

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

NADA HUMANO ME ES AJENO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Desarrollo de un antibacterial (Anti-nanobiotic) para el tratamiento
de infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* basado en
la combinación de antibiótico y nanopartículas**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A :

DIEGO JEOVANI HUERTA FLORES

Director: Dr. José De Jesús Olivares Trejo

Codirectora: Dra. Norma Velázquez Guadarrama

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, marzo de 2025

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO

Presidente: Dr. José De Jesús Olivares Trejo

Secretario: Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Vocal: Dra. Norma Velázquez Guadarrama

COMITÉ TUTORIAL

Director

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Profesor investigador. Posgrado en Ciencia Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Codirectora

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Investigadora en Ciencias Médicas,

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Lectores

Dra. Helena Solleiro Villavicencio

Licenciatura en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

Licenciatura en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez

Licenciatura en Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

La presente tesis fue llevada a cabo en el laboratorio 4 del posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México plantel del valle estuvo bajo la dirección del doctor José de Jesús Olivares Trejo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo contó con el apoyo financiero de la beca para Impresión y/o Empastado de Trabajo Recepcional o Tesis 2025 de la UACM.

Agradezco la Universidad Autónoma de la Ciudad de México la cual me permitió llevar una formación en la licenciatura de Ciencias Genómicas en el plantel del Valle.

Agradezco al **Dr. José de Jesús Olivares Trejo** por permitirme formar parte de su línea de investigación y darme un lugar en su laboratorio al igual que tener la paciencia para explicarme los procedimientos que yo no entendía sin su guía yo no hubiese logrado este trabajo de titulación.

Agradezco a la **Dra. Norma Velázquez Guadarrama** por recibirme en su laboratorio en el Hospital Infantil Federico Gómez, y permitirme colaborar con su línea de investigación la cual me ayudó mucho para avanzar en mi trabajo de titulación le estere eternamente agradecido.

Agradezco a todos los Doctores del posgrado de Ciencias Genómicas gracias por enseñarme y orientarme durante toda mi formación académica.

Quiero agradecer a todos mis amigos de la licenciatura en Ciencias Genómicas gracias por su compañía durante todo este tiempo, gracias a mi primera amiga en la licenciatura **Itzel Hernández Palacios** me gustó mucho pasar todo este tiempo contigo las horas se me iban volando, a mis amigas **Lu, Angela, Dulce, Astrid y Elisa** que pase los mejores momentos con ellas, al igual con que con mis amigos **Abner, Brenda, Augusto, Enrique, Mónica, Karen, Gerardo, Geraldine, Estefanía, Ricardo, Xochiketzalli, Ziukan y Nancy Cecilia** mi compañera en los trabajos en equipo gracias por ayúdame todo este tiempo, gracias chicos por hacer que el semestre fuera un recuerdo y no un mal momento.

Finalmente, y no menos importante agradezco a Dios infinitamente por prestarme la vida y avanzar en mis estudios académicos.

Dedicatoria

A mis queridos padres Gabriel Huerta Méndez y Alicia Flores Cruz muchas gracias por haberme apoyado durante todo este tiempo, con esto concluyo mis estudios y les dedico este trabajo a ustedes gracias por todo. **“Disculpa si no logre lo planeado”**

También quiero agradecer a mis hermanas Gabriela Huerta Flores, Vanessa Huerta Flores y Yatziri Arwen Huerta Flores, que me apoyaron constantemente durante todos mis estudios y siempre estuvieron a mí como mis mejores amigas gracias por estar para mí. **“Las quiero mucho”**

También quiero agradecer a Alfredo Campoy por ser un buen compañero de laboratorio, amigo, maestro y hermano gracias por compartir todo tu conocimiento conmigo y motivarme a seguir estudiando para alcanzar nuevas metas. **“No lo hubiese logrado sin ti”**

Índice

I. Índice de tablas.....	11
II. Índice de figuras	12
III. Abreviaturas.....	14
IV. Resumen.....	15
V. Introducción	16
1. Epidemiología.....	16
2. Enfermedades causadas por <i>S. pneumoniae</i>	17
2.1 Otitis media.....	17
2.2 Neumonía.....	18
2.3 Meningitis	18
3. Características de <i>S. pneumoniae</i>	18
5. Estructura de <i>S. pneumoniae</i>	19
5.1 Cápsula	20
5.2 Pared bacteriana.....	20
5.2.1 Fase citoplásmica.....	20
5.2.2 Fase de transporte de precursores	21
5.2.3 Fase organización estructural del peptidoglucano.....	21
5.3 Membrana celular	21
6. Tratamiento.....	22
7. Tratamientos alternativos	22
8. Vacunas.....	22
9. Resurgimiento de bacterias.....	23
10. Nanotecnología.....	24
11. Nanopartículas metálicas	24
12. Mecanismo de acción de las AuNP's.....	25
14. Clasificación de los antibióticos.....	27
15. Penicilina G.....	28
15.1 Mecanismo de acción de la penicilina G	29
15.2 Toxicidad.....	29
16. Eritromicina.....	30
16.1 Mecanismo de acción	30

