de las bacterias a varios antibióticos como las tetraciclinas, macrólidos y quinolonas.

4.2.4 Modificación o Protección del Blanco del Antibiótico

4.2.4.1 Resistencia a β -lactámicos.

La alteración del blanco de los antibióticos es un segundo mecanismo de resistencia a los β -lactámicos, en este caso, la especificidad de unión de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) se altera de tal manera que no pueden unirse al antibiótico. Este tipo de resistencia es particularmente común en bacterias Gram positivas y es usualmente el tipo de resistencia a β -lactámicos que causa la mayoría de los problemas clínicos y los inhibidores de β -lactamasas no pueden evitar esta resistencia. Probablemente el gen de este tipo de resistencia más caracterizado es el *mecA*, un gen que codifica la resistencia a la meticilina que se encuentra en el *Staphylococcus aureus*. Este gen codifica una proteína de unión a β -lactámicos mutante (también llamada proteína de unión a penicilina 2, o PBP2) que no es inhibida por la meticilina como son las proteínas de unión a penicilina de las bacterias normales. Aparentemente esta nueva proteína reemplaza la transpeptidasa normal y permite que ocurra la unión cruzada del peptidoglucano en presencia del antibiótico β -lactámico.

4.2.4.2 Resistencia a Antibióticos Glicopéptidos.

Ya que la vancomicina previene el entrecruzamiento de peptidoglicano uniéndose al D-Ala-D-Ala del muramil-péptido (NAM), una estrategia obvia para la resistencia a este antibiótico es reemplazar este dipéptido con otro grupo que no se una a la vancomicina. La mayoría de las bacterias Gram positivas que se han convertido en resistentes a la vancomicina reemplazan el D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lactato, el cual no se une al antibiótico. Existen tres tipos de enzimas necesarias para este fenotipo de resistencia, una es codificada por *vanA* o *vanB* que codifica una ligasa que tiene la función de formar el dipéptido D-Ala-D-Lactato a partir de un residuo D-Ala y otro de D-lactato, un segundo gen, *vanH*, codifica una lactato deshidrogenasa que obtiene el lactato del piruvato. Estas dos enzimas hacen posible que la bacteria fabrique la parte sustituta del muramil dipéptido, pero tan pronto como la bacteria produce la forma original D-Ala-D-Ala, la bacteria recuperaría la susceptibilidad a la vancomicina. Aquí es donde el tercer gen, *vanX*, participa. Este gen codifica una enzima que rompe el dipéptido D-Ala-D-Ala pero no el D-Ala-D-Lactato. El mecanismo de resistencia a la vancomicina es el más complejo que se conoce y muestra como el ingenio de la bacteria puede actuar cuando va a protegerla de los antibióticos.

4.2.4.3 Resistencia a Tetraciclinas.

Un segundo tipo de resistencia a tetraciclina clínicamente importante, llamado protección de ribosoma, es conferido por una proteína citoplasmática que de alguna manera protege a los ribosomas de las tetraciclinas.

Cuando la proteína está presente, la tetraciclina no se une al ribosoma, aunque no está claro cuál es la proteína de resistencia, parece que se trata de una modificación no covalente del ribosoma. Una característica interesante de este tipo de proteína de resistencia es que tiene una actividad GTPasa y comparte alta similitud de aminoácidos en la región amino terminal con factores de elongación involucrados en la síntesis de proteínas.

4.2.4.4 Resistencia a Macrólidos, Estreptograminas y Lincosamidas.

Una enzima que metila una adenina sobre rRNA 23S media este tipo ampliamente difundido de resistencia a macrólidos, estreptograminas y lincosamidas. Esta enzima es llamada rRNA metilasa, la adenina metilada se extiende dentro de una región que sirve como sitio de unión para los tres tipos de antibióticos. Por lo tanto la adquisición de un gen de resistencia simple confiere resistencia a tres clases de antibióticos estructuralmente distintos. Este tipo de resistencia ha sido encontrada en cocos Gram positivos y en el grupo *Bacteroides*.

4.2.4.5 Resistencia a Quinolonas y Rifampicina.

La resistencia a quinolonas comúnmente involucra mutaciones puntuales que alteran la afinidad de la subunidad B de la ADN girasa para el antibiótico. Aunque las mutaciones de ADN girasa están en un gen esencial, no parecen tener efectos deletéreos en el crecimiento de las bacterias. Similarmente, la resistencia a rifampicina resulta de mutaciones en la ARN polimerasa que reduce la afinidad de la enzima por el antibiótico.

4.3 Emergencia de Bacterias Resistentes

4.3.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados tanto en infecciones comunitarias como nosocomiales. Puede producir desde infecciones banales hasta cuadros muy graves como septicemia, meningitis, endocarditis, neumonías, etc. que en muchas ocasiones conducen a la muerte del enfermo. Además se estima que entre el 20 y 40% de los adultos sanos son portadores nasales de esta bacteria. (Torroba *et al.*, 1999).

La colonización de nasofaringe, perineo y piel particularmente si la barrera cutánea ha sido dañada puede ocurrir después del nacimiento y puede reaparecer algún tiempo después. La familia de un infante que porta la bacteria también puede estar colonizada, la transmisión se produce por contacto directo con el portador colonizado. Una proporción de portadores superior en 25 a 50% que las proporciones de la población en general se encuentra en aquellas personas que usan drogas intravenosas, los pacientes diabéticos insulino-dependientes, pacientes con alteraciones dermatológicas, pacientes con catéteres intravasculares de largo plazo y trabajadores de salud . Los niños pequeños tienden a tener mayores razones de colonización, probablemente por su frecuente contacto con las secreciones respiratorias (Chambers *et al*, 2001).

La penicilina sigue siendo el tratamiento de elección para las infecciones por *Staphylococcus aureus* sensible a este antibiótico, no obstante, en 1944 poco después de la introducción de este fármaco, el microorganismo empezó a producir β -lactamasas que inactivaban la penicilina conduciendo a resistencia. Aunque inicialmente este tipo de resistencia se presentaba esporádicamente, se propagó rápidamente y hoy en día se puede observar que sólo el 5% de las cepas de *S. aureus* son sensibles a la penicilina.

Para poder solucionar ese problema la industria farmacéutica desarrolló nuevos antibióticos y entre 1960- 1964 se empezó a disponer de penicilinas resistentes a las β -lactamasas como la meticilina, cloxacilina, etc. Otros β -lactámicos como las cefalosporinas de primera generación (cefazolina, cefalotina, etc.) son efectivos contra *S. aureus*, así como las combinaciones de inhibidores de β -lactamasas con β -lactámicos (amoxicilina-clavulánico, ticarcilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam) y el imipenen.

Las penicilinas semisintéticas como la nafticilina, la oxacilina y la cloxacilina son ahora antibióticos de primera elección en las infecciones por *S. aureus* sensible a meticilina u oxacilina (Torroba *et al.*, 1999).

Los primeros reportes de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) se realizaron en 1961, el mecanismo de resistencia consiste en la producción de una proteína de unión a penicilina adicional PBP2 o PBPa, que es codificada por el gen *mecA*, el cual está presente en las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina y ausente en las cepas sensibles (Brown *et al.*, 2001).

En la década de 1970-1980 las cepas de MRSA empezaron a causar problemas de salud en todo el mundo. En Estados Unidos la proporción de casos de MRSA comunicados al NNIS (Nacional Nosocomial Infections Surveillance) incrementó del 2% en 1975 a 35% en 1996. En Japón encontraron que el 60% de 7000 cepas de *S. aureus* aisladas entre 1992-1993 eran MRSA. Se estima que el 25% de las cepas de *S. aureus* aisladas en Estados Unidos son MRSA. En Europa la prevalencia varía mucho de un país a otro, siendo superior en los países del sur y en Irlanda (Torroba *et al.*, 1999).

En las dos décadas pasadas, la prevalencia de cepas de MRSA ha incrementado constantemente en los hospitales de Estados Unidos y de otros países. Los datos recolectados por el CDC en 1980 indicaban que el MRSA estaba limitado principalmente a centros médicos urbanos relativamente grandes y las proporciones se encontraban entre 5% y 10% y los centros más pequeños estaban relativamente libres de MRSA. Para 1990 las proporciones en los hospitales comunitarios pequeños han incrementado a 20% y el doble de este porcentaje se encontró en los centros urbanos grandes. Los datos del NNIS indican que estos valores van creciendo, con una prevalencia de MRSA aislados de unidades de terapia intensiva de 50% para finales de 1998 (Chambers *et al.*, 2001).

Las proporciones de MRSA en las unidades de terapia intensiva han incrementado significativamente desde un 30% en 1989 hasta un 60% en el 2003 según datos del NNIS.

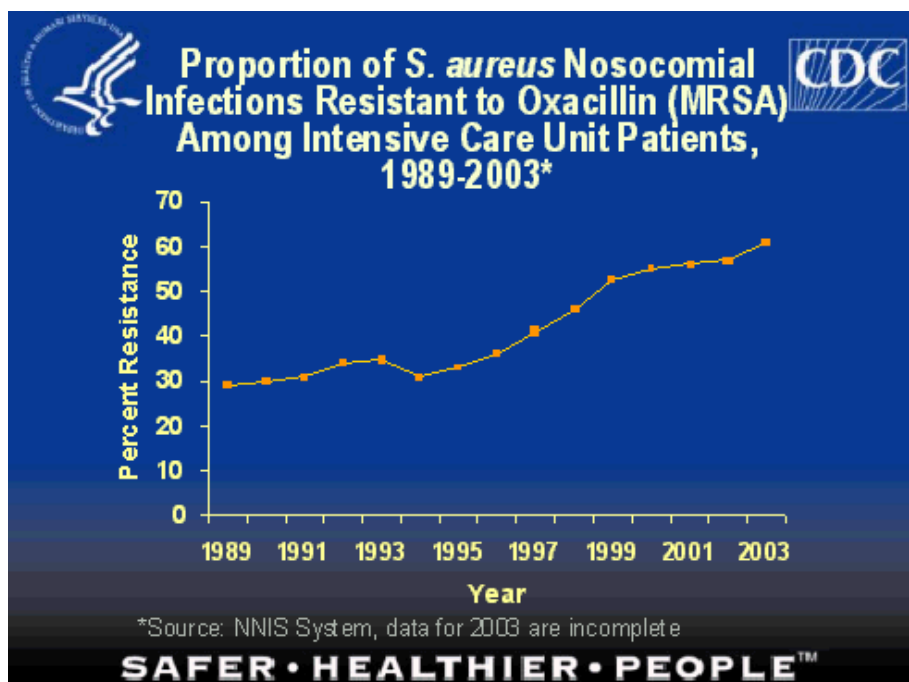


Figura 1. Datos estadísticos del CDC sobre MRSA hasta el 2003.

La resistencia a meticilina suele asociarse, aunque no siempre, con resistencia a otros antibióticos antiestafilocócicos no β -lactámicos como macrólidos, clindamicina, fluoroquinolonas, entre otros. Hasta la fecha la vancomicina ha sido el tratamiento de elección en las infecciones graves producidas por MRSA.

Tradicionalmente las infecciones producidas por MRSA, como infecciones urinarias, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones sistémicas y neumonía, se adquieren casi de manera exclusiva en hospitales por la permanencia prolongada en estas instituciones. Los factores de riesgo para la colonización o infección por MRSA incluyen: terapia previa con antibióticos, admisión a una unidad de terapia intensiva, cirugías y exposición a pacientes colonizados con MRSA como ocurre con el personal que trabaja en los centros de salud como médicos enfermeras, etc. (Chambers, 2001. CDC, 2005).

Por otra parte las infecciones por MRSA también pueden adquirirse en la comunidad sin que existan factores de riesgo como los mencionados anteriormente, se manifiestan usualmente como infecciones de piel, tales como granos (acné), forúnculos, abscesos, etc. Datos correspondientes a estudios prospectivos en 2003, sugieren que el 12% de las infecciones clínicas producidas por MRSA están asociadas a la comunidad, pero este porcentaje puede variar según la región geográfica y la población (CDC, 2005).

4.3.2 *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina (SPRE)

El *Streptococcus pyogenes* (estreptococo β -hemolítico del grupo A) es uno de los patógenos más importantes de los seres humanos, es la causa más frecuente de infecciones del tracto respiratorio superior como faringitis aguda y también origina distintas infecciones cutáneas y sistémicas. Ocupa un lugar importante en la microbiología médica debido a las secuelas que pueden quedar después de la infección por *S. pyogenes* como la fiebre reumática aguda que ha sido causa de incapacidad y mortalidad en todo el mundo, y la glomerulonefritis aguda postestreptocócica (Aracil y Alós, 2000; Malhotra-Kumar, 2005).

El tratamiento de elección es la penicilina, su eficacia clínica se basa en la excelente sensibilidad que presentan a este antibiótico todas las cepas del agente causal, sin embargo debido a que un buen número de casos presentan hipersensibilidad a la penicilina es descartada por los médicos para el tratamiento, por otra parte, el fracaso terapéutico con penicilina ha ido incrementando gradualmente desde 1958 y esto ha conducido al uso de otros antibióticos de mayor espectro como los macrólidos (Aracil y Alós, 2000).

Los macrólidos se consideran el tratamiento alternativo en la faringoamigdalitis estreptocócica, donde han demostrado ser tan eficaces como las penicilinas. Estos antibióticos se clasifican, según el número de átomos de su núcleo estructural, en macrólidos de 14, 15 y 16 átomos.

De los de 14 átomos, son representantes la eritromicina, claritromicina, roxitromicina y diritromicina; de los 15 átomos, la azitromicina, y de los de 16, la miocamicina, josamisina y espiramicina (Aracil y Alós, 2000).

El problema de las infecciones causadas por esta bacteria es el incremento de la resistencia a los macrólidos, que comúnmente son usados para este tratamiento. El *Streptococcus pyogenes* adquiere resistencia por dos principales mecanismos.

En el primer mecanismo el gen *erm(A)* o *erm(B)* (erythromycin ribosomal methylase) codifica una metilasa que al expresarse dimetila el sitio de unión a macrólidos, es decir, un residuo específico de adenina del ARN ribosómico 23S, induciendo un cambio conformacional que impide la unión tanto de los macrólidos como lincosamidas y estreptobramina B (MLS). Este patrón de resistencia es demostrado ya sea por un fenotipo constitutivo (cMLS) o por un fenotipo inducible (iMLS) (Malhotra-Kumar, 2005).

El segundo es una expulsión activa del antibiótico (Efflux) mediada por un cassette transportador unido a ATP donde el gen *mef (A)* codifica los dominios transmembrana y el gen *msr (D)* codifica el dominio de unión a ATP, este patrón de resistencia está demostrado por un fenotipo M y confiere resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos y sensibilidad a los de 16 y a las lincosamidas. Un tercer mecanismo de resistencia raro es la modificación del sitio de unión sobre rRNA por mutación que es expresado por el fenotipo M o cMLS (Malhotra-Kumar, 2005).

4.3.3 *Escherichia coli* entero-hemorrágica O157:H7 resistente a Ampicilina

La *Escherichia coli* O157:H7 productora de toxina Shiga (STEC), de origen zoonótico fue reconocida por primera vez como un patógeno entérico en 1982 durante la investigación de un brote de colitis hemorrágica. La infección por esta bacteria conduce al síndrome urémico hemolítico (HUS), caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal (Rodríguez, 2002).

En 1993, después de un gran brote de *E. coli* O157:H7 asociado a carne de res mal cocinada de un restaurante chino de comida rápida, este microorganismo fue ampliamente reconocido como un patógeno importante y amenazante. En 1994 se convierte en una infección nacional notificable y para el 2000 se presentan reportes en 48 estados. Un estimado de 73,480 enfermedades debidas a una infección por *E. coli* O157:H7 ocurre cada año en los Estados Unidos, conduciendo a un número estimado de 2,168 hospitalizados y 61 muertes anualmente y es una importante causa de falla renal aguda en niños (Rangel, 2005).

Esta bacteria tiene una considerable importancia en salud pública tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siendo su principal reservorio el ganado bovino. El rango de manifestaciones clínicas debidas a la infección por STEC varía desde infección asintomática, diarrea acuosa, hasta enfermedad severa con diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (Reyes *et al.*, 2004).

Aunque los reportes de brotes incluyen solamente una minoría de casos de *E. coli* O157: H7, las investigaciones de brotes contribuyen grandemente al entendimiento de la epidemiología de este microorganismo identificando rutas de transmisión, vehículos y mecanismos de contaminación (Rangel, 2005).

Desde 1982 hasta el 2002, un total de 350 brotes fueron reportados de 49 estados, contando 8,598 casos de infecciones por *E. coli* O157: H7, dentro de los cuales se encontraron 1,493 (17.4%) hospitalizaciones, 354 (4.1%) casos de HUS y 40 (0.5%) muertes. La principal ruta de transmisión en estos casos sigue siendo la comida (Rangel, 2005).

Un factor que influye en el desarrollo de resistencia en bacterias zoonóticas es el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento en el ganado. Esta práctica produce una inevitable selección de cepas resistentes dentro de la flora comensal de tracto intestinal de los animales de crianza y puede tener una relevancia inesperada en salud pública, por la posibilidad de colonización en la población humana a través de la cadena alimenticia, o por exposición ocupacional (Reyes *et al.*, 2004).

4.3.4 *Pseudomona aeruginosa* multirresistente (PAMR)

Pseudomona aeruginosa es un bacilo Gram negativo, no fermentador, que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista, ocupa el segundo lugar de los patógenos Gram negativos reportados al Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NISS) en los Estados Unidos (Carmeli, 1999). Sus mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos explican su importancia como patógeno intrahospitalario. Aunque se ha detectado como parte de la flora normal, rara vez causa enfermedad en individuos sanos.

En la mayoría de los casos, la infección comienza con alguna alteración de los mecanismos de defensa del huésped; esto puede involucrar la disrupción en la integridad de barreras físicas como catéteres urinarios, catéteres intravenosos, quemaduras extensas de la piel o tubos endotraqueales que facilitan la colonización bacteriana. Por otro lado, existen otras situaciones propias del huésped que comprometen los mecanismos de defensa como neutropenia, inmunosupresión iatrogénica o adquirida y las patologías que cursan con deterioro del sistema inmunológico como cáncer, desnutrición y diabetes, que también son factores de riesgo para la infección. Definitivamente, la estancia hospitalaria prolongada, especialmente en unidades de cuidado intensivo (UCI) y la inadecuada selección de antibióticos son los factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes. Este hecho, convierte a la infección por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública.

La resistencia de esta bacteria a diferentes antibióticos como cefalosporinas de primera y segunda generación, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos se debe a las propiedades de su membrana celular que tiene características excepcionales de impermeabilidad constituyendo un mecanismo de resistencia intrínseca de la bacteria a una gran variedad de antibióticos (Angus *et al.*, 1982).

Por otra parte los mismos antibióticos son capaces de inducir la resistencia durante el curso del tratamiento. Otras sustancias como el zinc, componente de una clase de catéteres urinarios también inducen cambios moleculares que activan la resistencia a imipenem. Se ha evidenciado que en 10.2% de los tratamientos para *P. aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible. Esta inducción de resistencia varía según el antibiótico (Carmeli *et al.*, 1999).