16.2 Usos.....	31
16.3 Toxicidad.....	31
17. Ceftriaxona.....	31
17.1 Mecanismo de acción de la ceftriaxona.....	32
17.2 Toxicidad.....	32
18. Bacterias resistentes a antibióticos.....	32
19. Mecanismo de resistencia de <i>S. pneumoniae</i> a los distintos antibióticos.....	34
VI. Hipótesis.....	34
VII. Justificación.....	34
VIII. Objetivo.....	35
1. Objetivo General.....	35
2. Objetivos particulares.....	35
IX. Esquema general de trabajo.....	36
X. Materiales y métodos.....	37
1. Determinación de la pureza y viabilidad de <i>S. pneumoniae</i>	37
1.1 Cepa bacteriana.....	37
1.2 Pruebas bioquímicas.....	37
1.3 Prueba de la catalasa.....	37
1.4 Tinción de Gram.....	37
2. Curva de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	38
3. Síntesis de AuNP's.....	38
4. Caracterización de AuNP's.....	39
5. Determinación del rendimiento de la síntesis de las AuNP's.....	39
6. Obtención del concentrado de AuNP's.....	40
7. Esterilidad de las AuNP's.....	40
8. Determinación de la potencia de los antibióticos.....	40
9. Determinación de concentración mínima inhibitoria de los antibióticos y las AuNP's sobre <i>S. pneumoniae</i>	41
10. Recubrimiento de AuNP's con Poly(ethylene glycol) dithiol.....	42
11. Síntesis de los nano-antibiotic.....	42
12. Caracterización del nano-antibiotic.....	42
13. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del nano-antibiotic.....	42
14. Línea celular NL-20.....	43

15. Determinación de morfología de la línea celular NL-20	43
XI. Resultados.....	44
1. Pruebas bioquímicas para determinación de pureza de <i>S. pneumoniae</i>	44
1.1 Curva de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	45
2. Síntesis de AuNP's de 20 nm	45
3. Caracterización de las AuNP's.....	46
4. Determinación del rendimiento de la síntesis de AuNP's	46
5. Esterilidad de las AuNP's.....	47
6. Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos	48
7. Concentración mínima inhibitoria de las AuNP's.....	48
8. Recubrimiento de las AuNP's con Polietilenglicol ditiol.....	50
9. Caracterización de la AuNP's + PEG ditiol.....	51
10. Cuantificación del antibiótico unido a las AuNP's	52
11. Funcionalización de las AuNP's + PEG ditiol con antibiótico.....	55
12. Síntesis del nano-antibiotic	55
13. Caracterización de los nano-antibiotic	56
14. CMI de los nano-antibiotic.....	58
15. Morfología de la línea celular NL-20.....	58
XII. Discusión	63
XIII. Conclusiones	66
XIV. Referencias.....	67

I. Índice de tablas

Tabla 1. Tipos de antibióticos existentes, clasificación y nombre comercial.

Tabla 2. Promedio de síntesis de AuNP's mediante el método de reducción química.

Tabla 3. Densidad óptica de distintas concentraciones de penicilina G.

Tabla 4. Densidad óptica de distintas concentraciones de Eritromicina.

Tabla 5. Densidad óptica de distintas concentraciones de Ceftriaxona.

Tabla 6. Antibiótico encontrado en los lavados.

II. Índice de figuras

Figura 1. Características de *S. pneumoniae*.

Figura 2. Representación de las estructuras de *S. pneuminiae*.

Figura 3. Esquema de las posibles funcionalizaciones de las AuNP's.

Figura 4. Mecanismo de acción de las AuNP's.

Figura 5. Estructura química de la penicilina G.

Figura 6. Estructura química de la eritromicina.

Figura 7. Estructura química de la ceftriaxona.

Figura 8. Resistencia obtenida.

Figura 9. Procedimiento realizado para la síntesis de la AuNP's mediante reducción química.

Figura 10. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae*.

Figura 11. Curva de curva de crecimiento de *S. pneumoniae* de la cepa 49619.

Figura 12. Espectrofotometría de las AuNP's.

Figura 13. Determinación de la esterilidad de las AuNP's.

Figura 14. Prueba de CMI de AuNP's en *S. pneumoniae*.

Figura 15. Curva de crecimiento de *S. pneumoniae* con AuNP's.

Figura 16. Cultivo agar sangre de la placa de 96 pozos.

Figura 17. Estructura química del Polietilenglicol ditiol.

Figura 18. Esquema de la funcionalización de las AuNP's con el PEG ditiol

Figura 19. Espectrometría comparativa.

Figura 20. Curva estándar de eritromicina, penicilina G y ceftriaxona.

Figura 21. Espectrometría comparativa.

Figura 22. Línea celular NL-20 con tinción de Giemsa.

Figura 23. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* a 2, 4 y 6 h.

Figura 24. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y AuNP's a 2, 4 y 6 h.

Figura 25. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y penicilina G a 2, 4 y 6 h.

Figura 26. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y el nano-antibiotic (penicilina G) a 2, 4 y 6 h.

III. Abreviaturas

µg	Microgramos
µl	Microlitros
AuNP´s	Nanopartícula de oro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
h	Horas
min	Minutos
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
NP´s	Nanopartícula
O.D	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización panamericana de la salud
PBP	Proteína de unión a la penicilina
PEG ditiol	Polietilenglicol ditiol
RPM	Revoluciones por minuto

IV. Resumen

Streptococcus pneumoniae es una de las principales bacterias que causan neumonías a nivel mundial, afectando principalmente a niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años, de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS), es considerada un problema de salud pública. Cuando se presenta una infección por *S. pneumoniae*, el tratamiento consiste en el uso de antibióticos betalactámicos, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, etc. Sin embargo, el uso frecuente de antibióticos y tratamientos no concluidos, ha llevado a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos. Las terapias alternativas para el tratamiento de infecciones por *S. pneumoniae* han llevado a la investigación a buscar distintas formas de combatir estas infecciones neumocócicas.

El uso de las nanopartículas metálicas ha demostrado tener propiedades bactericidas únicas, destacando que las bacterias no generan una resistencia hacia estas, si bien entre las nanopartículas metálicas, la que más llamo el interés fueron las nanopartículas de oro (AuNP's) debido a que no tiene un efecto tóxico para el organismo, al igual que estas son fáciles de funcionar con distintos fármacos proteínas etc.

La funcionalización de las AuNP's con antibiótico en nuestra investigación mostró tener efectos bactericidas sobre *S. pneumoniae*, requiriendo menores cantidades de AuNP's y antibiótico, esta unión recibió el nombre de nano-antibiotioc, al comprobar si tenían efecto sobre la línea celular NL-20 infectada con *S. pneumoniae*, el nano-antibiotic mostró que no genera un cambio morfológico sobre la línea celular NL-20 pero si un efecto bactericida sobre *S. pneumoniae*, a diferencia del uso de las AuNP's solas mostraron tener un efecto tóxico sobre la línea celular NL-20, generando una lisis celular debido a las altas cantidades.

V. Introducción

Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* son causantes de muerte de aproximadamente 4 millones de personas anualmente **(Gea, 2021)**. La vacunación contra los neumococos, implementada desde el año de 1911, introducía células muertas de neumococos para generar una inmunidad contra esta infección; no obstante, aun así, se reportaban muertes causadas por *S. pneumoniae*. Después con el surgimiento de los antibióticos se dejaron de utilizar este tipo de vacunas, no obstante, durante la época de los sesenta se consideró implementar la vacunación nuevamente debido a que el índice de mortalidad por bacteriemia neumocócica era del 20%, implementando las nuevas vacunas basadas en la introducción de 14 serotipos distintos de la bacteria.

S. pneumoniae se considera un patógeno oportunista, que está presente en la microbiota de la nasofaringe, orofaringe y del tracto respiratorio **(Kim y col 2017)**. Aún con métodos preventivos como la vacunación y tratamientos con antibióticos dirigidos a *S. pneumoniae*, se ha observado que las infecciones se mantienen presentes con un pequeño incremento en el número de personas que la padecen, esto debido a que *S. pneumoniae* ha generado distintos mecanismos de evasión para contrarrestar esos tratamientos **(Lozada y col, 2024)**.

En consecuencia, con la vacunación son menos frecuentes los procesos infecciosos por este tipo de microorganismos; de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera de prioridad media por su resistencia a diversos antibióticos, principalmente betalactámicos y su reemplazo de serotipo, lo cual deja inservibles a las vacunas **(Ospina y col 2023, Jesudason, 2024)**. Por lo tanto, existe una gran necesidad de contar con tratamientos seguros y eficaces contra este tipo de infección.

1. Epidemiología

S. pneumoniae es una bacteria que afecta principalmente las vías aéreas superiores (nasofaringe y faringe). Comúnmente se encuentra en todo el epitelio respiratorio, el cual es fácil de aislar en personas sanas. La presencia de esta bacteria puede variar entre el 5 y 80% en las personas que no presentan síntomas de la infección de *S. pneumoniae*; debido a la distinta patogenicidad que pueden poseer las distintas cepas

de *S. pneumoniae* y como reaccione el sistema inmune del hospedero ante la infección. Afecta principalmente a personas de la tercera edad (mayores 60 años) y niños (menores de 6 años). En algunos casos puede afectar a personas inmunocomprometidas (infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inmunosupresión, enfermedades crónicas como diabetes, enfermedades respiratorias y consumo de sustancias que comprometan la homeostasis) **(Muñoz 2018)**.

Normalmente, la vía de transmisión de *S. pneumoniae* es mediante aerosoles generadas por personas infectadas y que son expulsados al toser, hablar o estornudar; hacen posible que estas gotículas pueden estar suspendidas en el aire por 30 minutos, lo cual facilita su entrada al sistema respiratorio, alcanzando los alveolos más fácilmente, para generar una posible infección del parénquima pulmonar **(Short y col 2012)**. *S. pneumonie* es sensible tanto a temperaturas altas y bajas, al igual que es propenso a la muerte por desecación, lo cual requiere que la transmisión sea mediante el contacto estrecho de persona a persona.

Anualmente, en Latino América se registran 72,000 muertes generadas por neumonía, la mayoría de estas son de origen bacteriano; de acuerdo a la organización panamericana de salud (OPS) *S. pneumonie* es la causa de 20,200 muertes anuales las cuales 16,960 son causadas por neumonía mientras que 3,220 son causadas por meningitis **(Corredera 2018)**.

Los costos anuales para el tratamiento de infecciones causadas por *S. pneumonie* se estima que van des de los 138 millones de dólares en países en vías de desarrollo mientras que en países como Estados Unidos los costos pueden ser de 5 a 6 billones de dólares **(Sierra y col, 2006)**.

2. Enfermedades causadas por *S. pneumoniae*

2.1 Otitis media

La otitis media es una característica de la infección causada por virus o bacterias; normalmente se presenta en niños y es poco frecuente en adultos. Cuando se presenta la infección esta puede generar inflamación del oído medio, pérdida de la audición,

acumulación de mucosa o líquido en el oído medio, siempre se presenta acompañado de dolor y pérdida del equilibrio **(Schilder y col 2016)**.