Los antibióticos que se consideran con buena actividad contra *P. aeruginosa* son las penicilinas antipseudomonas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina, azlocilina) asociadas a inhibidores de β -lactamasas, ceftazidima, cefepime, monobactámicos como aztreonam, carbapenémicos (imipenem y meropenem), fluroquinolonas esencialmente ciprofloxacina y aminoglucósidos, los cuales son utilizados como parte de regímenes de combinación para el tratamiento de infecciones serias con *P. aeruginosa*, pero generalmente no son recomendados como antibióticos individuales. Sin embargo, antes el surgimiento de cepas multirresistentes a veces es necesario acudir a antibióticos que se consideran fuera de uso por su alta toxicidad como las polimixinas. Para cada uno de estos agentes la emergencia de resistencia durante la terapia ha sido descrita y es considerada una de las causas para un tratamiento fallido (Carmeli *et al.*, 1999).

Los principales mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* comprenden: presencia de β -lactamasas y alteraciones de la permeabilidad de membrana dadas por la presencia de bombas de expulsión y las mutaciones de las porinas transmembranales.

Esta bacteria presenta dos tipos de β -lactamasas: AmpC que está codificada en el cromosoma de la bacteria y tiene la capacidad de ser inducida por los propios β -lactámicos, especialmente cefalotina y ampicilina, el problema radica en que esta enzima es inducida en cuestión de días.

El segundo tipo de β -lactamasas corresponde a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que son codificadas por plásmidos, se adquieren mediante transporte de ADN extracromosomal y confiere resistencia a penicilinas y cefalosporinas.

Las β -Lactamasas más frecuentemente adquiridas por plásmidos son PSE-1 y la PSE-4. Otras BLEE incluyen la PER-1 que confiere resistencia a ceftazidima. TEM, SHV y OXA generan resistencia a monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas, pero respetan carbapenémicos.

La resistencia por bombas de expulsión es un mecanismo de resistencia identificado en *P. aeruginosa* en 1994, está mediada por un complejo enzimático codificado el operón llamado *MexA-MexB-OprM*, que se compone de una proteína que bombea en la membrana citoplasmática, una proteína ligadora en el espacio periplásmico y un canal de salida en la membrana externa. Normalmente este complejo cumple la función fisiológica de exportar pioverdina en el medio y tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria y en contra de un gradiente de concentración β -lactámicos, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim. Estos sistemas son responsables de la “impermeabilidad” o resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos (Li *et al.*, 1994, 1995; Ziha Zarifi, 1999).

Las bombas de expulsión, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacina; además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria, pueden sobreexpresar estas bombas. La sobreexpresión de *MexA-MexB-OprM*, compromete la acción de quinolonas, penicilinas, cefalosporinas e incluso meropenem. La sobreexpresión de otra bomba de expulsión *MexEF-OprN*, confiere resistencia a quinolonas y algunos β -lactámicos, que incluyen meropenem e imipenem (Srikumar, 1997).

Las porinas de *P. aeruginosa* igual que las demás bacterias Gram negativas se ubican en la membrana externa y cumplen diversas funciones, entre ellas la porina *OprD* está relacionada con la resistencia a los antibióticos. Su papel primitivo es permitir la captación pasiva de aminoácidos básicos a través de la membrana externa, se sabe además que es capaz de permitir la entrada de carbapenémicos, pero no de otros β -lactámicos.

La afinidad y capacidad de difusión de imipenem a través de esta proteína es casi 70 veces más alta que la de meropenem. Las cepas que presentan mutaciones en esta proteína muestran una resistencia a carbapenémicos (Gómez *et al.*, 2000).

4.4 La Nueva Era de los Agentes Antimicrobianos

En respuesta a la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento antimicrobiano, ha comenzado una nueva era profiláctica destinada a prevenir las infecciones bacterianas y el desarrollo de resistencia. Dentro de las estrategias conocidas hasta el momento se encuentran: la bacterioterapia en la cual la infección de bacterias patógenas se previene con el uso de bacterias comensales (probióticos), la fagoterapia que permite evitar la infección por medio de virus específicos para bacterias (fagos), por otro lado a través de la genética se ha intentado desarrollar vacunas bacterianas y también se han estudiado otros compuestos como péptidos catiónicos y péptidos cíclicos por sus efectos antibacterianos (Kardar, 2005).

4.5 Efecto antibacteriano de los compuestos de plata

4.5.1 Propiedades Antimicrobianas de la Plata

La plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas por cientos de años. Originalmente, se usaban conductos construidos con este metal para preservar el agua y su aplicación como propuesta médica está documentada desde el año 750 d.c.

El primer artículo científico que describe el uso de la plata como antibacteriano fue atribuido a Credé para la prevención de infecciones oculares en los neonatos en 1881 y como antiséptico en 1901. En 1965, Moyer *et al.* Fueron los primeros en reportar la actividad antibacteriana de compresas empapadas con nitrato de plata al 0.5%, aplicadas a quemaduras extensas. La eficacia del nitrato de plata contra *Pseudomona aeruginosa* se vio como un importante beneficio debido a que estos microorganismos eran considerados una causa primaria de muerte en pacientes heridas por quemaduras extensas (Maillard and Denyer, 2006).

Los iones de plata han sido ampliamente conocidos por tener efectos inhibitorios, bactericidas y propiedades antimicrobianas de amplio espectro. Algunas sales de plata han demostrado ser efectivas contra quemaduras, osteomielitis crónica severa, infecciones del tracto urinario e infecciones por catéteres venoso centrales (Feng *et al.*, 2000).

El más importante compuesto de plata habitualmente usado es la sulfadiazina de plata (AgSD), aunque la plata metálica y otras sales como el acetato de plata, el nitrato de plata (AgNO_3) y las proteínas de plata las cuales tienen propiedades antimicrobianas están enlistadas en *Martindale, The Extra Pharmacopoeia*. (McDonnell and Russell, 1999).

4.5.2 Nitrato de Plata

El nitrato de plata es una sal cuyo efecto antibacteriano fue reportado desde hace mucho tiempo, el mecanismo por el cual los iones de plata ejercen su efecto antibacteriano no está del todo claro, sin embargo se cree que los metales pesados reaccionan con las proteínas por combinación con los grupos sulfhidrilo (SH), lo que conduce a la inactivación de las proteínas. Otros experimentos indican que la interacción de los iones de plata (Ag^+) con los grupos tiol en enzimas y proteínas juega un rol esencial en la inactivación bacteriana (Feng *et al.*, 2000).

Liau *et al.*, demostraron en 1997 que aminoácidos como la cisteína y otros compuestos como el tioglicolato de sodio que contienen grupos tiol neutralizan la actividad del nitrato de plata contra *P. aeruginosa*. Por el contrario los aminoácidos que contienen puentes de disulfuro (SS), aminoácidos que no contienen azufre tales como cystathione, ácido cisteico, L-metionina, taurina, bisulfito de sodio y tiosulfato de sodio son incapaces de neutralizar la actividad de los iones de plata (Ag^+).

El nitrato de plata presenta una marcada inhibición del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* y es depositado como gránulos en la vacuola y pared celular. La Ag^+ inhibe la división celular y daña la envoltura celular y el contenido intracelular de *P. aeruginosa*. Las células bacterianas aumentan de tamaño y la membrana citoplasmática, el contenido citoplasmático y las capas externas de la célula exhiben anormalidades aún sin protuberancias. Finalmente los iones de plata actúan sobre los ácidos nucleicos, actúan preferentemente con las bases del ADN más que con los grupos fosfato, aunque la importancia de esto en términos de su acción letal no está claro (McDonnell and Russell, 1999).

Los iones de plata están siendo incorporados a distintos materiales por sus propiedades bactericidas, se ha demostrado la obtención satisfactoria de una cerámica antibacteriana basada en Hidroxiapatita con adición de AgNO_3 . También ha sido probado que los recubrimientos de hidroxiapatita sobre los materiales para implantes tratados con plata exhiben excelentes efectos antibacterianos (Kim *et al.*, 1998).

4.5.3 Sulfadiazina de plata

Complicaciones con las compresas de nitrato de plata llevaron, en 1968, al uso de la sulfadiazina de plata, que se reportó como más efectiva que el nitrato de plata, particularmente contra bacilos Gram negativos. Esencialmente es una combinación de dos agentes antibacterianos, iones de plata (Ag^+) y sulfadiazina (SD). La pregunta de que si el efecto antibacteriano de la AgSD es predominante de uno solo de los compuestos o se trata de una interacción sinérgica ha sido repetidamente realizada.

Esta sal de plata tiene un amplio espectro de actividad el mismo que se demostró en 1973 con las investigaciones de Carr *et al.*, sobre 14 especies bacterianas y a diferencia del nitrato de plata produce “Blebs” o ampollas en la superficie y membrana de bacterias susceptibles, lo que no se observa en aquellas que son resistentes (Coward *et al.*, 1973; McDonnell and Russell, 1999).

La AgSD se une a los componentes celulares incluyendo el ADN. Basado en un análisis químico, Fox en 1983 propuso una estructura polimérica de la sulfadiazina de plata compuesta de seis átomos de plata unidos a seis moléculas de sulfadiazina a través del enlace de los átomos de plata a los nitrógenos del anillo de pirimidina de la sulfadiazina. Presumiblemente la inhibición bacteriana podría ser lograda cuando la plata se une a suficientes pares de bases en la hélice de ADN para de este modo inhibir la transcripción. El mecanismo de acción preciso aún no ha sido resuelto (McDonnell and Russell, 1999).

El uso de la sulfadiazina está recomendado principalmente para el tratamiento de quemaduras dérmicas superficiales y profundas, pero también para el tratamiento de heridas, su uso ha sido ampliamente aceptado tanto en animales como en humanos (Tsipouras *et al.*, 1997).

Subsecuentes intentos por mejorar la eficacia antimicrobiana para el tratamiento de quemaduras incluyen el desarrollo de formulaciones que combinan la sulfadiazina de plata y la clorhexidina. Por otra parte, la combinación de la sulfadiazina de plata con el nitrato de cerio (Flammacerium) es ampliamente utilizado también en unidades de quemados (Maillard and Denyer, 2006).

El reciente interés en el uso clínico de vendajes que contienen plata surge de los avances en las técnicas de impregnación y tecnología de polímeros acoplado con el incremento de la prevalencia de resistencia bacteriana a los antibióticos. Existen ahora un número de vendajes basados en plata en el mercado que mejoran la cicatrización al controlar la herida.

Varios estudios han demostrado que los vendajes y preparaciones que contienen plata tienen una mejor eficacia antimicrobiana que el nitrato de plata y la sulfadiazina de plata utilizadas en solución. Además la actividad bactericida puede ser potenciada cuando la sulfadiazina de plata es combinada con otras sustancias antisépticas (tales como la clorhexidina o la yodo-povidona). Estas combinaciones podrían disminuir la posibilidad de que emerja resistencia bacteriana, pero podría incrementar la citotoxicidad (Maillard and Denyer, 2006).

4.5.4 Mecanismo antimicrobiano de la plata

A pesar de su amplio uso, los mecanismos de acción bactericida de la plata no están totalmente entendidos.

Russell y Hugo han proporcionado una revisión comprensible referente a como los iones de plata podrían actuar con múltiples sitios blanco en la célula (Maillard and Denyer, 2006). Se ha revelado que la plata (bulk) en un medio acuoso cargado de oxígeno cataliza la completa oxidación destructiva de los microorganismos (Feng *et al.*, 2000).

Lukens en 1983 propuso que las sales de plata y otros metales tales como el cobre actúan por unión a grupos funcionales clave en las enzimas fúngicas. Los iones de plata (Ag^+) causan la liberación de iones K^+ de los microorganismos; la membrana citoplasmática con la que están asociadas muchas enzimas es un importante sitio blanco para la actividad de los iones de plata (McDonnell and Russell, 1999).

La mayoría de los sitios sensibles probablemente sean de naturaleza proteica y sus alteraciones resultarían en la disrupción estructural y metabólica de la célula. Además de su actividad bactericida, la plata también tiene propiedades fungicidas y virucidas. Su mecanismo molecular de la acción fungicida es similar a la bactericida con daño a proteínas a través de la interacción con grupos sulfhidrilo. Su mecanismo de acción virucida involucra la alteración de proteínas virales, pero también el daño al ácido nucleico viral (McDonnell and Russell, 1999).

Estudios recientes utilizando métodos electroquímicos y microscopía electrónica sugieren la interacción de los iones de plata con enzimas de la cadena respiratoria de la *E. coli*, posiblemente a nivel de la NADH deshidrogenasa (Holt and Bard, 2005).

4.5.5 Resistencia Bacteriana a Plata

Existe una evidencia bien documentada sobre la resistencia a la plata. Cason *et al* la reportaron en bacilos Gram negativos presentes en heridas por quemaduras a principios de 1966. Posteriormente en 1970 se presentaron reportes de brotes de infección de heridas por quemaduras o colonización de aislados Gram negativos resistentes a sulfadiazina de plata (*Enterobacter cloacae*, *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa*) y al nitrato de plata (*P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*). Está claro que la exposición a plata podría seleccionar microorganismos resistentes y esto podría jugar un papel importante en la predominancia de bacterias intrínsecamente resistentes a la plata en los lugares en los que es ampliamente usada. Li *et al* reportaron el desarrollo de resistencia bacteriana a concentraciones bajas de plata (>1024 ppm) por exposición repetida de concentraciones incrementadas *in vitro* (Maillard and Denyer, 2006).

4.5.6 Mecanismos de Resistencia a Plata (Ag⁺)

Se ha determinado que la resistencia de las bacterias a diferentes iones metálicos es codificada por genes localizados mayormente en plásmidos, aunque algunos pueden provenir de cromosomas bacterianos. Se ha identificado el plásmido pMG101 como responsable de conferir resistencia a Ag⁺, Hg²⁺ y telurito, así como a otros antibióticos entre los que podemos mencionar ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina y streptomycin (Gupta *et al.*, 2001).

Recientes estudios se han enfocado a determinar los mecanismos moleculares para la resistencia a plata, en los cuales se ha evidenciado la presencia de bombas de expulsión en las cepas bacterianas resistentes a plata, así como una disminución de las porinas de la membrana externa (bacterias Gram negativas), las cuales pueden ser las responsables de la escasa acumulación del metal en el interior de la célula.

Por otra parte se ha demostrado la quelación de la plata por grupos sulfhidrilo de proteína de unión a metales, que da como resultado la formación de un precipitado insoluble e inactivo de sulfuro de plata. En el caso específico de la *P. aeruginosa* se ha observado la reducción de los iones de plata (Ag^+) a la forma metálica (Ag^0), sin embargo es un mecanismo de resistencia poco estudiado (Li et al, 1997; Maillard and Denyer, 2006).

4.5.7 Otros Compuestos de Plata utilizados como Antimicrobianos

En el Japón, los materiales cerámicos que contienen iones de plata tales como la Zeolita de Plata, Fosfato circonio de plata (silver Zirconium phosphate) son de gran interés para los fabricantes, quienes pretenden aplicar compuestos antimicrobianos a sus productos, ya que se cree que tienen menor toxicidad para los humanos y la actividad antimicrobiana es más durable. Debido a estas características la zeolita de plata está siendo ampliamente utilizada en la conservación de alimentos, desinfección de material médico y descontaminación de superficies de materiales como juguetes, artículos de cocina, y suministros y equipo médico (Matsumura *et al.*, 2003).

Los estudios más recientes sugieren la aplicación de la Nanotecnología en la síntesis de compuestos de plata con propiedades antibacterianas.

4.6 Nanociencia y Nanotecnología

4.6.1 Nanociencia

La Real Sociedad y Academia de Ingeniería definen a la Nanociencia como el estudio de fenómenos y manipulación de materiales a escala atómica, molecular y macromolecular donde las propiedades de los materiales pueden ser bastantes diferentes de aquellos de gran escala (Knowles, 2006).

El significado del prefijo “nano” es una dimensión que equivale a 10^{-9} es decir que un nanómetro es la mil millonésima parte del metro.

Son varias las razones por las que la Nanociencia se ha convertido en un importante campo científico con entidad propia. Una de ellas es la disponibilidad de nuevos instrumentos capaces de ser manipulados a escala dimensional. En respuesta a estas nuevas posibilidades los científicos han tomado conciencia del futuro de la actividad investigadora en estos campos, la mayor parte de los países han institucionalizado iniciativas para promover la Nanociencia y la Nanotecnología en universidades y laboratorios. Con los recientes aumentos en los fondos destinados a este tipo de investigación muchos científicos están llevando a cabo muchos proyectos y la cantidad de descubrimientos y avances científicos se han incrementado de forma muy importante. (Euroresidentes, 2000).

4.6.2 Nanotecnología

La palabra “Nanotecnología” es usada extensivamente para definir las ciencias y técnicas que se aplican a un nivel de nanoescala, que permiten trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. En síntesis nos llevaría a la posibilidad de fabricar materiales y máquinas a partir del reordenamiento de átomos y moléculas.

Por lo tanto la Nanotecnología se define como el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, así como la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala (Euroresidentes, 2000).

Cuando se manipula la materia a una escala tan minúscula de átomos y moléculas, se observan fenómenos y propiedades totalmente nuevas, por lo tanto los materiales, aparatos y sistemas obtenidos gracias a esta ciencia tienen propiedades únicas.

Es interesante, más que su concepto, lo que representa potencialmente dentro del conjunto de investigaciones y aplicaciones actuales cuyo propósito es crear nuevas estructuras y productos que tendrían un gran impacto en la industria, pero principalmente en medicina (Euroresidentes, 2000).

4.6.3. Nanobiotecnología

Es una rama de la Nanotecnología que aplica las herramientas y procesos nanotecnológicos para construir dispositivos y estudiar los biosistemas. Frecuentemente llamada tecnología húmeda - seca, donde el término "húmeda" pertenece a los componentes biológicos y la parte "seca" corresponde a la ingeniería de nanopartículas inorgánicas. En la actualidad se han logrado algunos progresos experimentales en esta área y el número de bio - nanodispositivos propuesto es enorme.

La interacción entre la Biología, Medicina, Nanotecnología, Nanomedicina es uno de los campos más prometedores de la investigación siempre que se vayan dando pasos que ayuden a superar las limitaciones con las que se enfrenta la Nanotecnología en general (Euroresidentes, 2000).

4.6.4 Nanomateriales

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales (sean cerámicos, metales semiconductores, polímeros, o bien, una combinación de estos) que tienen por lo menos una de sus dimensiones entre 1 y 100 nm, representan un estado de transición entre moléculas y átomos, y un material con dimensiones de sólido a granel (bulk).

Mientras que un material en escala micrométrica aún presenta propiedades similares a las de un sólido volumétrico (bulk), en el caso de los nanomateriales debido a su tamaño reducido a unos cuantos nanómetros estas propiedades se modifican y finalmente difieren del mismo material con dimensiones de sólido a macroescala (bulk), de las moléculas y los átomos. De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos:

- a) Materiales de dimensión cero: en los que las tres dimensiones se encuentran en escala nanométrica.
- b) Materiales de una dimensión: aquellos que teniendo una longitud variable, conservan una sola dimensión en escala nanométrica, como es el caso de nanoalambres y nanotubos.
- c) Materiales de dos dimensiones: que presentan áreas de tamaño indefinido y mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, como en el caso de películas delgadas.
- d) Materiales de tres dimensiones: en los que los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas (Gutiérrez, 2005).