2.2 Neumonía

La neumonía es una infección que inflama al parénquima pulmonar, afectando la porción distal de las vías respiratorias, también afecta a los alveolos, bronquios y tejido intersticial. La neumonía genera la acumulación de líquido entre la pared torácica y los pulmones, lo cual produce dificultad para respirar acompañado de dolor, la neumonía sólo se presenta cuando el neumococo genera adherencia y empieza a colonizar las vías respiratorias **(Weiser, 2016)**.

2.3 Meningitis

La meningitis es la inflamación del sistema meníngeo, el cual es el encargado de cubrir el cerebro y la médula espinal. El sistema meníngeo está conformado por 3 tejidos distintos, el más externo es la duramadre, la cual es la más cercana al hueso encargada de cubrir todo el cerebro; la capa intermedia es la aracnoides, que es una capa que asemeja la tela de araña, de ahí su nombre, y su función principal es permitir el drenaje del líquido cefalorraquídeo al espacio subaracnoideo. La capa más interna es la piamadre, que es la capa que recubre al sistema nervioso central, separando los vasos sanguíneos del espacio subaracnoideo **(Yaghoobi y col, 2024)**.

3. Características de *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae, fue identificado en 1881 simultáneamente en Francia por Pasteur y en Estados Unidos por Sternberg. Su nombre *pneumoniae* fue otorgado en 1886 debido a que era la principal causa de neumonía lobar **(Ferrer 2006)**. *S. pneumoniae* es una bacteria Gram positiva (Figura 1 A), capsulada, presenta forma esférica, las células presentan un tamaño entre 0.5 a 1.2 μm , posee una disposición en pares (diplococo), es aerobia facultativa y es inmóvil **(Preado 2001)**. Cuando es cultivada en medio agar sangre presenta α hemólisis debido a la producción de la enzima pneumolisina encargada de destruir parcialmente la membrana de los glóbulos rojos esta acción genera biliverdina que se observa como un halo verdoso alrededor de la colonia (Figura 1 B) **(McDevitt y col, 2020)**; es una bacteria catalasa negativa, porque no posee a estas enzimas que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua

(Lopardo 2014). A pesar de ser un microorganismo anaerobio facultativo, la presencia de CO₂ a concentraciones de 8 a 10 % favorece su crecimiento en ambientes con una temperatura de 30 a 37 °C (Martínez 2005). Para la identificación de *S. pneumoniae* se pueden realizar diferentes pruebas fenotípicas y bioquímicas como sensibilidad a la optoquina y en presencia de sales biliares se genera una lisis bacteriana, lo cual nos da una confirmación de la presencia de *S. pneumoniae* (Ercibengoa 2021). A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de *S. pneumoniae*.

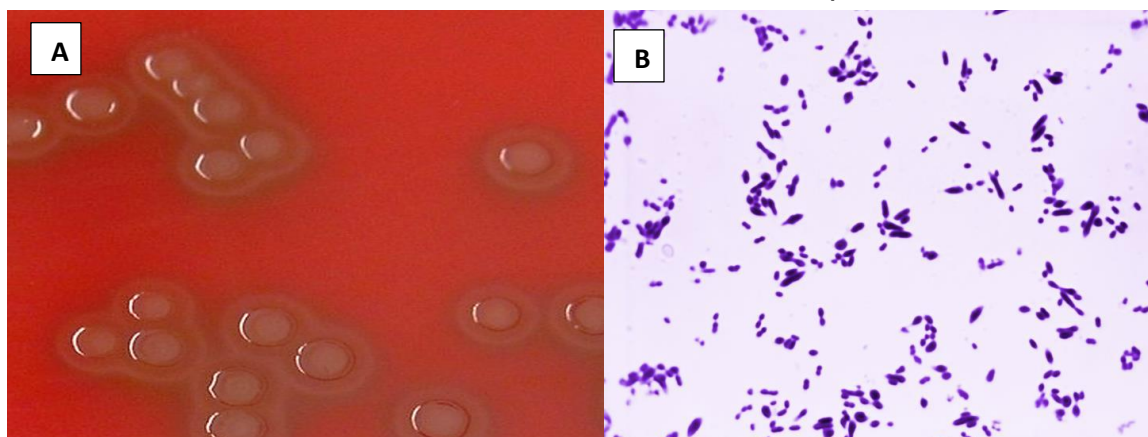


Figura 1. Características de *S. pneumoniae*. A) *S. pneumoniae* crecida en medio agar sangre véase que se forman pequeñas colonias circulares, rodeadas de un halo correspondiente a la α -hemólisis. B) Tinción Gram de *S. pneumoniae* se presentan una tinción de color violeta debido a la presencia de una pared gruesa conformada de polipéptido glucano. (<https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/streptococcus-pneumoniae>)

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae

Género: Streptococcus

Especie: pneumoniae

5. Estructura de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae está conformado principalmente por tres estructuras las cuales son cápsula, pared y membrana (Figura 2).

5.1 Cápsula

Es la parte más exterior de la bacteria, rodea completamente la pared celular y está compuesta por oligosacáridos que pueden variar entre los 2 a los 10 monosacáridos, todos ellos son sintetizados en el citoplasma y son transportados a la superficie de la bacteria por transferencia de membrana celular; la composición de la cápsula puede variar mucho entre cepas del mismo género, lo cual ha permitido clasificar a más de 90 serotipos capsulares diferentes **(Gil y col, 2022., Manna y col, 2024)**. La presencia de cápsula está fuertemente relacionada con la virulencia de la bacteria, le aporta protección a la bacteria contra células fagocíticas, impide la adherencia a las células fagocitarias, asimismo la cápsula ayuda a las bacterias a retener líquidos y evitar la desecación **(López 2022., Marquart 2021)**.