4.6.5 Aplicaciones de la Nanotecnología en Medicina

La aplicación de la Nanotecnología en la medicina es denominada Nanomedicina, una de las vertientes más prometedoras dentro de los avances tecnológicos en la medicina, se puede definir como rama de la Nanotecnología que concede la posibilidad de tratar enfermedades a nivel celular o molecular. Se considera que a través de la Nanomedicina determinados campos pueden ser objeto de una auténtica revolución, especialmente: monitorización (imágenes), reparación de tejidos, control de la evolución de las enfermedades, defensa y mejoramiento de los sistemas biológicos humanos; diagnóstico, tratamiento y prevención, alivio del dolor, prevención de la salud, administración de medicamentos a las células, etc. Todos ellos constituirían nuevos avances tecnológicos en la medicina, los cuales la posicionarían en una nueva era científica y asistencial (Euroresidentes, 2000).

Dentro de las principales aplicaciones de los nanomateriales en la biología y en la medicina se encuentran: marcadores biológicos fluorescentes, sistemas de liberación de fármacos, bio-detección de patógenos, sondas de DNA, ingeniería de tejidos, destrucción de tumores por calentamiento (hipertermia), separación y purificación de células y moléculas biológicas y estudios fagocinéticos (Emerich and Thanos, 2003; Salata, 2004).

El objetivo del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos es utilizar la Nanotecnología, para eliminar, antes de 2015, las muertes y el sufrimiento causados por el cáncer. Las investigaciones actuales se centran en cómo utilizar la Nanotecnología para cambiar de forma radical la capacidad de la medicina para diagnosticar, comprender y tratar el cáncer.

La Nanomedicina se convierte así en una rama fundamental de las prometedoras aplicaciones de la nanociencia, probablemente una de las de mayor alcance para el ser humano. No son pocos los que alertan de riesgos no despreciables que pueden estar ligados a estos avances.

4.7 Introducción a las Nanopartículas

La transición entre micropartículas y nanopartículas puede llevar a un número de cambios en las propiedades físicas. Dos de los factores mayormente relacionados con estos cambios son: el aumento de la relación del área de superficie con respecto al volumen y el tamaño de la partícula moviéndose en el ámbito donde predominan los efectos cuánticos.

El incremento de la relación del área de superficie y volumen, que tiene una progresión gradual conforme la partícula se hace más pequeña, conduce al incremento dominante del comportamiento de los átomos sobre la superficie de una partícula por encima del que se produce en el interior de la misma, esto afecta tanto las propiedades de la partícula en forma aislada como su interacción con otros materiales. La mayor área de superficie es un factor crítico en el rendimiento de catálisis y estructuras tales como electrodos permitiendo el mejoramiento de tecnologías tales como celdas combustibles y baterías.

La extensa área de superficie de las nanopartículas también da como resultado una enorme cantidad de interacciones entre los materiales combinados en los nanocompuestos, conduciendo a propiedades especiales tales como fuerza incrementada y/o resistencia química/calórica.

La transición de mecánica clásica a mecánica cuántica es menos gradual. Una vez que las partículas se convierten en bastante pequeñas, comienzan a exhibir un comportamiento mecánico cuántico. Adicionalmente el hecho de que las nanopartículas tengan dimensiones por debajo de la longitud de onda crítica, les concede transparencia, una propiedad que las hace muy útiles para aplicaciones en empaque, cosmética y recubrimientos.

Algunas de las propiedades las nanopartículas podrían no ser predichas solamente por el conocimiento de la influencia del incremento de átomos superficiales y los efectos cuánticos. Por ejemplo: Fue recientemente demostrado que las nanoesferas de silicona, con diámetros entre 40 y 100 nm no fueron tan duras como la silicona, pero entre los materiales más duros se localizó entre el zafiro y el diamante (Holister Paul *et al.*, 2005).

4.7.1 Técnicas de producción de Nanopartículas

Existe una amplia variedad de técnicas de producción de nanopartículas. Éstas esencialmente en tres categorías: Condensación de un vapor, síntesis química y proceso en estado sólido tales como la molienda. Las partículas pueden ser cubiertas con sustancias hidrofílicas o hidrofóbicas dependiendo de la aplicación deseada (Holister Paul *et al.*, 2005).

4.7.2 Condensación de Vapor

Esta técnica es usada para la fabricación de nanopartículas cerámicas metálicas y óxido metálicos. Involucra la evaporación de un metal sólido, seguida de una rápida condensación para formar grupos (clusters) de tamaño nano, que se estabilizan en forma de polvo (Holister Paul *et al.*, 2005).

4.7.3 Síntesis Química

La técnica de síntesis química más utilizada consiste en el crecimiento de nanopartículas en un medio líquido compuesto de varios reactantes, Es clasificado por una prueba sol-gel y también es usado para crear puntos cuánticos (nanopartículas en las cuales las propiedades mecánicas cuánticas son la clave de su comportamiento útil). Las técnicas químicas por lo general son mejores que las de condensación de vapor por el control de la etapa final de las partículas.

El último tamaño de las partículas puede ser definido, al igual que con la técnica de condensación de vapor, parando el proceso cuando el tamaño deseado está localizado o por selección de aquellas partículas que son estables y deteniendo el crecimiento en un cierto tamaño. Las pruebas son generalmente de bajo costo y alto volumen, pero la contaminación puede ser un gran problema (Holister Paul *et al.*, 2005).

4.7.4 Procesos en estado sólido

La molienda o pulverización, pueden ser usadas para obtener nanopartículas, el material de molienda y el tiempo de molienda, pueden afectar las propiedades de las nanopartículas resultantes, la técnica puede ser usada para crear nanopartículas de materiales que no pueden ser obtenidos por las dos técnicas anteriores (Holister Paul *et al.*, 2005).

4.7.5 Biosíntesis de Nanopartículas

Muchos organismos, tanto unicelulares como multicelulares son capaces de producir materiales inorgánicos ya sea intracelular o extracelularmente, es el caso de las bacterias que frecuentemente están expuestas a condiciones ambientales extremas, sin embargo gracias a mecanismos de defensa específicos pueden sobrevivir al estrés incluyendo la toxicidad debida a altas concentraciones de iones metálicos o metales foráneos.

Entres estos mecanismos podemos mencionar: sistemas de bombeo (Efflux), alteraciones de la solubilidad y la toxicidad de iones metálicos por cambios en estado redox, complejación extracelular o precipitación intracelular de metales y la falta de sistemas de transporte específicos para metales.

Estas características constituyen la base para la aplicación de las bacterias y otros microorganismos en la síntesis de nanopartículas (Bhattacharya and Gupta, 2005). Beveridge y colaboradores demostraron que partículas de oro de dimensiones nanoescala, pueden ser precipitados dentro de las células bacterianas por incubación con iones de Au^{3+} .

Klaus-Joerger y colaboradores demostraron que la bacteria *Pseudomona stutzeri* AG259 aislada de una mina, al encontrarse en una solución acuosa de AgNO_3 producía la reducción de los iones de plata Ag^+ y la formación de nanopartículas de plata de tamaños muy bien definidos y de distintas formas dentro del espacio periplásmico.

Dentro de los organismos eucariotes que poseen propiedades potenciales para la síntesis de nanopartículas podemos mencionar: los hongos como el *Verticillium*, utilizado en la síntesis intracelular de nanopartículas de plata y oro a partir de una solución acuosa de AgNO_3 y AuCl_4 respectivamente. Resultados similares se han obtenido utilizando el hongo *Fusarium oxysporum* (Bhattacharya and Gupta, 2005).

4.7.6 Aplicaciones de las Nanopartículas

Las nanopartículas generalmente forman el core de los nanobiomateriales, pueden ser utilizadas como una superficie conveniente para el ensamblaje molecular, pueden estar compuestos de materiales inorgánicos o poliméricos, pueden encontrarse en forma de nano-vesícula recubierta por una membrana o capa. Entre los desarrollos recientes se encuentran:

La ingeniería de tejidos, que consiste en diseñar dispositivos para evitar el rechazo de los implantes de tejido utilizando materiales de cerámica y otros de naturaleza metálica como el titanio.

Terapia del cáncer, basada en la destrucción de células cancerígenas por oxígeno atómico generado por láser el cual tiene propiedades citotóxicas. Manipulación de células y biomoléculas, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas han encontrado muchas aplicaciones incluyendo separación de células.

Detección de proteínas, que son parte importante del lenguaje de células, las nanopartículas de oro son ampliamente utilizadas en inmunohistoquímica para identificar la interacción proteína- proteína, la mayoría de las aplicaciones comerciales de las nanopartículas en medicina están dirigidas al comportamiento de la drogas (Salata, 2004).

4.7.7 Las Nanopartículas de Plata como Agentes Antimicrobianos

Las nanopartículas inorgánicas de naturaleza compuesta o simple poseen propiedades físicas y químicas únicas y representan un material muy importante en el desarrollo de nuevos dispositivos que pueden ser usados en numerosas aplicaciones físicas, biológicas, biomédicas y farmacéuticas. Los estudios que mostraron la posibilidad de utilizar las formulaciones antimicrobianas en forma de nanopartículas como materiales bactericidas efectivos, así como aquellos que demostraron que las nanopartículas de óxidos metálicos altamente reactivos exhibían una excelente acción biocida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, abrieron la posibilidad de contar con nuevos materiales bactericidas. El efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata fue demostrado en *E. coli* como modelo de Bacteria Gram negativa. (Sondi and Salopek-Sondi, 2004).

Las investigaciones que se han hecho para determinar el efecto antibacteriano de nanopartículas de plata, han demostrado que pueden ser utilizados para prevenir infecciones producidas por *Staphylococcus epidermidis* en dispositivos de implante cuando son impregnadas en una matriz de silicona (Furno, 2004),

En base a las excelentes propiedades de entropía conformacional en uniones polivalentes observadas en las nanopartículas de plata, que les permite unirse fácilmente a las cadenas poliméricas flexibles de los antibióticos, se ha demostrado un efecto antibacteriano sinérgico de estos nanomateriales con antibióticos como la Amoxicilina contra la *Escherichia coli* (Li *et al.*, 2005).

Morones *et al.*, en el año 2005 demostraron el efecto bactericida de nanopartículas de plata con tamaño comprendido entre 1 y 10 nm sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. typhus*.

Xu *et al.*, en Mayo del 2006 consiguieron incorporar nanopartículas de plata dentro de fibras de polilactato (polímero sintético) utilizando una tecnología de electricentrifugación (electrospinning technology) y demostraron sus propiedades antibacteriana sobre *S. aureus* y *E. coli* respectivamente.

Otros trabajos muestran que las partículas nanocristalinas de plata además de tener un efecto antibacteriano poseen propiedades antiinflamatorias, lo que ha llevado al desarrollo de compuestos farmacéuticos de uso tópico (cremas) para el tratamiento de la dermatitis de contacto con resultados prometedores. (Bhol and Schechter, 2004).

A pesar de todos los hallazgos no se ha podido establecer hasta el momento el mecanismo de acción por el cual estos nanomateriales llevan a cabo su efecto antibacteriano. Sin embargo los resultados obtenidos gracias al empleo de la proteómica por Lok *et al.* en noviembre del 2005 mostraron un claro efecto de las nanopartículas de plata sobre la expresión de proteínas de la membrana interna de *E. coli* sugiriendo que un posible sitio de acción de estos compuestos es la membrana celular. Estos antecedentes indican que las nanopartículas de plata tienen propiedades antibacterianas que todavía están siendo evaluadas y que constituyen actualmente objeto de estudio de varios investigadores.

LUGAR DE TRABAJO

La parte experimental de este trabajo fue realizada en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BL-3) perteneciente al Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León gracias al asesoramiento y la colaboración del Dr. Humberto H. Lara Villegas.

5. MÉTODOS

5.1 Material Biológico

5.1.1 Cepas bacterianas

Para la realización de este estudio se utilizaron cuatro cepas bacterianas:

La cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) fue obtenida del Hospital Universitario gracias a la colaboración del Dr. Javier Ramos y la Dra. Rosa Maria Hinojosa R.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina (SPRE) y *Pseudomona aeruginosa* multirresistente a los antibióticos (PAMR) fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León gracias a la colaboración del Dr. Rolando Tijerina Menchaca.

La cepa de *Escherichia coli* O157:H7 resistente a Ampicilina (ECRA) fue proporcionada por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de ciencias Biológicas gracias a la colaboración del Dr. Moisés Franco.

5.1.2 Conservación de Cepas Bacterianas

Las cepas bacterianas se conservaron en caldo LB en alícuotas de 50 µl contenidas en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad herméticamente cerrados a una temperatura de -40° C.

5.1.3 Procedimientos previos a cada ensayo

5.1.3.1 Preparación de la Campana de Flujo Laminar

Todos los ensayos realizados en este trabajo fueron efectuados en condiciones de esterilidad bajo Campana de Flujo Laminar tipo II en el área de bacteriología del Laboratorio BL-3.

El procedimiento previo a cada experimento consistió en limpiar la superficie de trabajo de la campana con alcohol etílico al 90% usando papel absorbente y esterilizar por acción de luz ultravioleta durante 15 minutos.

5.1.3.2 Activación de Cepas Bacterianas

El proceso de activación de las cepas bacterianas previo a cada ensayo, consistió en descongelar una alícuota de cada bacteria y mantenerla a temperatura ambiente por 15 minutos y al cabo de ese tiempo se procedió a sembrar cada una de las cepas en medio de cultivo sólido.

En el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomona aeruginosa* se utilizó agar sangre (AS) y para *Escherichia coli* O157:H7 agar soya tripticaseína (AST); todas las cepas fueron sembradas utilizando asas bacteriológicas de poliestireno estériles y desechables (Sigma- Aldrich) y se incubaron a 35° C durante 24 horas para obtener colonias bacterianas en crecimiento exponencial.

5.2 Preparación de Medios de Cultivo

Los medios de cultivo sólidos: agar sangre, agar soya tripticaseína y agar Mueller Hinton fueron adquiridos estériles y listos para usar, preparados en placas de 8.5 cm de diámetro conteniendo 20 ml de medio.

Para preparar el caldo Luria Bertani (LB) Miller en cada ensayo se pesaron 5 gramos del medio liofilizado y se diluyeron en 200 ml de agua bidestilada contenida en un matraz de vidrio (250 ml de capacidad) agitando suavemente hasta su completa disolución. Se esterilizó el medio de cultivo primero por calor húmedo en autoclave a una temperatura de 121° C durante 2 horas y posteriormente por filtración usando un filtro de 0.22µm (Nalgene™ Syringe Filter), el volumen total del medio estéril fue dividido en alícuotas de 25 ml en tubos de poliestireno estériles con tapa rosca, se conservaron en refrigeración debidamente etiquetados a una temperatura de 4° C hasta el momento de usarlas.

5.3 Preparación de Reactivos

5.3.1 Reactivo de MTT

La solución de MTT (5mg/ml) fue preparada 24 ó 48 horas antes de ser utilizada, para un volumen de 25 ml se pesaron 12.5 mg del polvo liofilizado de MTT y se disolvieron en 25 ml de agua bidestilada, se hizo la disolución utilizando un agitador tipo vortex por un tiempo de 5 minutos, se pasó a través de un filtro de 0.22 µm (Nalgene™ Syringe Filter) para esterilizarla y el volumen total de la solución estéril fue fraccionado en alícuotas de 5 ml en tubos de poliestireno estériles con tapa rosca cubiertos con papel aluminio para evitar el contacto con la luz, se conservaron las alícuotas en refrigeración a una temperatura de 4° C hasta el momento de usarlas.

5.3.2 Reactivo de trabajo para el ensayo de Bioluminiscencia (Bac Titer-Glo™)

Para la preparación de este reactivo se siguieron las instrucciones descritas en el manual Promega para el ensayo de viabilidad celular bacteriana basado en bioluminiscencia (BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay).

Aproximadamente 15 minutos antes de cada ensayo, se reconstituyó el vial que contenía la mezcla de sustrato y enzima liofilizada con 10 ml de la solución amortiguadora (buffer) y se mezcló utilizando un agitador tipo vórtice (vortex) por 5 minutos. La mezcla preparada en un vial fue suficiente para 100 determinaciones.

5.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de NPP por el Método Dilución en Tubo

El ensayo se realizó en base al protocolo estandarizado por el Comité Nacional de Estandarización de Laboratorios (NCCLS) descrito por Koneman *et al.* en el año 2002, con algunas modificaciones. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

5.4.1. Activación de las Cepas Bacterianas

Se activaron las cepas bacterianas 24 horas antes de cada ensayo de acuerdo a lo indicado en el punto 5.1.3.2.

5.4.2 Preparación de Diluciones Seriadas de Nanopartículas de Plata (NPP)

A partir de la suspensión original de nanopartículas de plata se preparó una suspensión con una concentración de 100 µg/ml usando como disolvente medio de cultivo (caldo LB). Se prepararon 9 diluciones seriadas 1:2 en tubos de vidrio (3 x 100 mm) recubiertos con silicona estériles con tapón de goma, se utilizó caldo LB como disolvente con un volumen final de 1ml en cada tubo, llegando a una concentración de 0.2 µg/ml de NPP. Fueron adicionados dos tubos, un control sin tratamiento y un control de esterilidad del medio.

5.4.3 Preparación del Inóculo Bacteriano e Inoculación

De cada uno de los cultivos bacterianos obtenidos después de 24 horas de incubación se preparó una suspensión bacteriana en 2 ml de solución salina estéril en un tubo de vidrio, se ajustó la turbidez de cada inóculo a una densidad óptica de 0.125 a 550 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro, correspondiente a una concentración de 5×10^7 UFC/ml (tubo 0.5 de la escala de Mc Farland), a partir de ese inóculo se preparó una dilución 1:10 en solución salina alcanzándose una concentración final de bacterias de 2.5×10^5 UFC/ml aproximadamente y se inocularon 50 μ l a cada uno de los tubos con las diluciones de NPP y al tubo control sin tratamiento, finalmente se incubaron todos los tubos incluyendo el control de esterilidad del medio a 35° C durante 24 horas.

5.4.4 Lectura e Interpretación de Resultados

Después de 24 horas de incubación, se observaron todos los tubos para detectar la presencia de turbidez visible (indicativa de proliferación bacteriana en medio líquido), se prestó especial atención a la turbidez del control sin tratamiento y a la transparencia del control de esterilidad para validar el ensayo. La menor concentración de NPP que no presentó turbidez fue considerada la concentración mínima inhibitoria (CIM) en cada caso.

5.5 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el Método de Microdilución en Placa.

5.5.1 Activación de Cepas Bacterianas

Se activaron las cepas bacterianas 24 horas antes de cada ensayo de acuerdo a lo indicado en el punto 5.1.3.2.

5.5.2 Preparación de Diluciones Seriadas de NPP

A partir de una suspensión de nanopartículas de plata de 100 $\mu\text{g/ml}$ se realizaron 9 diluciones seriadas de NPP 1:2 en una placa de 96 pozos estéril utilizando caldo LB como disolvente, se utilizaron dos filas de la placa por bacteria (ensayo por duplicado) con un volumen final de 100 μl por pozo, se llegó a una concentración final de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de NPP. Se utilizaron un control sin tratamiento y un control de medio.