Debido a la variabilidad capsular que puede presentar *S. pneumoniae* se estima que un individuo tiene más de 90 infecciones a lo largo de su vida, causadas por *S. pneumoniae*, esto debido a que el sistema inmune genera una respuesta específica hacia un antígeno específico de una cepa con la que se ha estado infectado previamente, no obstante, a causa de la variación de la cápsula el sistema inmune no es capaz de detectar la nueva infección de *S. pneumoniae* **(Hernández 2020., Engholm y col 2017)**.

5.2 Pared bacteriana

La pared bacteriana está constituida por peptidoglicano el cual tiene subunidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acilmurámico, que se entrelazan por enlaces peptídicos, que presentan un grosor de entre 40-80 nm, el cual ayuda a la estabilización de *S. pneumoniae* ya mantener la presión celular que existe dentro del citoplasma; asimismo, al ser una pared bastante gruesa ayuda a la resistencia a los distintos antibióticos puesto que muchos de estos no son capaces de internalizarse a través de la pared bacteriana. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 fases:

5.2.1 Fase citoplásmica

En el citoplasma bacteriano se sintetizan los precursores del peptidoglucano a partir de diferentes elementos: como uridindifosfato N-acetil-glucosamina (UDP-NAG), ácido fosfoenolpirúvico, uridin trifosfato (UTP) y NADH, a partir de los cuales se forma el ácido uridindifosfato-N-acetilmurámico (UDP-NAM). Después son unidos a un azúcar

de un aminoácido en la que se alternan las formas L y D y en la que los dos últimos conforman el dipéptido D-alanin-D-alanina *S. pneumoniae* (Calvo, 2009). En esta fase la síntesis de precursor de peptidoglucano actúa la fosfomicina y la cicloserina.

5.2.2 Fase de transporte de precursores

El desarrollo de la membrana citoplásmica y el transportador lipídico se hará cargo del precursor formado en el citoplasma y lo hará atravesar la membrana citoplásmica.

5.2.3 Fase organización estructural del peptidoglucano

Los precursores de peptidoglucano se acomodan con la ayuda de distintas enzimas de superficie como la transglicosilasas, carboxipeptidasas, endopeptidasas y transpeptidasas conocidas como proteínas fijadoras de penicilina.

5.3 Membrana celular

Es una bicapa lipídica de un grosor de 8 a 10 nm compuesta por fosfolípidos, fosfatidilglicerol, cardiolipina, glucosil diglicérido y galactosil, en la membrana celular también podemos encontrar diferentes proteínas.

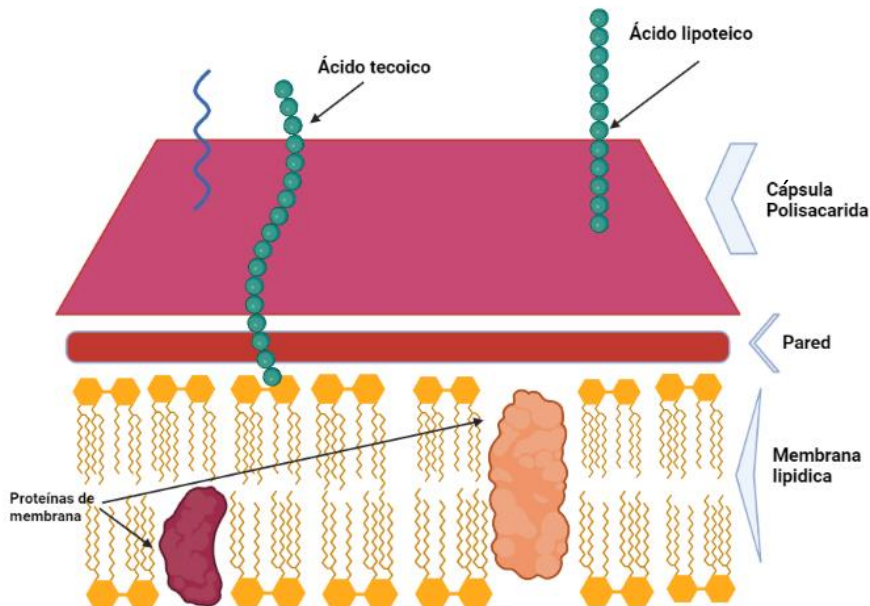


Figura 2. Representación de las estructuras de *S. pneumoniae*. Capsula polisacárida es parte más externa de la bacteria en ella puede encontrarse distintos oligosacáridos. Pared es la parte intermedia de la bacteria y esta está conformada principalmente por péptidoglucano. Membrana lipídica es la parte más interna de la bacteria y está conformada principalmente por dos capas lipídicas en estas puede encontrarse proteínas que sirven como transporte o sirven para procesos metabólicos.

6. Tratamiento

Las enfermedades causadas por neumococos normalmente se tratan con antibióticos de amplio espectro de primera generación como la penicilina, no obstante, en los años sesenta comenzaron a surgir cepas con menor susceptibilidad a los antibióticos de primera generación. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de estas cepas resistentes a la penicilina oscilaban entre el 0.12 a 8 µg/ml estas cepas se encontraban comúnmente en tratamientos sin éxito en personas que presentaban neumonía y meningitis **(Knupp y col, 2024)**.

Cuando un individuo presenta una infección causada por *S. pneumoniae*, la forma en que el sistema inmune combate esta infección es mediante la fagocitosis, células como macrófagos y neutrófilos fagocitan a *S. pneumoniae*, y lo destruyen mediante enzimas y radicales libres dentro de los fagolisosomas, el sistema del complemento también puede eliminar la infección mediante la opsonización este proceso depende de la interacción de anticuerpos (IgA, IgM, IgG), que se adhieren a la superficie del patógeno lo cual genera que células fagocíticas sean capaces de reconocerlas y eliminarlas. Cuando el sistema inmune no es capaz de eliminar la infección debido a que el patógeno evade la respuesta inmune o el sistema inmune se encuentre suprimido debido al uso de inmunosupresores, se presente VIH o los macrófagos no son suficientes o eficaces para combatir las infecciones neumocócicas, se hace uso de medicamentos **(Ruiz y col, 2024)**.

7. Tratamientos alternativos

Pese a que existen varios tratamientos alternativos como el uso de los péptidos antimicrobianos (PAM), bacteriófagos, antibióticos de segunda y tercera generación, el uso de nanopartículas de oro (AuNP's) es el que ha despertado mayor interés en la comunidad científica debido a que se ha observado que posee propiedades antimicrobianas de amplio espectro contra distintas bacterias **(Naranjo y col 2024)**.

8. Vacunas

El desarrollo de vacunas contra los neumococos va dirigido principalmente al reconocimiento de la cápsula polisacárida, sin embargo, debido a la gran variabilidad de capsulas inmunogénicas (serotipos) en *S. pneumoniae* dificulta el desarrollo de una

vacuna que cubra gran parte de las infecciones causadas por *S. pneumoniae*, no obstante, el desarrollo de una vacuna se enfoca más en la prevalencia y virulencia del serotipo existente en el momento. Actualmente existen dos vacunas contra los neumococos la vacuna neumocócica polisacárida (PPSV23) y la vacuna neumocócica conjugada (PCV13).

La vacuna PPSV23 se introdujo en 1983, contiene 23 polisacáridos capsulares diferentes no conjugados contra los neumococos más virulentos los cuales representan el 90% de infecciones entre ellos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F); esta vacuna ha demostrado una eficacia del 74% (**Blamey, 2014**), en la prevención de enfermedades neumocócicas invasivas, asimismo la vacuna no induce la respuesta inmune dependiente de las células T, generando una inexistencia de memoria en las células T, lo cual genera un periodo limitado de protección posterior a la vacunación (**Cripps y col 2021**).

La vacuna neumocócica conjugada (PCV13) fue introducida en la cartilla nacional de vacunación de México en el año 2012, la cual contiene los trece distintos polisacáridos capsulares neumocócicos los cuales son (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A), todos conjugados a la proteína transportadora (proteína de difteria CRM197).

La aplicación de la vacuna estimula la respuesta inmune T dependiente y a las células dendríticas, las cuales fagocitan a los antígenos y los presentan a los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD4+ envían señales directamente a través de las interacciones de proteínas de superficie celular o indirectamente por medio de liberación de citocinas a los linfocitos B, el resultado de estas interacciones generan la proliferación y diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas y la producción de anticuerpos con alta afinidad. Así, la estimulación de la respuesta inmune T dependiente genera una protección más duradera y una respuesta más rápida en caso de una exposición al antígeno (**Serrano y col 2024**).

9. Resurgimiento de bacterias

Actualmente, se ha observado el incremento de infecciones causadas por neumococos, pese a que existen vacunas que otorgan inmunidad se ha observado

que los neumococos no vacúnales han tenido un incremento; este cambio en la distribución de serotipos se debe a que los existentes reemplazan a los que son eliminados mediante la vacunación. No obstante, antes de la vacunación y el uso de los antibióticos se ha observado que los neumococos sufren un cambio o intercambio en el *locus* del gen responsable de la síntesis de polisacárido, lo que genera un cambio completamente o parcial de serotipo, generando que las vacunas queden obsoletas. Aún no está claro si la vacunación es completamente el responsable del intercambio de serotipo dominante en el momento o el uso de los antibióticos **(Koelman y col, 2020)**.

10. Nanotecnología

La nanotecnología es la innovación de materiales y dispositivos funcionales a una escala de 1 a 100 nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$) donde las propiedades físicas, químicas y biológicas de los materiales cambian. Además, estas dimensiones nos permiten interactuar a nivel celular o molecular con un grado alto de especificidad **(Grimaldi 2008)**.