5.5.3 Preparación del Inóculo e Inoculación

Se procedió de manera similar a la descrita en el punto 5.4.3 con la diferencia de que la inoculación se llevó a cabo con 5 μl del inóculo preparado en cada pozo, excepto en el que fue utilizado como control de medio.

5.5.4 Lectura e Interpretación de Resultados

Después de 24 horas de incubación se procedió a detectar crecimiento bacteriano en cada pozo de la placa por medio de la observación visual de turbidez o formación de puntos blanquecinos en el fondo del pozo correspondientes a la acumulación de colonias bacterianas, en el caso de las pruebas de inhibición sobre MRSA en particular se tomaron 10 μl de cada pozo y se depositaron en una laminilla de conteo celular para estimar la cantidad de proliferación bacteriana en cada pozo observando la laminilla en un microscopio de luz con los objetivos 10 y 40X. La proliferación bacteriana se reportó en cruces con respecto al control sin tratamiento.

La menor concentración de NPP en la que se observó proliferación bacteriana fue considerada la CIM de NPP en cada caso.

5.6 Pruebas de Inhibición a Diferentes Concentraciones Bacterianas

5.6.1 Preparación de Diluciones Seriadas de NPP

Se procedió de la misma manera que la prueba de microdilución en placa descrita en el punto 5.5, en este caso se utilizaron 2 placas por bacteria.

5.6.2 Preparación de Inóculos Bacterianos e Inoculación

Las bacterias fueron activadas como se describió en punto 5.1.3.2, después de 24 horas de incubación se preparó una suspensión bacteriana en un tubo de vidrio con 2 ml solución salina (uno por cada bacteria), se ajustó la turbidez a una densidad óptica de 1.00 a 550 nm de longitud de onda, correspondiente a una concentración de 4×10^8 UFC/ml (tubo 4 de la escala de Mc Farland).

A partir de la cual se hicieron 7 diluciones seriadas 1:2 en solución salina estéril y se obtuvieron de esa manera 8 concentraciones bacterianas diferentes que se muestran en la tabla 1, de cada uno de los inóculos se preparó una dilución 1:10 en solución salina y se procedió a la inoculación de manera similar a la técnica de microdilución descrita en el punto 5.5.

Se utilizaron 2 placas por cada cepa bacteriana, en una se inocularon las primeras 4 concentraciones bacterianas y en la otra las últimas 4 (por duplicado).

TABLA I
Concentraciones Bacterianas utilizadas en el Ensayo 5.7

Escala de Mc Farland	D.O. a 550 nm	Inóculo inicial (UFC/ml) *	Inóculo final (UFC/ml) **
4	1.00	4×10^8	2×10^6
2	0.500	2×10^8	10^6
1	0.250	10^8	5×10^5
0.5	0.125	5×10^7	2.5×10^5
0.25	0.062	2.5×10^7	1.25×10^5
0.12	0.031	1.25×10^7	6.25×10^4
0.06	0.016	6.25×10^6	3.12×10^4
0.03	0.008	3.12×10^6	1.56×10^4

* Antes de la inoculación. ** Después de la inoculación

5.7 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP por el Método de la Capacidad Formadora de Colonias

Primeramente se efectuó una prueba cualitativa para determinar la capacidad formadora de colonias en los cultivos tratados con NPP que no presentaron turbidez en la prueba de dilución en tubo descrita en el punto 5.4. Se utilizó una placa de agar sangre, se hicieron trazos radiales en la parte externa de la placa con un marcador indeleble para dividir el espacio circular del medio de cultivo en 8 áreas.

Se tomaron 5 µl de cada uno de los cultivos en los tubos tratados con 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/ml de NPP respectivamente y con la ayuda de una asa bacteriológica se sembró cada volumen un área diferente de la placa, las restantes dos áreas fueron utilizadas para sembrar el control de esterilidad del medio (CE) y el control sin tratamiento (CST).

Se incubó la placa a 35° C durante 24 horas, la presencia o ausencia de colonias fue observada visualmente en cada uno de las áreas y la menor concentración en la que no se observó formación de colonias fue considerada la concentración bactericida mínima (CBM).

Para determinar cuantitativamente la inhibición al 100% de la capacidad formadora de colonias se utilizó el método estandarizado por NCCLS descrito por Koneman *et al.*, en el 2002. Primeramente se cuantificó el inóculo bacteriano inicial, para lo cual se prepararon 5 diluciones seriadas 1:10 en solución fisiológica a partir de la suspensión bacteriana ajustada a una densidad óptica de 0.125 a 550 nm de longitud de onda, se sembraron 100 µl de la última dilución por duplicado en placas de agar sangre por el método de distribución en masa específico para recuentos, se incubaron las placas a 35° C durante 24 horas. Se contaron las colonias formadas y se determinó la concentración bacteriana en el inóculo multiplicando el número de colonias por la dilución.

Se tomaron 100 ml de los cultivos en tubo tratados con NPP incubados por 24 horas y se resembraron en agar sangre de la misma forma que el inóculo y se incubaron nuevamente a 35° C durante 24 horas. Se contaron las colonias formadas en cada placa y determinó la concentración bacteriana de manera similar a la cuantificación del inóculo y se estableció la inhibición porcentual con respecto al inóculo inicial.

5.8 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de Nanopartículas de Plata utilizando pruebas de Viabilidad Celular Bacteriana

Se utilizaron 2 pruebas de viabilidad celular para establecer el porcentaje de inhibición de los cultivos tratados con NPP con respecto al control sin tratamiento, con el objetivo de buscar la concentración de NPP que sea capaz de inhibir el crecimiento del 100% del inóculo inicial.

5.8.1 Ensayo Colorimétrico de MTT

Se utilizó el método colorimétrico de MTT para establecer la actividad metabólica de las bacterias como indicadora de viabilidad celular después del tratamiento con nanopartículas de plata y determinar la concentración mínima bactericida (CBM), el método se fundamenta en una reacción de reducción catalizada por la enzima reductasa mitocondrial de células eucariontes viables, cuya actividad en la células procariontes y su uso como prueba de viabilidad microbiana se encuentra reportada en la literatura. (Thom *et al.*, 1993; Zhang and Liu, 2002). En el proceso de reducción la sal de tetrazonio 3-(4,5 dimethylthiazol-2-il)-2,5 diphenil tetrazolium bromide (MTT) de color amarillo se convierte en el compuesto Azul de Formazán de color azul-púrpura, la densidad óptica del compuesto reducido es proporcional a la cantidad de células vivas presentes.

5.8.1.1 Curva de Linealidad del Método

Antes de la determinación de la CBM por el método de MTT se determinó la relación entre la concentración de células bacterianas viables y la densidad óptica del compuesto reducido púrpura de Formazán.

Se sembraron las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina, *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina y *Pseudomona aeruginosa* multirresistente a antibióticos en agar sangre y la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 resistente a Ampicilina en agar Soya Trypticaseína, todas las cepas fueron incubadas a 35° C durante 24 horas.

De las colonias obtenidas a las 24 horas, se preparó una suspensión bacteriana en caldo LB de cada cepa ajustando la turbidez a una densidad óptica de 1.00 a 550 nm de longitud de onda, correspondiente a una concentración aproximada de 4×10^8 UFC/ml (tubo 4 de la escala de Mc Farland).

A partir de cada inóculo, se realizaron 10 diluciones seriadas 1:2 utilizando caldo LB como disolvente en una placa de 96 pozos con un volumen final de 200 μ l por pozo, hasta llegar a una concentración de 3.5×10^5 UFC/ml. (cada determinación se hizo por duplicado).

Se incubaron las diluciones a 35° C por 5 minutos, posteriormente se agregaron 20 μ l del reactivo de MTT a cada pozo, se incubó a 35° C por el tiempo 4 horas 30 minutos al término de cual se agregaron 80 μ l de DMSO incubándose 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron las lecturas de densidad óptica en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm. Los promedios de las lecturas para cada cepa fueron graficados y se determinaron las ecuaciones de regresión y los coeficientes de determinación respectivamente.

5.8.1.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de Nanopartículas de Plata

Se siguió el mismo procedimiento utilizado para la determinación de la CIM por microdilución en placa descrito en el punto 5.6. Después de 24 horas de incubación de la placa, se hizo una dilución 1:5 de cada pozo usando caldo LB para alcanzar 200 μ l de volumen final, se agregaron 20 μ l de reactivo de MTT (previamente preparado y filtrado) en cada pozo, se incubó a 35° C durante 4.5 horas. Al término de ese tiempo se agregaron 80 μ l de DMSO incubándose a temperatura ambiente (20 – 25° C), finalmente se hicieron las lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm en un lector de ELISA.

Para determinar la CBM, se estableció la relación porcentual de los promedios de las lecturas con respecto al control sin tratamiento (100% de viabilidad celular) y la menor concentración de NPP en la que no se obtuvo viabilidad (100% de inhibición), fue considerada la CBM.

5.8.2 Ensayo de Bioluminiscencia

Se utilizó como segundo método de viabilidad celular el ensayo de bioluminiscencia, basado en la cuantificación de ATP presente como indicador de células metabólicamente activas a través una reacción de óxido-reducción catalizada por la enzima luciferasa, en la cual el compuesto quimioluminiscente luciferín se oxida a oxiluciferín en presencia de Mg^{++} , ATP y oxígeno molecular, emitiendo una señal luminiscente que es proporcional a la cantidad de ATP presente y este a su vez a la concentración de bacterias vivas. En la figura 2 se muestra un esquema de la reacción.

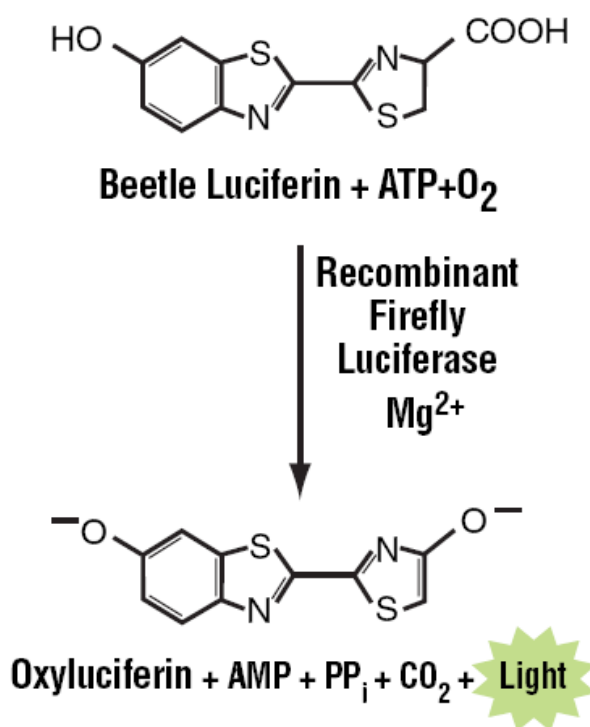


Figura 2. Reacción de la Luciferasa

El procedimiento realizado en este estudio se basó en el protocolo descrito en el Boletín Técnico de la empresa Promega Corporation en el 2004.

5.8.2.1 Curva de Linealidad del Método

Para este ensayo solamente fue activada la cepa de MRSA, en este caso el procedimiento de activación se realizó en medio líquido utilizando caldo LB en tubo, se incubó a 35° C durante 24 horas, al cabo de este tiempo se midió la densidad óptica del cultivo a 550 nm de longitud de onda, se hizo una dilución 1:50 en caldo LB y a partir de esa concentración se hicieron 8 diluciones seriadas 1:2 en caldo LB.

Se tomaron 100 µl de cada una de las concentraciones de MRSA y se pusieron en una placa opaca de 96 pozos (incluida en el kit), se utilizaron 2 filas de la placa (ensayo por duplicado), se agregaron 100 µl del reactivo de trabajo de luminiscencia de un solo paso preparado previamente como se describió en el punto 5.3.2, se esperaron 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer la señal luminiscente expresada en Unidades Relativas de Luminiscencia (RUL) en un luminómetro para microplacas (Veritas™ Microplate Luminometer from Turner Biosystems).

Los promedios de las lecturas de luminiscencia fueron graficados de acuerdo al modelo de regresión y se determinó el coeficiente de determinación correspondiente.

5.8.2.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida de NPP

En este ensayo inicialmente se siguió el procedimiento del método de microdilución en placa descrito en el punto 5.6. Después de 24 horas de incubación de la placa, se hizo una dilución 1:5 utilizando caldo LB como disolvente (previamente atemperado), se procedió a determinar la concentración de células metabólicamente activas en cada pozo después del tratamiento con NPP utilizando el ensayo de bioluminiscencia descrito en el punto anterior.

Para determinar la CBM, se estableció la relación porcentual de las lecturas con respecto al control sin tratamiento (100% de viabilidad) y la menor concentración de NPP en la que no se observó viabilidad celular bacteriana, fue considerada la CBM.

5.9 Curvas de Muerte Bacteriana de las Cepas Tratadas con NPP

5.9.1 Activación de Cepas Bacterianas

Se procedió de manera idéntica a la descrita en el punto 5.1.3.2

5.9.2 Preparación de Diluciones Seriadadas de NPP

A partir de la concentración de 100 µg/ml de NPP se hicieron 3 diluciones seriadas 1:2 (100, 50, 25 y 12.5 µg/ml) utilizando caldo LB en tubo y se incluyeron un control sin tratamiento y un control de esterilidad de medio.

5.9.3 Preparación del Inóculo Bacteriano

El inóculo bacteriano fue preparado de manera similar a la descrita en el punto 5.4.3.

5.9.4. Cinética de Crecimiento de las Cepas Bacterianas con y sin Tratamiento

La parte inicial del ensayo se realizó de manera idéntica a la descrita en el punto 5.6 para el método de microdilución en placa. Sin embargo en este caso se midió la viabilidad celular inmediatamente después de la inoculación (hora cero) utilizando el método de bioluminiscencia ya descrito en el punto 5.8.2, se incubó la placa a 35° C y se hicieron determinaciones de viabilidad por el mismo método a la 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas de incubación respectivamente tanto de los cultivos tratados con NPP como del control tratamiento.

Se estableció la relación porcentual de las lecturas de luminiscencia con respecto a la del inóculo inicial y se determinó el tiempo mínimo de tratamiento con cada una de las concentraciones de NPP para conseguir una inhibición del 100%. Las lecturas de bioluminiscencia con respecto al tiempo fueron graficadas.

5.10 Determinación de la CBM de Vancomicina sobre MRSA

Se utilizó una solución inyectable de Clorhidrato de Vancomicina preparada con 20 ml de agua bidestilada estéril que fueron añadidos al vial (ampolla) conteniendo 1g del antibiótico como polvo liofilizado, se obtuvo una concentración final de 50 mg/ml. A partir de esta concentración se preparó una solución cuya concentración de Vancomicina fue 100 µg/ml utilizando agua bidestilada estéril como disolvente. Se determinó la CBM de Vancomicina sobre MRSA por el método de bioluminiscencia, de manera similar a la descrita en el punto 5.8.2.

5.11 Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizaron 2 programas computacionales: SIGMA-PLOT 2000 con el cual se determinaron los promedios y las desviaciones estándar de los datos y el programa SPSS con el cual se hicieron las pruebas estadísticas correspondientes a cada caso.

Los datos fueron sometidos primeramente a la prueba Shapiro-Will y Kolmogrov-Smirnov para determinar la normalidad. Estas pruebas reportaron que los datos no tienen una distribución normal y por lo tanto se utilizaron pruebas no paramétricas para el análisis. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparación de medias por pares, de forma análoga a la T de Student, para comparación de medias se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones múltiples de medias se hicieron con la prueba de Tukey. En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

6. RESULTADOS

6.1 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de Nanopartículas de Plata sobre MRSA

Se utilizaron dos métodos para determinar la concentración mínima de NPP capaz de inhibir la proliferación de MRSA en medio líquido: el método de dilución en tubo y el de microdilución en placa descritos en la sección 5.

Los resultados obtenidos por el método de dilución en tubo mostraron una inhibición de la proliferación de MRSA en medio LB Miller a una concentración mínima de 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP después de 24 horas de incubación a 35° C (Figura 3), la inhibición fue evidenciada por la ausencia de turbidez del medio de cultivo en los tubos 2, 3, 4, comparable visualmente con el control de esterilidad (tubo 1). Los tubos con concentraciones de NPP inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ presentaron proliferación bacteriana comparable visualmente con el control sin tratamiento (tubo 7).

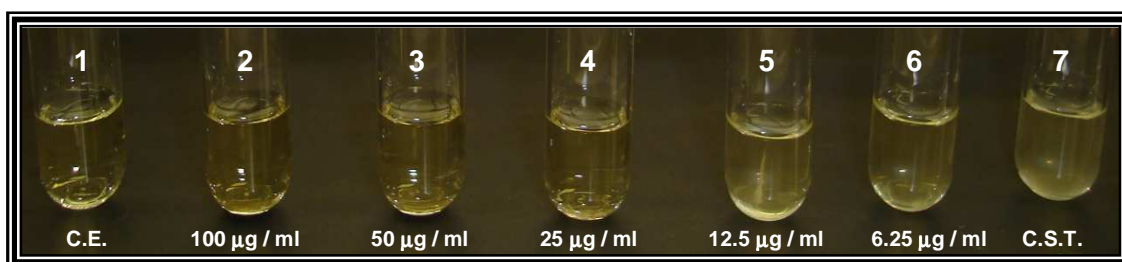


Figura 3. CIM de NPP sobre MRSA por dilución en tubo. Los tubos con diferentes concentraciones de NPP en medio LB Miller, se inocularon con 50 μl del inóculo estandarizado de MRSA (2.5×10^5 UFC/ml) y fueron incubados a 35° C durante 24 horas incluyendo el control de esterilidad del medio de cultivo (CE) y el control sin tratamiento (CST). Los resultados fueron reproducidos en 3 ensayos individuales.

Por el método de microdilución en placa los resultados mostraron inhibición de proliferación bacteriana a una concentración mínima de 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP, en este caso la turbidez del medio de cultivo en cada pocillo observada visualmente fue medida en términos de densidad óptica en un lector de ELISA y los datos mostraron una absorbancia mínima en los cultivos tratados con la 100, 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP respectivamente (Figura 4).