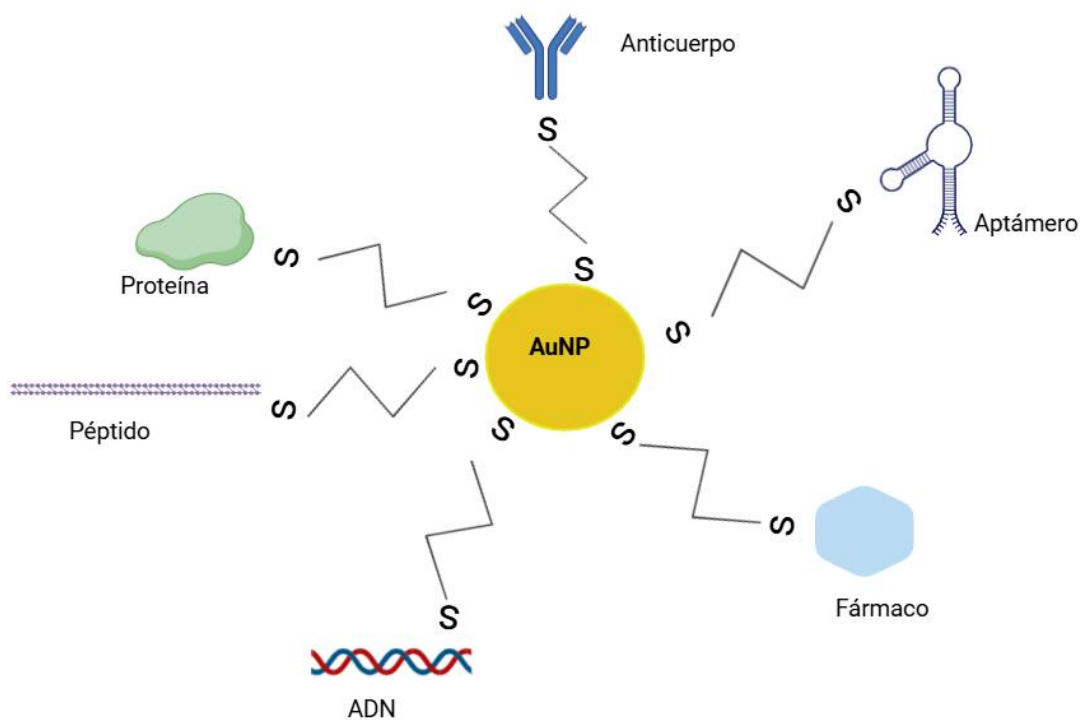
11. Nanopartículas metálicas

El término nanopartícula (NP's) se utiliza para referirse a partículas de una dimensión que va de 1 a 100 nanómetros. Actualmente existen diversos tipos de nanopartículas metálicas como de oro, plata, cobre, titanio y zinc. Las propiedades de las NP's difieren dependiendo del material, tamaño, forma, geometría y superficie. **(Oroz 2009, Wing 2006)**.

Las NP's de plata inhiben el crecimiento de hongos y bacterias, ya que el tamaño de estas NP's ayuda a que estas interaccionen con la superficie de la bacteria, generando alteraciones en su morfología y funcionamiento dando como resultado la muerte celular en un corto periodo de tiempo **(Oroz 2009)**.

Las NP's de cobre son uno de los ejemplos más interesantes debido a que ha atraído el interés industrial debido a su bajo costo de producción, y sus propiedades antimicrobianas son muy similares a la de las nanopartículas de plata **(Cedano 2018)**.

Las nanopartículas de oro (AuNP's) destacan por sus propiedades físicas, químicas y biológicas; resultan ser menos tóxicas y se pueden producir de diferentes tamaños. Dependiendo del tamaño de las AuNP's, sus propiedades pueden cambiar, debido a que son fáciles de funcionar con diversos materiales como anticuerpos, proteínas, fármacos, material genético (ARN-ADN), etc. Esto ha generado un gran interés sobre el uso de las AuNP's (Figura 3.) (Mateo y col 2013).



Created in BioRender.com 

Figura 3. Esquema de las posibles funcionalizaciones de las AuNP's. El grupo tiol es fundamental para la funcionalización de las AuNP's debido a la afinidad de este por el oro.

12. Mecanismo de acción de las AuNP's

Las AuNP's tienen propiedades anti bacterianas y durante mucho tiempo se han estudiado los diferentes efectos tóxicos que estas poseen. Varios estudios han atribuido que el efecto antimicrobiano de las AuNP's se debe al tamaño de las NP's y su forma esférica. Aunque los mecanismos de acción de las AuNP's no se conocen con certeza, en el 2019 se reportó que las AuNP's tenían un efecto antimicrobiano

contra *S. pneumoniae*, y que el mecanismo de acción de las AuNP's consta en la formación de cuerpos de inclusión, donde las AuNP's con un tamaño de 20 nm, interaccionan con la bacteria en un medio líquido debido a una cierta afinidad a la superficie de la bacteria; así, las AuNP's se aglomeran en la superficie de la bacteria y estas se internalizan dentro de ella generando un cuerpo de inclusión el cual lleva fragmentos de la pared celular. La bacteria al presentar este daño en su superficie, no lo puede reparar y se genera la lisis del microorganismo (Figura 4) (Ortiz y col 2019).