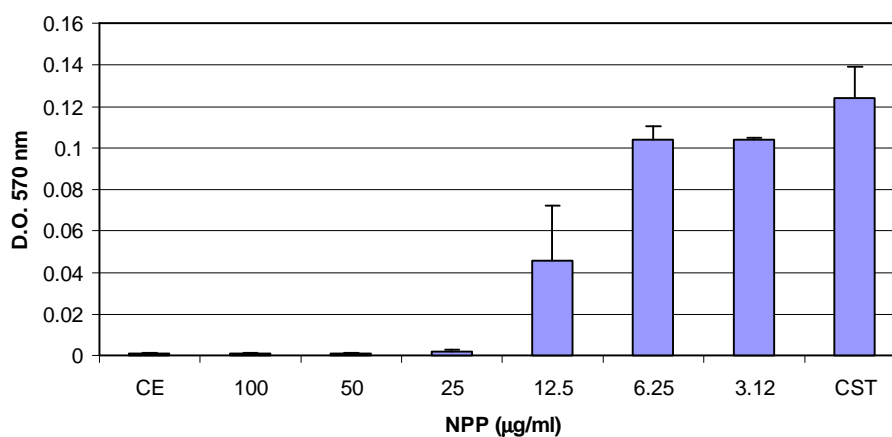


Figura 4. CIM de NPP sobre MRSA por microdilución en placa. Se incubaron el inóculo estandarizado de MRSA tratado con diferentes concentraciones de NPP, el control sin tratamiento (CST) y el control de esterilidad (CE) del medio LB Miller a 35° C por 24 horas, los datos corresponden a la media de las lecturas de D.O. + la desviación estándar correspondientes a 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales.

6.2 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP sobre la cepa de MRSA

Para esta determinación se utilizaron 3 métodos: El método de la Capacidad Formadora de Colonias, el método colorimétrico de MTT y el método de Bioluminiscencia.

6.2.1 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP sobre MRSA por el Método de la Capacidad Formadora de Colonias

Los cultivos tratados con concentraciones de NPP de 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPP, resembrados en una placa de agar sangre e incubados a 35° C por 24 horas como se describe en la sección 5, mostraron una completa inhibición de la capacidad formadora de colonias, como se observa en la Figura 5, (áreas 6,7 y 8 de la placa de agar sangre) comparable con el control esterilidad (área 1). Los cultivos tratados con concentraciones inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP presentaron crecimiento de colonias similares al control sin tratamiento (área 2).

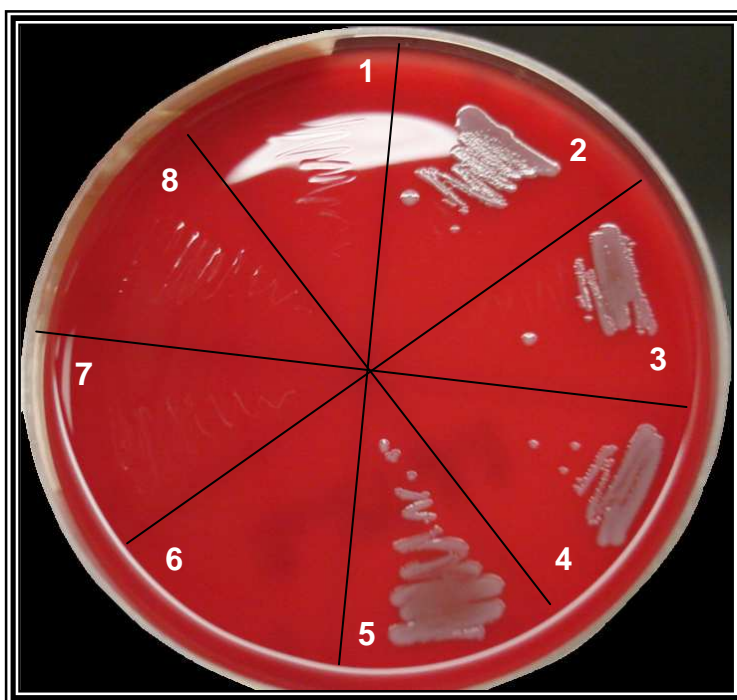


Figura 5. Inhibición de la capacidad formadora de colonias de MRSA por NPP. Se tomaron 5 μl de los cultivos de MRSA en medio LB Miller tratados con concentraciones de NPP de 3.12 (3), 6.25 (4), 12,5 (5), 25 (6), 50 (7) y 100 (8) $\mu\text{g/ml}$, e incubados a 35° C por 24 horas, se resembraron en agar sangre y se incubaron nuevamente a 35° C por otras 24 horas. El área 1 de la placa corresponde al control de esterilidad (CE) y el área 2 al control sin tratamiento (CST).

El recuento de colonias del inóculo sin tratamiento reveló la presencia de 23×10^5 UFC/ml de MRSA, las placas correspondientes a los inóculos tratados con 25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPP mostraron una inhibición del 100% de la capacidad formadora de colonias después de 24 horas de incubación a 35°C , mientras las concentraciones inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ presentaron recuentos cercanos o superiores al inóculo inicial (20×10^5 , 90×10^5 y 95×10^5 UFC/ml) correspondientes a porcentajes entre 86 y más del 100% como se observa en la Figura 6. Por tanto la concentración mínima bactericida de NPP sobre MRSA fue de 25 $\mu\text{g/ml}$.

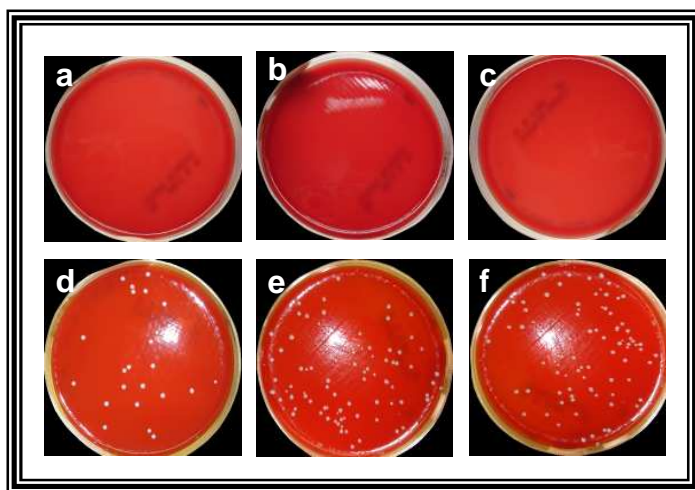


Figura 6. Recuento de colonias de MRSA previamente tratadas con NPP. Se tomaron 100 μl de los cultivos de MRSA en medio LB Miller tratados con 100 (a), 50 (b), 25 (c), 12,5 (d), 6,25 (e) y 3.12 (f) $\mu\text{g/ml}$ de NPP e incubados a 35°C por 24 horas, se resembraron en agar sangre y se incubaron nuevamente a 35°C por otras 24 horas. Se contaron las colonias MRSA presentes en cada placa de agar sangre y se estableció el porcentaje de inhibición con respecto al inóculo inicial.

6.2.2 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP sobre la cepa de MRSA por el método colorimétrico de MTT

Primeramente se construyó la curva de linealidad del método para establecer la relación entre el número de UFC/ml de MRSA viables en un medio de cultivo líquido y la densidad óptica del compuesto reducido púrpura de Formazán. El análisis de regresión lineal de los datos mostró una relación directa entre estas dos variables con un coeficiente de determinación $r^2 = 0.98$. Figura 7.

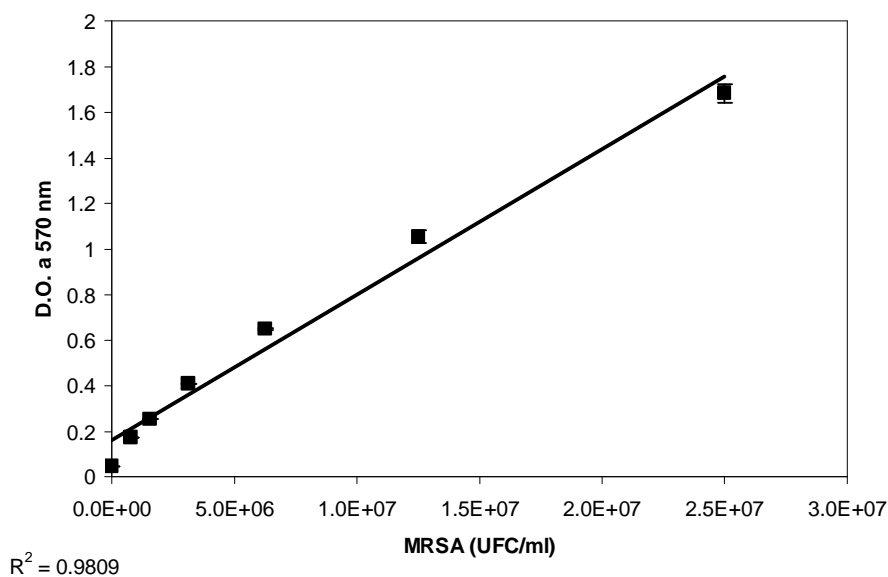


Figura 7. Relación entre el número de UFC de MRSA viables y la D.O. del compuesto Azul de Formazán. Diluciones seriadas del inóculo de MRSA fueron tratadas con 20µl de MTT, incubadas a 35° C por 4.5 horas, lisadas con 80 µl DMSO por 5 minutos a temperatura ambiente y la D.O. fue medida a 570 nm en un lector de ELISA. Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales \pm la desviación estándar.

Una vez establecida la linealidad del método, se procedió a medir la viabilidad celular de los cultivos de MRSA tratados con diferentes concentraciones de NPP (por el método de microdilución en placa). La relación porcentual de viabilidad de los cultivos tratados con respecto al control sin tratamiento (CST) nos permitió determinar las concentraciones bactericidas de NPP sobre MRSA

La concentración mínima bactericida de NPP sobre MRSA determinada por este método fue de 25 $\mu\text{g/ml}$, a esta concentración ya no se detectó viabilidad celular con respecto al control sin tratamiento, considerándose una inhibición de 100% del inóculo inicial, resultados similares se observaron en los cultivos tratados con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de NPP respectivamente. Las concentraciones inferiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 50% como se observa en la Figura 8.

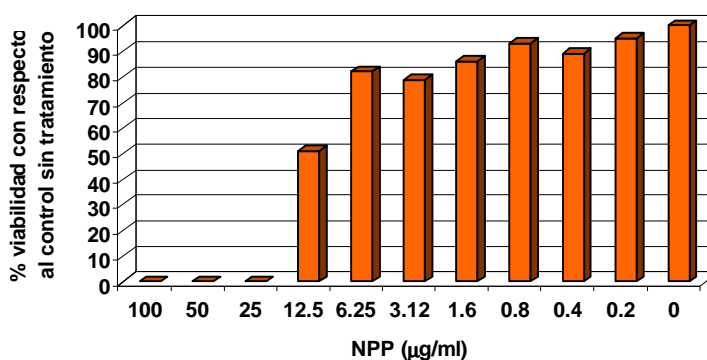


Figura 8. Porcentaje de viabilidad celular de MRSA tratado con NPP por el método de MTT. La viabilidad celular del inóculo estandarizado de MRSA (2.5×10^5 UFC/ml) después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de NPP a 35°C fue medida por el método de MTT, los datos corresponden al porcentaje de células viables con respecto al control sin tratamiento.

6.2.3 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP sobre MRSA por el Método de Bioluminiscencia

Para determinar cuantitativamente la viabilidad de los cultivos después del tratamiento con NPP por bioluminiscencia primeramente se estableció la linealidad del método relacionando el número de UFC/ml de MRSA viables en medio líquido con la señal luminiscente emitida por la reacción bioluminiscencia.

El modelo de regresión lineal de los datos obtenidos por este método mostró una relación lineal entre las variables y el coeficiente de determinación $r^2=0.99$. Figura 9.

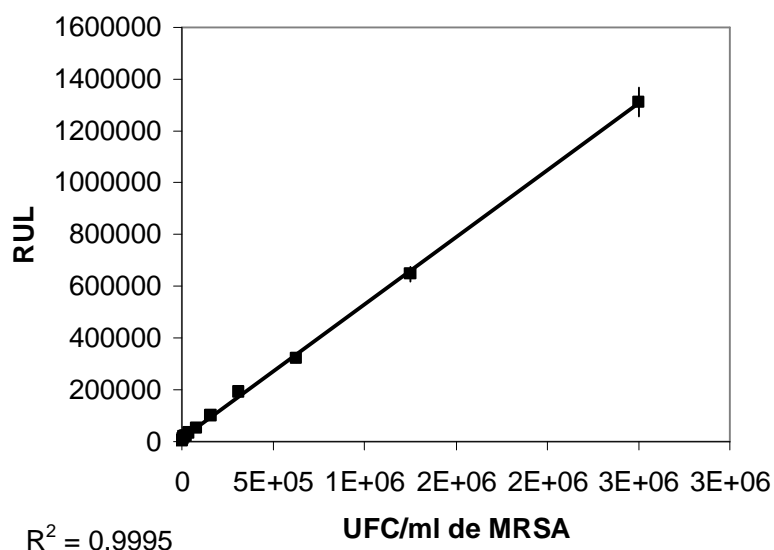


Figura 9. Relación entre el número de UFC/ml de MRSA viables y la señal luminiscente. Diluciones seriadas de un cultivo de MRSA en medio líquido fueron tratadas con el reactivo de bioluminiscencia de un solo paso, la señal luminiscente fue medida en un luminómetro y expresada en unidades de luminiscencia relativa (RUL). Los resultados representan las lecturas del promedio de 3 repeticiones \pm la desviación estándar.

Una vez establecida la linealidad del método se determinó la viabilidad de los cultivos de MRSA en medio líquido tratados con diferentes concentraciones de NPP.

Los resultados obtenidos después de 24 horas de incubación a 35° C mostraron una inhibición del 100% de la viabilidad a 100, 50 y 25 µg/ml de NPP, a partir de una concentración de 12.5 µg/ml de NPP se pudo detectar una viabilidad celular superior al 35% con respecto al control sin tratamiento. Figura 9.

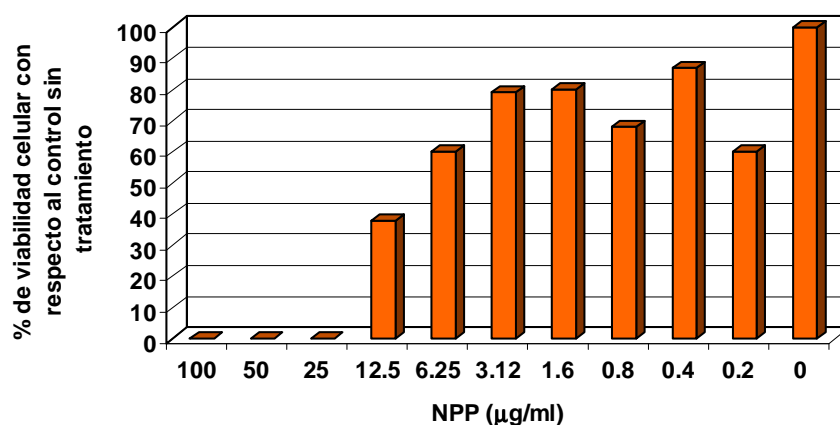


Figura 10. Porcentaje de Viabilidad celular de MRSA tratado con NPP según el método de Bioluminiscencia. La viabilidad del inóculo de MRSA (25×10^5 UFC/ml) tratado con diferentes concentraciones de NPP fue determinada midiendo la cantidad de ATP consumido en la reacción de luciferasa en presencia del sustrato quimioluminiscente luciferín y la señal luminiscente fue medida en un luminómetro. Los datos representan el % de RUL con respecto al control sin tratamiento obtenidas en 4 repeticiones.

6.3 Efecto antibacteriano de NPP sobre diferentes concentraciones de MRSA

El efecto inhibitorio de NPP sobre la proliferación de MRSA fue probado utilizando inóculos con diferentes concentraciones de la cepa, los resultados obtenidos por la observación microscópica se detallan en la Tabla II, las lecturas de densidad óptica a 570 nm después de 24 y 48 horas de incubación mostraron que las concentraciones de NPP de 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ fueron capaces de inhibir todos los inóculos tratados, a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP se observó una inhibición significativa a partir de 2.5×10^5 UFC/ml de MRSA, las concentraciones de 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/ml}$ mostraron inhibición significativa a partir de 3.12×10^4 UFC/ml, con 3.12 $\mu\text{g/ml}$ de NPP se pudo inhibir solamente los inóculos de 1.56×10^4 y 7.81×10^3 UFC/ml respectivamente. Estos resultados se pueden observar en las Tablas III y IV y gráficamente en las Figuras 11 -12.

TABLA II
Proliferación de diferentes inóculos de MRSA después de 24 horas de tratamiento con NPP

MRSA UFC/ml	Nanopartículas de Plata ($\mu\text{g/ml}$)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	0 (CST)
10^6	-	-	+	+	++	+++	+++
5×10^5	-	-	+	+	++	+++	+++
2.5×10^5	-	-	-	+	++	++	+++
1.25×10^5	-	-	-	+	++	++	+++
6.25×10^4	-	-	-	+	++	++	+++
3.12×10^4	-	-	-	-	-	++	+++
1.56×10^4	-	-	-	-	-	-	+++
7.81×10^3	-	-	-	-	-	-	+++

Resultados obtenidos después de 24 horas de incubación a 35° C
 Grado de crecimiento bacteriano (observación al microscopio invertido)
 - sin crecimiento + escaso, ++ regular, +++ abundante con respecto al control sin tratamiento (CST).

TABLA III

Efecto antibacteriano de NPP sobre diferentes concentraciones de MRSA después de 24 horas de tratamiento

MRSA UFC/ml	Nanopartículas de Plata ($\mu\text{g/ml}$)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	0 (CST)
10^6	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.0008	0.039 ± 0.011	0.080 ± 0.0014	0.104 ± 0.002	0.121 ± 0.0095	0.130 ± 0.005
5×10^5	0.001 ± 0.0004	0.001 ± 0.001	0.036 ± 0.003	0.081 ± 0.004	0.104 ± 0.005	0.112 ± 0.01	0.114 ± 0.01
2.5×10^5	0.001 ± 0.0004	0.001 ± 0.001	0.001 * ± 0.0007	0.080 ± 0.0001	0.098 ± 0.003	0.103 ± 0.0001	0.111 ± 0.015
1.25×10^5	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0008	0.078 ± 0.005	0.094 ± 0.011	0.099 ± 0.02	0.102 ± 0.02
6.25×10^4	0.001 ± 0.008	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.008	0.089 ± 0.005	0.098 ± 0.003	0.110 ± 0.004	0.097 ± 0.02
3.12×10^4	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.002	0.001 * ± 0.0008	0.001 ± 0.001	0.111 ± 0.004	0.083 ± 0.006
1.56×10^4	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.001	0.001 * ± 0.004	0.092 ± 0.006
7.81×10^3	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.002	0.002 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.095 ± 0.038

Valores de densidad óptica a 570 nm obtenidos después de 24 horas de incubación a 35° C.

Los valores corresponden a la media de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales \pm las desviaciones estándar con respecto a la media.

* Valores significativamente diferentes con respecto a las concentraciones inferiores de NPP, a las UFC superiores y al control ($P < 0.05$).

TABLA IV

Efecto antibacteriano de NPP sobre diferentes concentraciones de MRSA después de 48 horas de tratamiento

MRSA UFC/ml	Nanopartículas de Plata ($\mu\text{g/ml}$)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	0 (CST)
10^6	0.001 ± 0.0008	0.002 ± 0.004	0.080 ± 0.017	0.227 ± 0.057	0.222 ± 0.039	0.169 ± 0.0078	0.144 ± 0.0001
5×10^5	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.0014	0.070 ± 0.035	0.169 ± 0.026	0.181 ± 0.062	0.152 ± 0.042	0.152 ± 0.0001
2.5×10^5	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.0014	0.001 * ± 0.002	0.132 ± 0.01	0.161 ± 0.037	0.194 ± 0.036	0.163 ± 0.0001
1.25×10^5	0.001 ± 0.002	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.0008	0.115 ± 0.028	0.158 ± 0.009	0.160 ± 0.054	0.148 ± 0.0001
6.25×10^4	0.001 ± 0.0014	0.001 ± 0.0014	0.001 ± 0.0008	0.0130 ± 0.034	0.124 ± 0.018	0.133 ± 0.02	0.150 ± 0.0001
3.12×10^4	0.001 ± 0.0014	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.0011	0.002 ± 0.0008	0.002 * ± 0.0018	0.142 ± 0.032	0.142 ± 0.006
1.56×10^4	0.001 ± 0.0001	0.001 ± 0.001	0.001 ± 0.0014	0.001 ± 0.00057	0.002 ± 0.0014	0.001 * ± 0.0008	0.128 ± 0.025
7.81×10^3	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.002	0.002 ± 0.0008	0.001 ± 0.0014	0.001 ± 0.0008	0.001 ± 0.0008	0.135 ± 0.0018

Valores de densidad óptica a 570 nm obtenidos después de 48 horas de incubación a 35° C.

Los valores corresponden a la media de las lecturas de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales \pm las desviaciones estándar con respecto a la media.

* Valores significativamente diferentes con respecto a las concentraciones inferiores de NPP, a las UFC superiores y al control ($P < 0.05$).

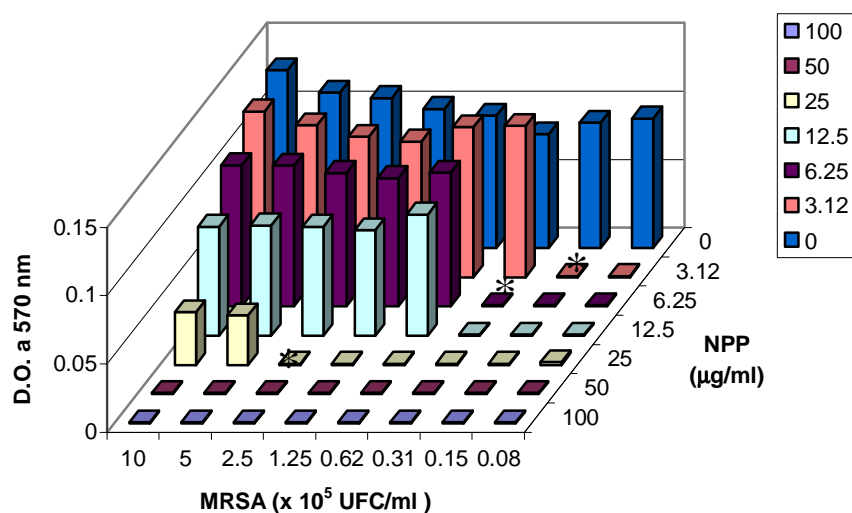


Figura 11. Proliferación en medio líquido de diferentes inóculos de MRSA tratados con NPP durante 24 horas. Se trataron 8 inóculos de MRSA con 6 diferentes concentraciones de NPP por 24 horas, la densidad óptica de los cultivos fue medida a 570 nm. Los resultados representan la media de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales. * Diferencia significativa con respecto a las concentraciones inferiores de NPP, a las UFC superiores y al control ($P < 0.05$).

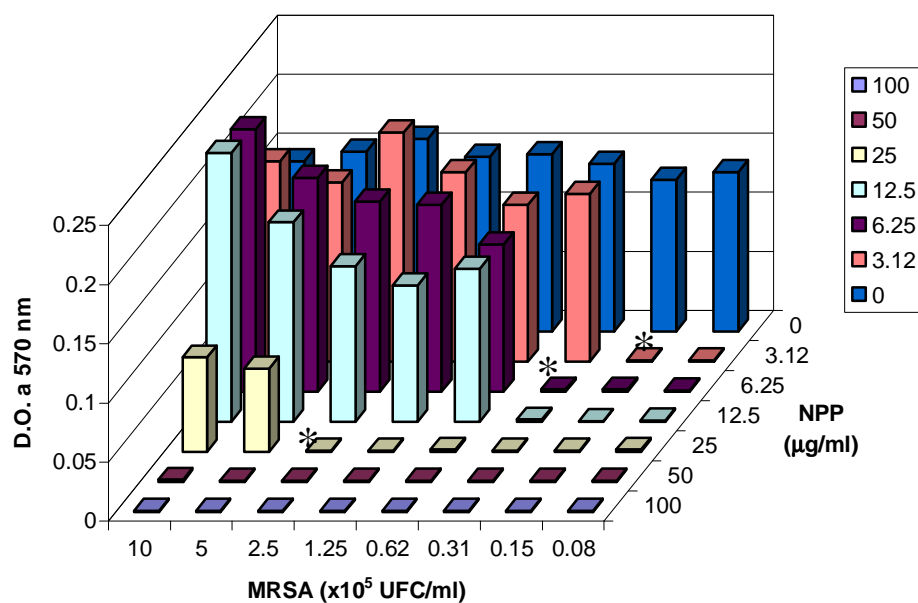


Figura 12. Proliferación en medio líquido de diferentes inóculos de MRSA tratados con NPP durante 48 horas. Se trataron 8 inóculos de MRSA con 6 diferentes concentraciones de NPP por 24 horas, la densidad óptica de los cultivos fue medida a 570 nm. Los resultados representan la media de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales. * Diferencia significativa con respecto a las concentraciones superiores de NPP, a las UFC inferiores y al control ($P < 0.05$).

6.4 Cinética de crecimiento de MRSA

La concentración inicial del inóculo de MRSA sin tratamiento establecida por el método de bioluminiscencia fue de 2.7×10^4 UFC/ml (hora 0), durante las primeras 4 horas de incubación a 35°C se observó un crecimiento lento (fase de latencia), a la hora 6 se evidenció la fase de crecimiento exponencial que comenzó a estacionarse a partir de la hora 10 y a descender a las 24 horas de incubación. Figura 13.

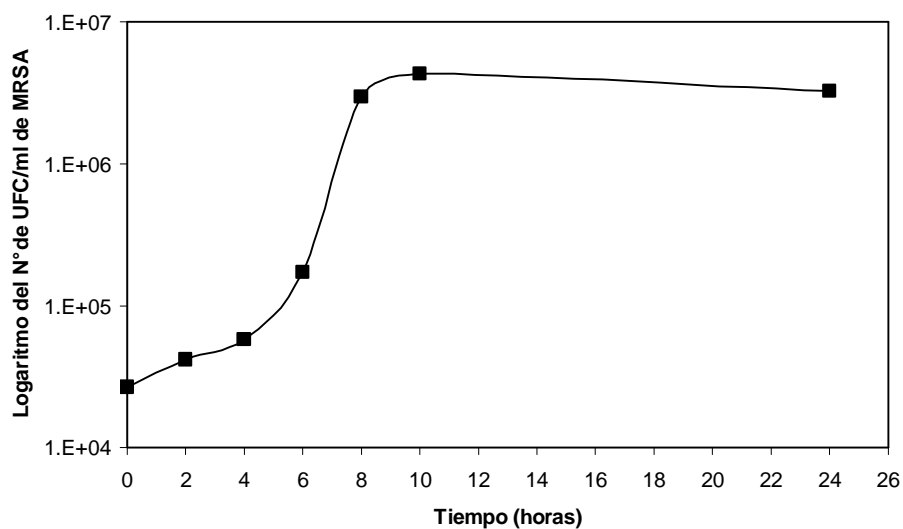


Figura 13. Cinética de crecimiento de MRSA. El inóculo estandarizado de MRSA (2.7×10^4 UFC/ml) en medio líquido (caldo LB Miller) fue incubado a 35°C por 24 h. El número de células viables fue determinado por el método de bioluminiscencia a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 h.

6.5 Curvas de Muerte Bacteriana de MRSA tratado con NPP

La concentración inicial del inóculo estandarizado de MRSA medida por bioluminiscencia fue de 2.9×10^4 UFC/ml, después de 2 horas de tratamiento con 100 µg/ml de NPP se observó una inhibición del 99% del inóculo inicial, que se mantiene hasta las 24 horas.

El tratamiento con 50 µg/ml de NPP mostró una inhibición promedio del 50% del inóculo a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas, a las 24 horas se observó una inhibición del 99%.

El inóculo tratado con 25 µg/ml de NPP mostró una inhibición promedio del 15% a las 2, 4 y 6 horas, a las 8 y 10 horas se observó una inhibición del 50% y a las 24 horas la inhibición fue del 97%, siendo consideradas estas 3 concentraciones de NPP bactericidas contra MRSA.

A una concentración de 12.5 µg/ml de NPP no se observó inhibición del inóculo hasta las 8 horas de tratamiento, al cabo de ese tiempo se pudo evidenciar una inhibición del 40% del inóculo, sin embargo a partir de la hora 10 de tratamiento se detectó un incremento del crecimiento bacteriano que sobrepasó la concentración del inóculo inicial, rumbo a un crecimiento exponencial.

Estos resultados pueden apreciarse en la figura 14.

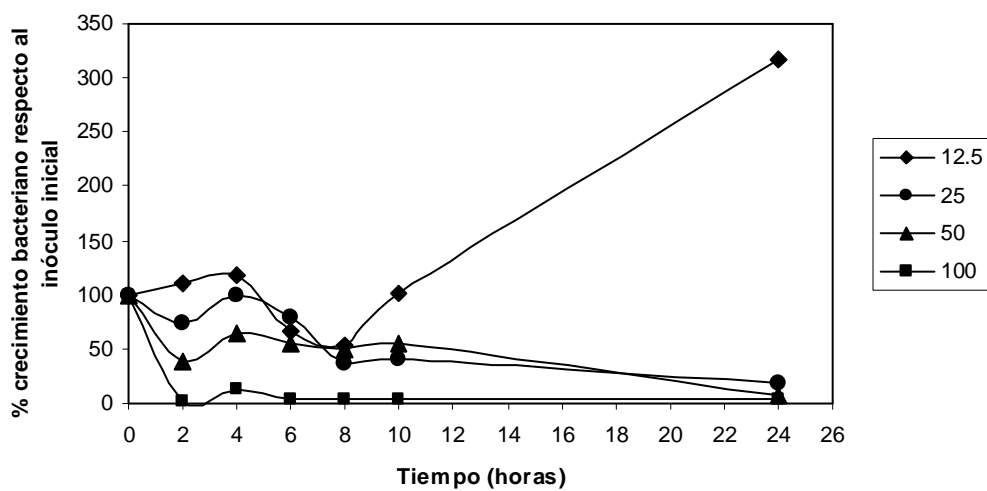


Figura 14. Curvas de muerte bacteriana de MRSA tratado con NPP. El inóculo estandarizado de MRSA (2.9×10^4 UFC/ml) fue tratado con 12.5♦, 25●, 50▲ y 100■ µg/ml de NPP e incubado a 35° C por 24 h, el número de UFC/ml fue determinado a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas después del tratamiento por el método de bioluminiscencia. Se estableció el porcentaje de crecimiento bacteriano con respecto al inóculo inicial (0 horas).

6.6 Efecto bactericida de NPP sobre MRSA en comparación con Vancomicina

La concentración bactericida mínima de NPP sobre MRSA determinada por el método de bioluminiscencia fue de 25 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la CBM de la Vancomicina sobre la misma cepa de MRSA fue de 1.6 $\mu\text{g/ml}$. A estas dos concentraciones de tratamiento no se detectó viabilidad celular de MRSA con respecto al control sin tratamiento como se observa en la figura 15.

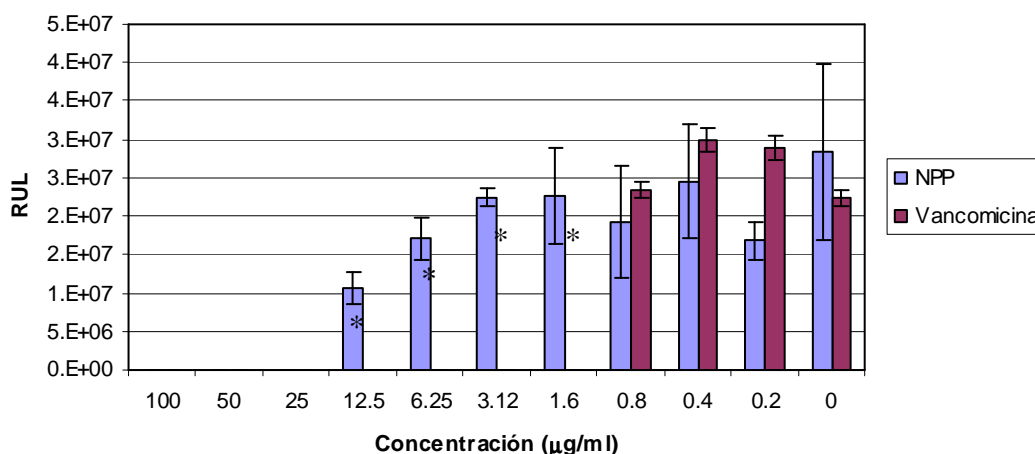


Figura 15. CBM de NPP y Vancomicina sobre MRSA. Después de 24 h tratamiento de la cepa de MRSA con diferentes concentraciones de NPP y de Vancomicina, se midió la viabilidad celular por el método de bioluminiscencia y la menor concentración en la que no detectó viabilidad celular fue considerada la CBM. Los datos corresponden a la media de los valores de RUL de 2 repeticiones \pm la desviación estándar.
* Diferencia significativa en comparación con su respectivo par ($P < 0.05$)

6.7 Concentración Mínima inhibitoria (CIM) de NPP sobre SPRE por el Método de Microdilución en Placa

En el caso particular del *Streptococcus pyogenes* resistente a Eritromicina, después de 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de NPP a 35° C se observó una inhibición de la proliferación bacteriana a una concentración mínima de 12.5 µg/ml de NPP. Estos resultados se evidenciaron por observación de turbidez del medio de cultivo y la presencia de pequeñas colonias acumuladas en el fondo de los pozos. Los cultivos tratados con 100, 50, 25 y 12.5 µg/ml de NPP mostraron una transparencia comparable visualmente con el control de esterilidad del medio, mientras que concentraciones inferiores presentaron crecimiento bacteriano comparable visualmente con el control sin tratamiento.

6.8 Concentración Mínima Bactericida de NPP sobre SPRE por el Método de MTT

La relación entre el número de UFC/ml y la densidad óptica del Azul de Formazán fue determinada por el modelo de regresión lineal, la distribución de los datos mostró una relación directa entre las dos variables con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.98 como se puede apreciar en la figura 16. Después del tratamiento de los cultivos de MRSA con diferentes concentraciones de NPP (por el método de microdilución en placa), se midió la viabilidad celular de cada pozo utilizando el método de MTT, los resultados mostraron una inhibición del 100% a una concentración mínima de 25 µg/ml (CBM), con concentraciones de NPP inferiores a ésta se encontró una viabilidad celular entre 27/ y 80% con respecto al control sin tratamiento. Figura 17.

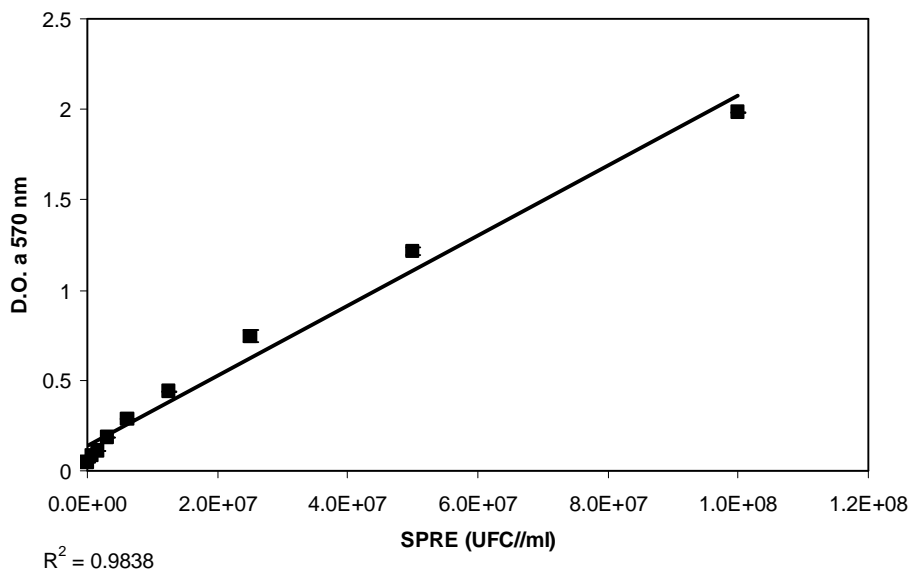


Figura 16. Relación entre el número de UFC/ml de SPRE y la D.O. del Azul de Formazán. Diferentes concentraciones de SPRE en caldo LB Miller fueron tratadas con 20 ml de MTT, lisadas con 80 ml de DMSO y las lecturas de D.O. fueron en medidas en un lector de ELISA. Los datos representan la media de las lecturas de 3 repeticiones \pm la desviación estándar.

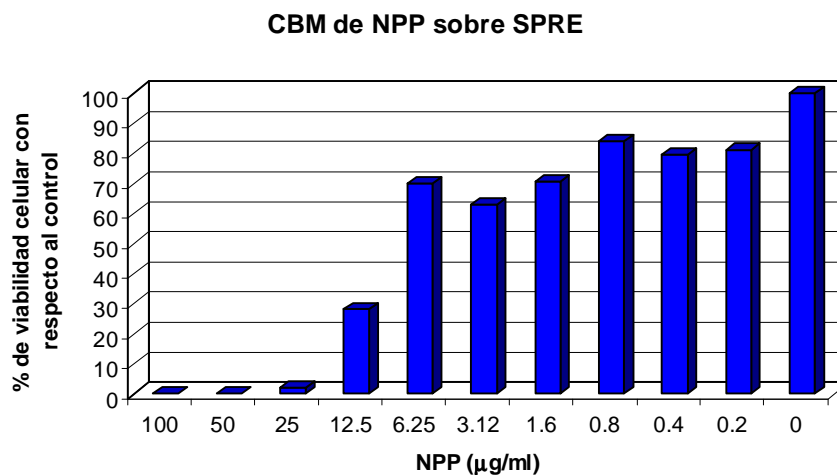


Figura 17. CBM de NPP sobre SPRE por el método de MTT. El inóculo estandarizado de SPRE (2.5×10^5 UFC/ml) fue tratado con diferentes concentraciones de NPP por 24 horas a 35°C . La viabilidad bacteriana fue medida por el método de MTT y se determinó el % de viabilidad con respecto al control sin tratamiento.

6.9 Concentración Bactericida Mínima (CBM) de NPP sobre la cepa de SPRE por el Método de Bioluminiscencia

Los resultados obtenidos por este método mostraron una inhibición del 100% del inóculo a una concentración mínima de 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP (CBM), en los cultivos tratados con concentraciones inferiores a ésta, se detectó una actividad metabólica entre 35 y 100% con respecto al control sin tratamiento como se puede ver en la Figura 18.

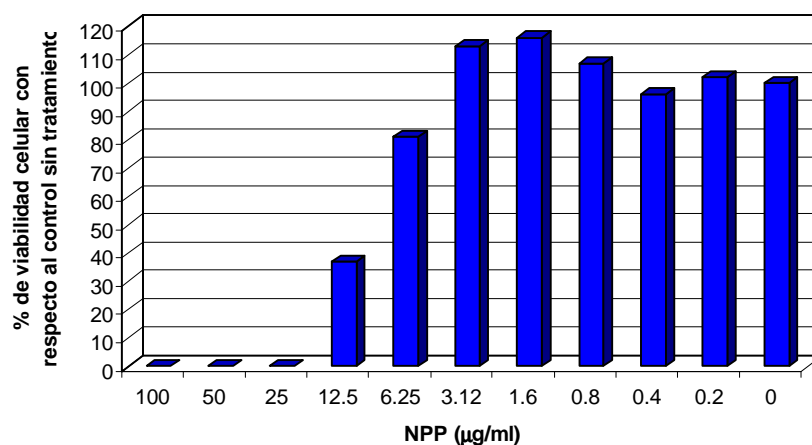


Figura 18. CBM de NPP sobre SPRE por el método de Bioluminiscencia. Se determinó la viabilidad celular de los cultivos de SPRE tratados con diferentes concentraciones de NPP midiendo la señal luminiscente emitida por el ATP bacteriano consumido en la reacción de luciferasa y se determinaron los porcentajes de viabilidad con respecto al control sin tratamiento. La menor concentración de NPP en la que no se detectó viabilidad fue considerada la CBM.

6.10 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de NPP sobre ECO157:H7-RA por el Método de Microdilución en Placa

Los resultados obtenidos por este método mostraron inhibición del crecimiento bacteriano a una concentración mínima de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de NPP, que fue evidenciado por la ausencia de turbidez en los pozos comparables visualmente con el control de esterilidad del medio.

6.11 Concentración bactericida mínima (CBM) de NPP sobre la cepa de ECO157:H7RA por método de MTT

La curva de distribución de los datos obtenidos (Figura 19), mostró una relación directa entre el número de UFC/ml de ECO157:H7RA y la densidad óptica del compuesto reducido Azul de Formazán con un coeficiente de determinación r^2 de 0.99.

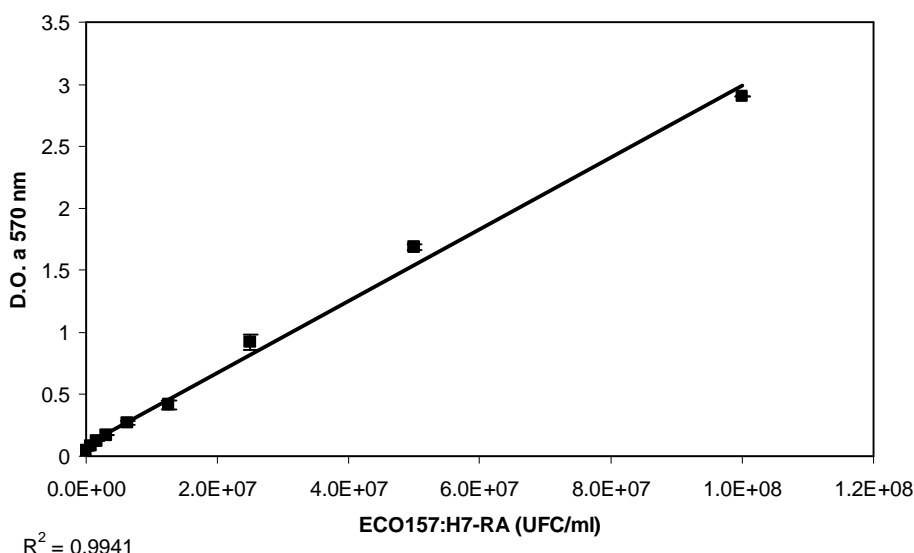


Figura 19. Relación entre el Número de UFC/ml de ECO157:H7-RA y la D.O. del Azul de Formazán. Diferentes concentraciones de la cepa de ECO157:H7-RA, fueron tratadas con 20 μl de MTT, se lisaron con 80 μl de DMSO y la D.O. del Azul de Formazán fue medida en un lector de ELISA. Los datos corresponden a la media de 4 repeticiones \pm la desviación estándar.

Los resultados del ensayo de viabilidad celular de los cultivos de ECO157:H7-RA tratados con NPP mostraron una inhibición del 100% del inóculo bacteriano a una concentración mínima de 12.5 $\mu\text{g/ml}$. A una concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP se observó una inhibición del 50% con respecto al control sin tratamiento, los tratamientos con concentraciones de 3.12 y 1.6 $\mu\text{g/ml}$ presentaron una inhibición del 42 y 8 % respectivamente y en la demás concentraciones de NPP probadas no se observó inhibición. Figura 20.

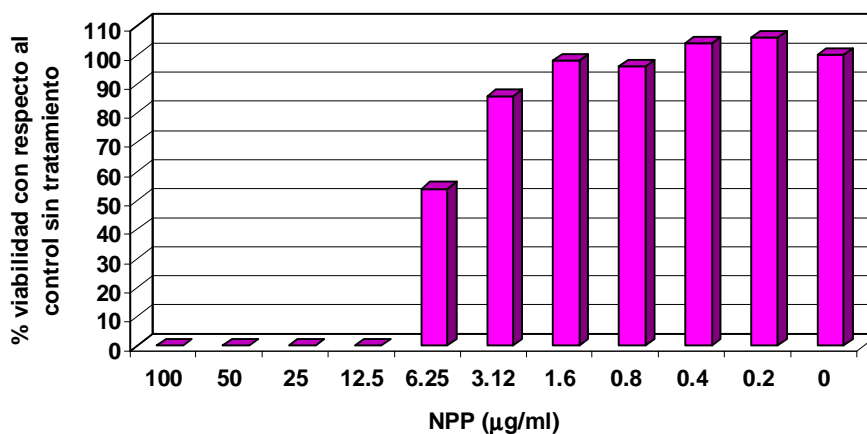


Figura 20. CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el método de MTT. El inóculo estandarizado de ECO157:H7-RA (2.5×10^5 UFC/ml) fue tratado con diferentes concentraciones de NPP por 24 h a 35°C . La viabilidad bacteriana fue medida por el método de MTT y se determinó el % de viabilidad con respecto al control sin tratamiento.

6.12 Concentración bactericida mínima (CBM) de NPP sobre ECO157:H7-RA por el Método de Bioluminiscencia

Por el método de bioluminiscencia se determinó una concentración bactericida mínima de NPP sobre ECO157:H7-RA de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, concentraciones inferiores a ésta presentaron porcentajes de inhibición menores al 50% como se observa en la Figura 21.

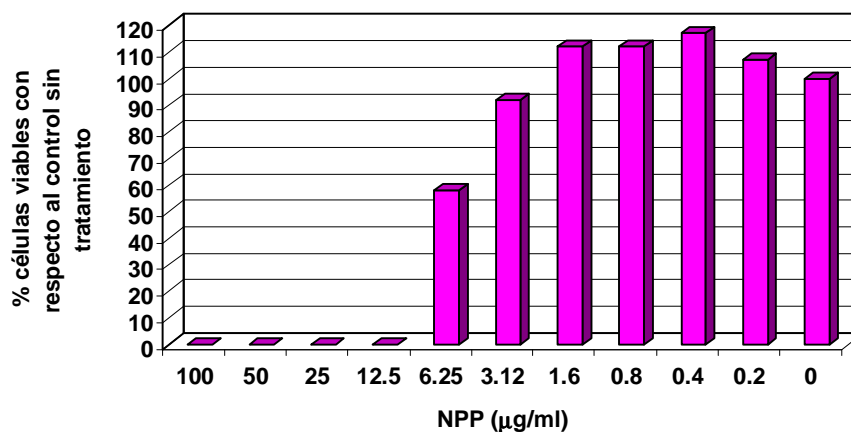


Figura 21. CBM de NPP sobre ECO157:H7-RA por el método de Bioluminiscencia. Se determinó la viabilidad celular de los cultivos de ECO157:H7 tratados con diferentes concentraciones de NPP midiendo la señal luminiscente emitida por el ATP bacteriano consumido en la reacción de luciferasa en un luminómetro y se determinaron los porcentajes de viabilidad con respecto al control sin tratamiento.

6.13 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de NPP sobre PAMR por el Método de Microdilución en Placa

Después de 24 horas de incubación de los cultivos de PAMR tratados con NPP, la concentración mínima capaz de inhibir la proliferación bacteriana en medio líquido fue de 12.5 µg/ml, la inhibición fue evidenciada por la ausencia de turbidez en los pozos, comparable con el control de esterilidad del medio.

6.14 Concentración bactericida mínima (CBM) de NPP sobre PAMR por el Método de MTT

Los datos de densidad óptica del Azul de Formazán obtenidos para diferentes concentraciones de PAMR, determinaron una relación directa entre las dos variables de acuerdo al análisis de regresión lineal simple mostrado en la Figura 22. Cuyo coeficiente de determinación r^2 fue de 0.97.

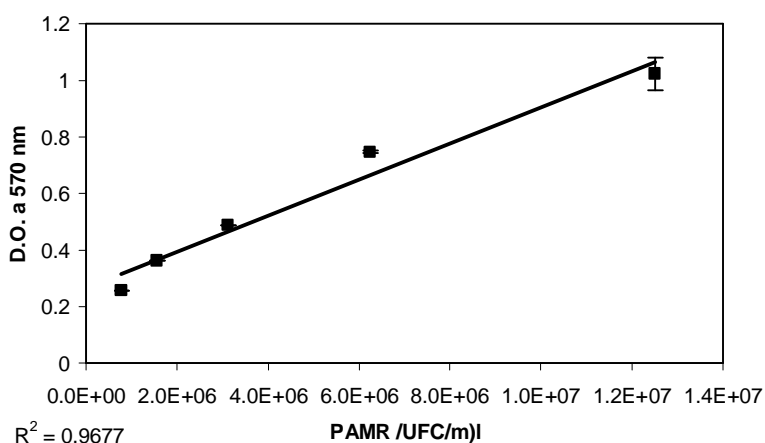


Figura 22. Relación entre el Número de UFC/ml de ECO157:H7-RA y la D.O. de Azul de Formazán. Diferentes concentraciones de la cepa de ECO157:H7-RA, fueron tratadas con 20 µl de MTT, se lisaron con 80 µl de DMSO y la D.O. del Azul de Formazán fue medida en un lector de ELISA. Los datos corresponden a la media de 4 repeticiones \pm la desviación estándar.

Después del tratamiento de los cultivos de PAMR con 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de NPP no se detectó viabilidad celular por el método de MTT, es decir que se inhibió al 100% el inóculo bacteriano. A una concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo una inhibición del 88%. El 52% del inóculo bacteriano fue inhibido con un tratamiento de 3.12 $\mu\text{g/ml}$ y a concentraciones inferiores las NPP no fueron capaces de inhibir el inóculo. Figura 23.

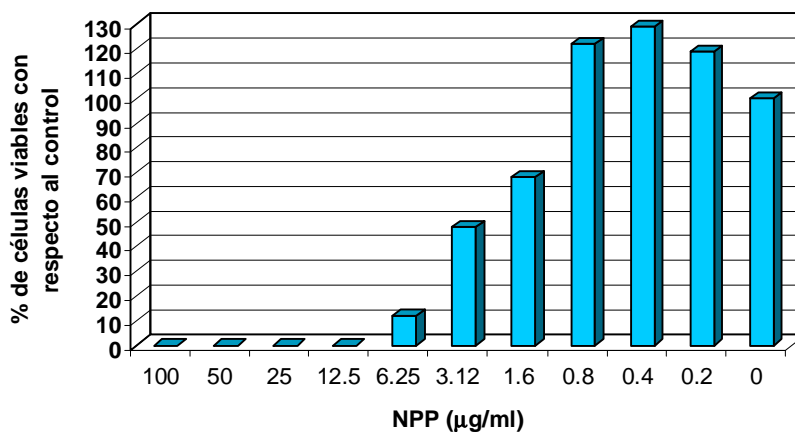


Figura 23. CBM de NPP sobre PAMR por el método de MTT. El inóculo estandarizado de PAMR (2.5×10^5 UFC/ml) fue tratado con diferentes concentraciones de NPP por 24 horas a 35°C . La viabilidad bacteriana fue medida por el método de MTT y se determinó el % de viabilidad con respecto al control sin tratamiento.

6.15 Concentración bactericida mínima (CBM) de NPP sobre PAMR por el Método de Bioluminiscencia

La viabilidad celular de los cultivos de PAMR tratados con NPP determinada por bioluminiscencia señaló una concentración bactericida mínima de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, capaz de inhibir el 100% del inóculo bacteriano. A una concentración de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ se inhibió el 94%, el 47% de la viabilidad del inóculo fue inhibida a 3.12 $\mu\text{g/ml}$ de NPP, a 1.6 $\mu\text{g/ml}$ se inhibió el 38% y las concentraciones de 0.8, 0.4 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ NPP no fueron capaces de inhibir la proliferación del inóculo. Figura 24.

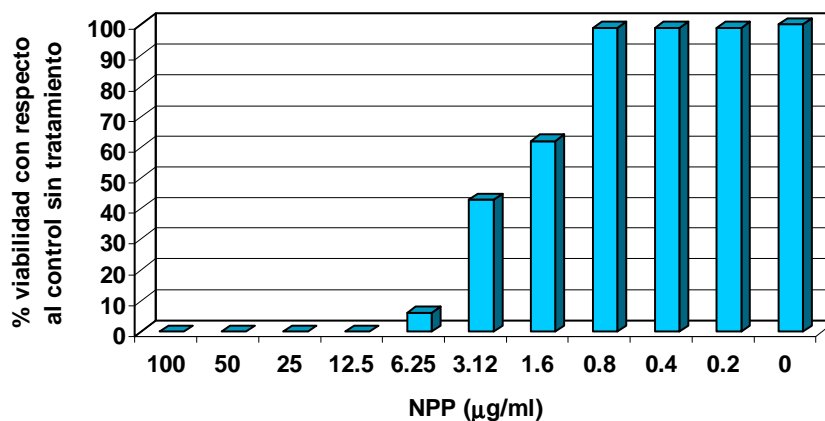


Figura 24. CBM de NPP sobre PAMR por el método de Bioluminiscencia. Se determinó la viabilidad celular de los cultivos de PAMR tratados con diferentes concentraciones de NPP midiendo la señal luminiscente emitida por el ATP bacteriano consumido en la reacción de luciferasa los resultados corresponden al porcentaje de viabilidad con respecto al control sin tratamiento.

6.16 Efecto bactericida de NPP sobre diferentes concentraciones de PAMR

Se determinó el efecto bactericida de 6 concentraciones de NPP sobre 8 inóculos diferentes de PAMR, los resultados obtenidos indicaron que las concentraciones de 100, 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de NPP fueron capaces de inhibir la proliferación de todos los inóculos probados, con 12 $\mu\text{g/ml}$ se consiguió una inhibición significativa a partir de 2.5×10^5 UFC/ml de PAMR, las concentraciones inferiores a ésta, no mostraron inhibición sobre los inóculos. (Tabla V y Figura 25).

TABLA V

Efecto bactericida de NPP sobre diferentes concentraciones de PAMR después de 24 horas de tratamiento

PAMR UFC/ml	Nanopartículas de Plata ($\mu\text{g/ml}$)						
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	0 (CST)
2×10^6	0.000 ± 0.001	0.002 ± 0.003	0.002 ± 0.004	0.663 ± 0.048	1.590 ± 0.528	2.176 ± 0.233	2.015 ± 0.143
1×10^6	0.000 ± 0.001	0.004 ± 0.003	0.004 ± 0.0001	1.592 ± 0.183	2.228 ± 0.508	2.435 ± 0.254	2.298 ± 0.215
5×10^5	0.000 ± 0.0001	0.000 ± 0.001	0.002 ± 0.004	1.476 ± 0.452	2.177 ± 0.586	2.366 ± 0.265	2.164 ± 0.410
2.5×10^5	0.000 ± 0.0001	0.004 ± 0.007	0.003 ± 0.004	0.004 * ± 0.005	1.701 ± 0.492	2.286 ± 0.625	1.952 ± 0.496
1.25×10^5	0.000 ± 0.0001	0.0018 ± 0.0019	0.0018 ± 0.0015	0.014 ± 0.011	1.212 ± 0.609	1.980 ± 0.539	2.224 ± 0.410
6×10^4	0.000 ± 0.001	0.005 ± 0.009	0.0013 ± 0.005	0.005 ± 0.004	1.172 ± 0.183	2.322 ± 0.118	2.472 ± 0.317
3×10^4	0.000 ± 0.0001	0.007 ± 0.015	0.007 ± 0.008	0.007 ± 0.004	1.170 ± 0.247	1.964 ± 0.430	2.624 ± 0.395
1.5×10^4	0.000 ± 0.0001	0.002 ± 0.004	0.014 ± 0.012	0.021 ± 0.032	0.605 ± 0.130	1.552 ± 0.554	2.378 ± 0.064

Valores de Densidad Óptica del Azul de Formazán a 570 nm después de 24 horas de tratamiento con NPP a 35° C.

Los valores representan el promedio de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales \pm la desviación estándar con respecto a la media.

* Diferencia significativa con respecto a concentraciones superiores de NPP, UFC inferiores y control ($P < 0.05$)

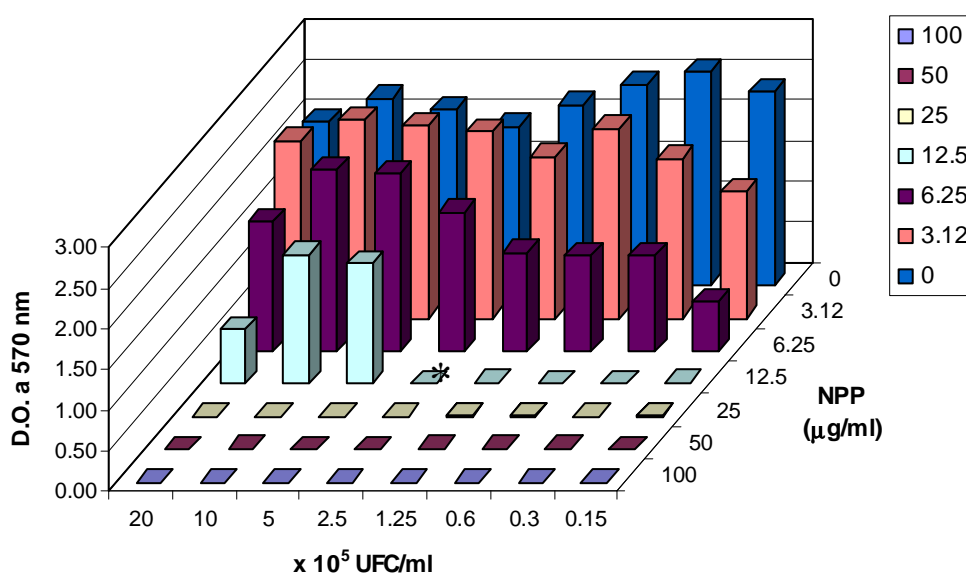


Figura 25. Efecto bactericida de NPP sobre diferentes inóculos de PAMR después de 24 horas de tratamiento. Se trataron 8 diferentes inóculos de PAMR con diferentes concentraciones de NPP, se incubaron a 35° C por 24 horas, se determinó la viabilidad celular por el método de MTT y se midieron las densidades ópticas del Azul de Formazán a 570 nm. Los valores representan la media de 4 repeticiones obtenidas en 2 ensayos individuales. * Diferencia significativa con respecto a concentraciones inferiores de NPP, superiores de UFC y al control (P<0.05).

7. DISCUSIÓN

La emergencia de cepas resistente a los antibióticos ha generado un problema de salud pública que afecta a muchos países en todo el mundo, las organizaciones de salud como la OMS, la FDA y el CDC han puesto en marcha programas destinados a la detección temprana de cepas resistentes a los antibióticos y al uso adecuado de estos compuestos como estrategias para combatir o por lo menos disminuir el desarrollo de resistencia bacteriana, por otra parte la necesidad de buscar nuevas alternativas antibacterianas capaces de actuar sobre estos microorganismos es actualmente un reto para la comunidad científica.

Se han desarrollado terapias destinadas a prevenir la selección de cepas bacterianas resistentes como la bacterioterapia, fagoterapia, las vacunas bacterianas, la utilización de péptidos catiónicos y péptidos sintéticos (D, L- α péptidos) (Kardar, 2005).

Varios compuestos con propiedades antimicrobianas están siendo evaluados como posibles alternativas para el tratamiento de bacterias resistentes a los antibióticos, muchos de ellos son sustancias químicas extraídas de plantas, de células animales y otros son compuestos inorgánicos, entre los cuales se encuentran los metales nobles como la plata, el oro, el cobre, el titanio entre los más estudiados. Los experimentos realizados por Klabunde *et al.* en el año 2002 demostraron el efecto bactericida de nanopartículas de óxidos metálicos y a partir de esos hallazgos, el interés por investigar otras nanopartículas inorgánicas como agentes antibacterianos ha incrementado considerablemente.

Las investigaciones que anteceden este trabajo pudieron evidenciar las propiedades antibacterianas de nanopartículas de plata en combinación con antibióticos β -lactámicos como la Ampicilina (Tiller *et al.*, 2002) y la Amoxicilina (Li *et al.*, 2005); y en forma independiente sobre bacterias Gram negativas como *E. coli* (Sondi y Salopek Sondi, 2004), *P. aeruginosa*, *S. typhi* y *V. cholerae* (Morones *et al.*, 2005). Estos investigadores sugirieron además la necesidad de estudiar el efecto de estos compuestos sobre otras bacterias incluyendo Gram positivas para poder evaluar su posible uso como material antibacteriano.

En base a estos datos se planteó la hipótesis de que las nanopartículas de plata serían capaces de producir un efecto bactericida sobre bacterias resistentes a los antibióticos, razón por la cual el objetivo de esta tesis fue determinar por ensayos *in vitro* las propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata, sobre cuatro cepas bacterianas resistentes a los antibióticos: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina (SPRE), *Escherichia coli* O175:H7 resistente a Ampicilina (ECO157:H7-RA) y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR), que constituyen una amenaza constante para la comunidad y cuya incidencia en los centros hospitalarios ha ido aumentando en los últimos años.

Los resultados obtenidos en las pruebas de inhibición *in vitro*, mostraron un efecto bactericida de las nanopartículas de plata sobre las cuatro cepas bacterianas estudiadas, razón por la cual se puede afirmar que se trata de un compuesto bactericida de amplio espectro que actúa sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas que además presentan resistencia a los antibióticos, este hecho no solo confirma las propiedades antibacterianas de los compuestos de plata demostradas desde hace mucho tiempo, sino también permite sugerir que estos materiales pueden ser incluso más efectivos que los antibióticos en el caso de las cepas resistentes a estos.

Sin embargo se pudo observar que el efecto bactericida de las nanopartículas de plata es diferente en las bacterias Gram negativas y Gram positivas, los resultados indican que se requiere una mayor concentración de estos compuestos para inhibir al 100% la viabilidad celular en las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas. En el año 2000 Feng *et al.* pudieron observar gracias a la microscopía electrónica que la cantidad de iones de plata presentes en la célula de *S. aureus* era menor que la que encontraron en la célula de *E. coli* después de ser tratados con AgNO_3 , ellos sugirieron que *S. aureus* podría tener un mecanismo de defensa contra iones de plata relacionado probablemente con las características estructurales de su pared celular.

Tomando en cuenta este hallazgo, se podría pensar que el fenómeno también ocurre en el caso de las nanopartículas de plata a pesar de su diminuto tamaño, debido al grosor de la pared celular de las bacterias Gram positivas que es superior al de las Gram negativas se necesitaría una mayor cantidad de estos compuestos para ingresar a la células y provocar daño celular, sin embargo los ensayos *in vitro* no son evidencias suficientes para poder afirmarlo, se requeriría un estudio de microscopía electrónica.

Por otro lado también pudo evidenciarse en este trabajo que el efecto antibacteriano de estos materiales en medio líquido depende de las concentraciones de nanopartículas de plata utilizadas así como de las UFC bacterianas que se exponen a ellas, un comportamiento similar fue descrito por Sondi y Salopek-Sondi cuando *E. coli* fue tratada con nanopartículas de plata en medio sólido. Esto es importante porque en condiciones reales la dosis infectiva para las cepas estudiadas generalmente es inferior a las UFC utilizadas en los ensayos *in vitro*.

En el caso del MRSA la dosis infectiva varía según la cepa con un promedio de 10^4 UFC que son suficientes para provocar una enfermedad sintomática *in vivo* (Vaudoaux, 2002) y según los resultados obtenidos, las nanopartículas de plata fueron capaces de inhibir concentraciones de hasta 10^6 UFC.

Por otra parte a pesar de ser desconocida la dosis infectiva de la cepa O157:H7 de *E. coli in vivo*, se presume que con la presencia de muy pocas bacterias (10 UFC o menos) en un alimento es posible producir un cuadro diarreico (MSDS, 2006), por tanto la inhibición de estas bacterias con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata evidenciada en este trabajo es un dato importante que permite afirmar que las propiedades bactericidas de estos compuestos son realmente sorprendentes.

El efecto antibacteriano de los compuestos de plata sobre *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fue documentado en varias investigaciones (Maillard and Denyer, 2006), sin embargo no se tienen datos de la acción de la plata sobre *S. pyogenes*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre una cepa resistente a Eritromicina, con resultados similares a los obtenidos para MRSA, esto sugiere que la acción antibacteriana de estos compuestos sobre las bacterias Gram positivas es independiente de la especie.

La cinética de crecimiento bacteriano y las curvas de muerte bacteriana en el caso de MRSA indican que el efecto bactericida de las nanopartículas de plata se hace evidente después de 2 horas de tratamiento, el grado de inhibición con respecto al tiempo esta relacionado con la concentración de nanopartículas utilizadas, todas las concentraciones consideradas bactericidas inhiben el 100% del inóculo inicial después de 24 horas incubación.

En complementación a los resultados obtenidos sobre MRSA, se comparó el efecto bactericida de NPP con Vancomicina, el antibiótico de elección para este microorganismo, los resultados obtenidos mostraron una clara diferencia entre ambos compuestos ($P < 0.05$) probablemente porque el mecanismo de acción de la vancomicina involucra una inhibición de la síntesis de la pared celular.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las nanopartículas de plata poseen propiedades bactericidas de amplio espectro, siendo capaces de actuar sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
2. El efecto bactericida de nanopartículas de plata *in vitro* sobre bacterias Gram positivas es diferente en comparación con las Gram negativas.
3. El efecto bactericida de nanopartículas de plata *in vitro* sobre Gram positivas y Gram negativas es independiente de la especie.
4. El efecto bactericida de nanopartículas de plata *in vitro* sobre MRSA, SPRE, ECO157:H7-RA y PAMR es independiente de los mecanismos de resistencia antimicrobiana que presentan estas bacterias sobre ciertos antibióticos.
5. Las nanopartículas de plata son capaces de producir un efecto bactericida *in vitro* sobre concentraciones bacterianas superiores a las dosis infectivas de MRSA y ECO157: H7.RA.
6. Se requiere un tiempo de 2 a 8 horas de tratamiento para lograr un efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre MRSA según la concentración del compuesto utilizada.
7. El efecto bactericida de nanopartículas de plata sobre MRSA es comparable con el obtenido por la Vancomicina (el antibiótico de elección) con una diferencia significativa.

9. PERSPECTIVAS

El interés que se tiene por estudiar las diferentes propiedades de las nanopartículas de plata es grande en la actualidad, precisamente porque aún son desconocidos muchos factores involucrados en ellas, como se ha podido comprobar las propiedades antibacterianas de estos compuestos son bastante interesantes y la posibilidad de su uso como agentes bactericidas cada día es mayor. Sin embargo todavía queda mucho por descubrir, por una parte el mecanismo molecular por el cual estos compuestos llevan a cabo sus propiedades antibacterianas es una de las líneas de investigación a la que están enfocados algunos investigadores, no obstante los resultados que se tiene hasta ahora no permiten todavía definir con claridad cómo es que las células bacterianas son destruidas por estos materiales.

Por otra parte no se han reportado suficientes estudios en modelos animales, por lo que es necesario diseñar estrategias experimentales que incluyan la determinación de las propiedades antibacterianas de estos compuestos *in vivo*, que además de consolidar lo que ya se ha demostrado *in vitro*, permitiría evaluar los posibles efectos de toxicidad de estos materiales para poder considerarlos o no como verdaderas alternativas terapéuticas en humanos.

Como se mencionó en los antecedentes, existen varios métodos para obtener este tipo de nanomateriales, por lo que sería interesante realizar un estudio comparativo para determinar cuál de estos métodos resaltaría mejor las propiedades antibacterianas de estos compuestos. Dentro de esta perspectiva podrían estar incluidos los métodos biosintéticos que involucran la utilización de bacterias, hongos y plantas para sintetizar nanopartículas de plata.

Finalmente, a pesar de que se ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen propiedades bactericidas en contra de bacterias que presentan diferentes patrones de resistencia, es importante recordar que el fenómeno de la resistencia bacteriana es una característica que ha permitido a las bacterias adaptarse a numerosos cambios en su medio ambiente y por tanto a sobrevivir por millones de años en este planeta, por lo que se debe tener presente esa posibilidad principalmente para promover una utilización responsable de estas alternativas nuevas, considerando que pueden llegar a solucionar el problema de resistencia antimicrobiana que es una realidad actual.

LITERATURA CITADA

Aracil B, Alós JI, 2000. *Streptococcus pyogenes* Resistente a los Macrólidos. Revisiones Temáticas: Bacteriología, Control de Calidad, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. Disponible en el sitio red: http://www.seimc.org/control/revi_bacter/fenotm.htm. [Revisado el 1 de Diciembre de 2000].

Angus BL, Carey AM, Caron DA, Kropinski AB, Hancock EW. 1982. Outer Membrana Permeability in *Pseudomona aeruginosa*: Comparison of Wild-Type and Antibiotic-Supersusceptible Mutant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 21: 299 – 309.

Aymonier C, Schlotterbeck U, Antonietti L, Zacharias P, Thomann R, Tiller JC, Mecking S. 2002. Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties. *Chemistry Communication*. 10: 3018-3019.

Bhattacharya D, Gupta RK. 2005. Nanotechnology and Potential of Microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 199- 204.

Bhol KC, Schechter PJ. 2004. Topical nanocrystalline silver cream supresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *British Journal of Dermatology* 152: 1235-1242.

Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, Samore MH. 1999. Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomona aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 1379 – 1382.

Carr HS, Woldkowski TJ, Rosenkrank HS. 1973. Silver Sulfadiazine: *In vitro* Antibacterial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 4: 585- 587.

CDC. 2005. Campaign to Prevent Antimicrobial Resistance in Healthcare Settings [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov> . [Revisado el 15 de Septiembre de 2005].

Chambers HF. 2001. The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*. 7: 178- 182.

Coward JE, Carr HS, Rosenkranz HS. 1973. Silver Sulfadiazine: Effect on the Ultrastructure of *Pseudomona aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3: 621- 624.

Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Hase CC. 2002. Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46: 2668-2670.

Emerich DF, Thanos CG. 2003. Nanotechnology and Medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3: 655-663.

Euroresidentes, 2000. Diccionario de Nanotecnología. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/diccionario/diccionario.htm>. [Revisado en Noviembre de 2000]

Ewald A, Glückermann SK., Thull R, Gbureck U. 2006. Antimicrobial titanium/silver PVD coating on titanium. *Biomedical Engineering On Line* 5:22.

Feynman R. 1991. There is Plenty of Room at the Bottom, *Science* 254: 1300 – 1301.

Freitas RA. 2002. The future of nanofabrication and molecular scale device in nanomedicine, *Studies in Health Technology and Informatics* 80:45-59.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. 2000. A mechanistic study of antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52: 662-668.

Furno F, Morley KS, Wong B, Sharp BL, Arnold PL, Howdle SM, Bayston R, Brown PD, Winship PD, Reid HJ, 2004. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54: 1019-1024.

Gómez AC, Leal CA, Pérez de GM, Navarrete JM. 2000. Mecanismos de Resistencia en *Pseudomona aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. [Internet] Universidad Nacional de Colombia. Disponible en el sitio de red: <http://www.unal.edu.com>. [Revisado en Agosto de 2003].

Gupta A, Phung LT, Taylor DE, Silver S. 2001. Diversity of Silver Resistance genes in IncH Incompatibility Group Plasmids. *Microbiology*. 147: 3393 – 3402.

Gutiérrez WC. 2005. Las Nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear*. El ININ hoy 24-29.

Holister P, Weener JW, Román C, Harper T. 2003. Nanoparticles. *Científica*. 3: 1-11.

Holt KB, Bard AJ. 2005. Interaction of Silver (I) Ions with the Respiratory Chain of *Escherichia coli*: An Electrochemical and Scanning Electrochemical Microscopy Study of Antimicrobial Mechanism of Micromolar Ag^+ . *Biochemistry* 44: 13214 – 13223.

Kardar S. 2005. Antibiotic Resistance: New Approaches to a Historical Problem. *ActionBiosciencie.org* [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.actionbioscience.org> [Revisado en Marzo de 2005].

Kim TN, Feng QL, Kim JO, Wu J, Wang H, Chen GQ, Cui FZ. 1998. Antimicrobial Effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxiapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 9: 129-134.

Klabunde KJ, Stoimenov PK, Klinger Rosalyn L, Marchin GL, 2002. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir* 18: 6679-6686.

Koneman EW, Allen AD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 2002. *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana: Madrid, pp 1281-1283.

Li P, Li J, Wu Ch, Wu Q, Li J 2005. Synergistic Antibacterial Effects of β -lactam antibiotic combined with Silver Nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 1912- 1917.

Li XZ, Livermore DM, Nikairo H. 1994. Role of Efflux Pump(s) in Intrinsic Resistance of *Pseudomona aeruginosa*: Resistance to Tetracycline, Cloramphenicol and Norfloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38: 1732 – 1741.

Li XZ, Ma D, Livermore DM, Nikairo H. 1994. Role of Efflux Pump(s) in Intrinsic Resistance of *Pseudomona aeruginosa*: Active Efflux as a Contributing Factor to β - lactam Resistance. *Antimicrobial .Agents and Chemotherapy*, 38: 1742 – 1752.

Li XZ, Nikairo H, Poole K. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in Antibiotic Efflux in *Pseudomona aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 948 – 1953.

Li XZ, Nikairo H, Williams KE. 1997. Silver-Resistant Mutans of *Escherichia coli* Display Active Efflux of Ag^+ and Are Deficient in Porins. *Journal of Bacteriology* 179: 6127 – 6132.

Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. 1997. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology* 25: 279-283.

Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-X, Sun H, Tam PK-H, Chiu J-F, Che C-M. 2005. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research* 5: 916- 924.

Maillard JY, Denyer SP. 2006. Focus on Silver. *European Wound Management Association Journal* 6: 5- 7.

Malhotra-Kumar S, Lammens C, Chapelle S, Wijdooghe M, Piessens J, Van-Herck K, Goossens H. 2005. Macrolide- and Telithromycin- resistant *Streptococcus pyogenes*, Belgium 1999- 2003. *Emerging Infectious Diseases* 11: 939- 942.

Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. 2003. Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with that of Silver Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4278 – 4281.

McDonnell G, Russell DA. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clinical Microbiology Review*. 12: 147-179.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman JM. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16: 2346-2353.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 2006. The Problem of Antimicrobial Resistance Exploring. [internet] Disponible en el sitio de red: <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/antimicro.htm>.

[Revisado en Abril del 2006]

Rangel JM., Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11: 603- 609.

Reyes SM, Durán TC, Prado V. 2004. Perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos en cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) aisladas de infecciones humanas y de alimentos. *Revisión Médica de Chile* 132: 1211-1216.

Salata OV. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology* 2:3.

Salyers AA, Whitt DD. 2002. How Bacteria Become Resistant to Antibiotics. *Bacterial Pathogenesis a Molecular Approach*. 11:168-181.

Sondi I, Salopek S. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 177-182.

Srikumar R, Li X, Poole K. 1997. Inner Membrane Components are Responsible for β -lactam Specificity of Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179: 7875- 7881.

Torroba L, Rivero M, Otermin I, Gil A, Iruin A., Maraví-Poma E, García JJ, 2000. Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: MRSA, GISA y VRE. *Anales* 23: 69-80.

Thom SM, Horobin RW, Seidler E, Barer MR, 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of Applications Bacteriologic* 74: 433-443.

Tsipouras N, Rix CJ, Brady PH. 1997. Passage of silver ions through membrana-mimetic materials, and its relevance to treatment of burn wounds with silver sulfadiazine cream. *Clinical Chemistry* 43: 290-301.

Virta M, Lineri S, Kankaanpää P, Karp M, Peltonen K, Nuutila J, Lilius E. 1998. Determination of Complement-Mediated Killing of Bacteria by Viability Staining and Bioluminescence. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 515-519.

Ziha-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechere J, Plesiat P. 1999. In Vivo Emergence of Multidrug-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Overexpressing the Active Efflux System MexA-MexB-OprM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 287 – 291.

Zhang J, Liu X. 2002. Study on tetrazolium salt colorimetric assay for growth and survival of bacteria. *Wei Sheng Yan Jiu* 31: 361 - 363.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Mónica Marcela Jerez Urriolagoitia

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: EFECTO BACTERICIDA DE NANOPATÍCULAS DE PLATA SOBRE
MICROORGANISMOS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS *IN VITRO*.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida el 10 Agosto de 1978 en la ciudad de Potosí-Bolivia, hija
de Andrés Clemente Jerez Vera y Miriam Urriolagoitia La Fuente.

Educación: Egresada de la Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco
Xavier de Chuquisaca con el título de Licenciada en Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas.

Experiencia Profesional: Bioquímica de medio tiempo en el “Policonsultorio 18 de
Mayo” perteneciente a la Caja Nacional de Salud (La Paz – Bolivia)
durante el periodo 2003-2004.