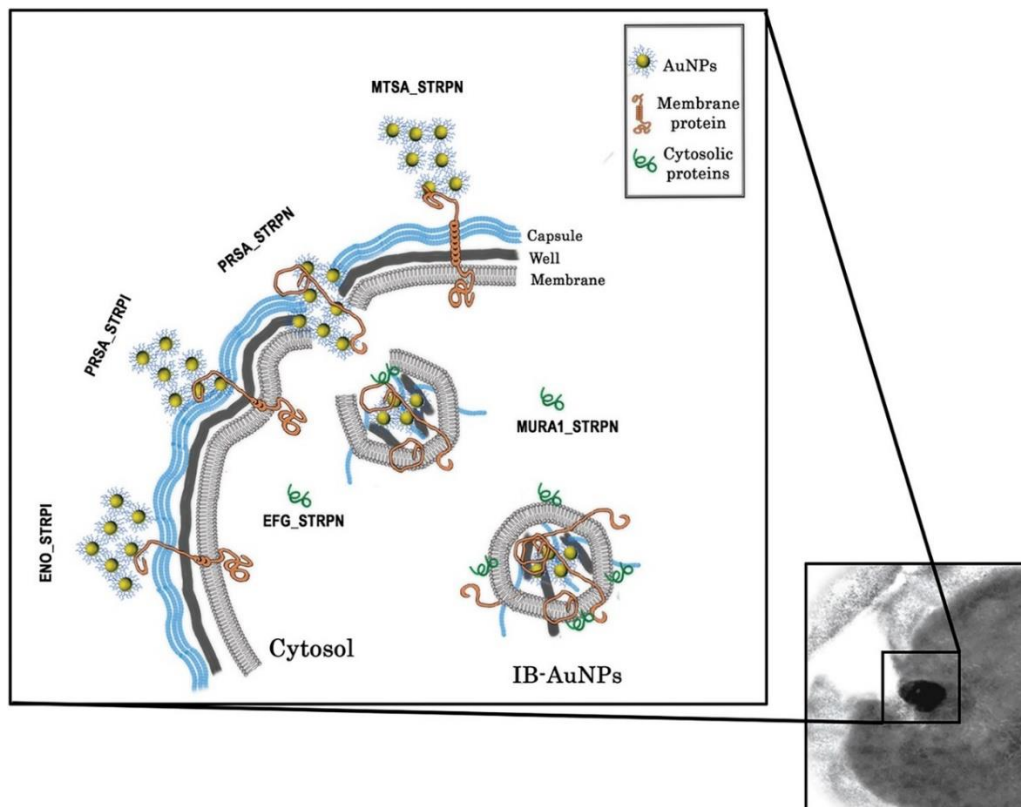


Figura 4. Mecanismo de acción de las AuNP's: Las AuNP's son capaces de unirse a distintas proteínas de superficie de *S. pneumoniae*, las cuales se empiezan a aglomerar en la superficie de la bacteria posterior mente estas ejercen una fuerza mecánica la cual perfora la membrana de la bacteria y estas se introducen al interior de la bacteria formando un cumulo de AuNP's recubierto por membrana de la bacteria mejor conocido como cuerpo de inclusión, la bacteria al sufrir este daño mecánico no tiene mecanismo de reparación ante este daño y se genera una muerte debido al daño en la membrana.

Una de las ventajas del uso de las AuNP's es que estas no generan bacterias resistentes a los antibióticos debido a que su mecanismo de acción se considera mecánico y no químico, distintos estudios han demostrado que la funcionalización de las AuNP's con antibióticos mejora el efecto bactericida de ambos, generando un efecto sinérgico, capaz de matar bacterias resistentes a antibióticos (Saha y col, 2007).

13. Antibióticos

Desde que Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928 y hasta la fecha se han desarrollado un sin fin de medicamentos antimicrobianos (Tabla 1), lo cual trajo una revolución a los tratamientos de infecciones patológicas **(Letek 2020)**.

14. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos reciben diferentes tipos de clasificación, uno de ellos es según su espectro de acción este puede ser amplio o reducido, espectro amplio es el cual actúa sobre varias especies y géneros diferentes y espectro reducido es el cual solo actúa sobre un grupo reducido de especies en específico **(Russell 2004)**.

Otra clasificación de los antibióticos es según su mecanismo de acción, en esta los diferentes antibióticos son clasificados con base en la inhibición de distintos sitios esenciales para su replicación, esta clasificación abarca la inhibición de la formación de la pared bacteriana, síntesis de proteínas, membrana citoplasmática, duplicación del ADN e inhibición de distintas vías metabólicas **(Okuda, 2015)**.

Los antibióticos pueden dividirse en dos grupos aquellos que son capaces de matar a las bacterias se conocen como bactericidas, mientras que los antibióticos que no son capaces de matar a la bacteria, pero si logran suprimir su crecimiento son considerados como bacteriostáticos; la eliminación de la bacteria depende del sistema inmune para dentro de la persona, algunos antibióticos bacteriostáticos pueden actuar como bactericidas esto dependiendo de la concentración **(Pankey y col, 2004)**.

Tabla 1. Tipos de antibióticos existentes, clasificación y nombre comercial.

Tipo	Ejemplo de antibiótico
Anfenicoles	Cloranfenicol
Oxazolidinona	Linezolid, tedizolid
Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina y dalvabancina
Rifamicinas	Rifabutina, Rifampicina y Rifaximina
Macrólidos	Azitromicina, Eritromicina, Claritromicina, Roxitromicina, Espiamicina Acetil, Josamicina, Midecamicina y Diacetil
Lincosamidas	Clidamicina y Lincomicina
Nitroimidazol	Metronidazol y Tinidazol
Tetraciclinas	Primera generación: tetraciclina clorhidrato Segunda generación: doxiciclina minociclina Tercera generación: oxitetraciclina tigeciclina
Miscelánea	Ácido fusídico, bacitracina, gramicidina tirotricina y bedaquilina
β-lactámicos	Becipenicilina, fenoximetilpenicilina, isoxazolilpenicilinas, aminopenicilinas y ureidopenicilinas
Glucopéptidos	Vancomicina, teicoplanina y dalvabancina
Amino glucósidos	Estreptomina, neomicina, amikacina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, capreomicina y paromomicina
Quinolonas	Ácido nalidíxico

15. Penicilina G

La penicilina G o bencilpenicilina es un antibiótico perteneciente al grupo de los betalactámicos y perteneciente a la clasificación de los bactericidas. Su estructura química consiste en un anillo de tiazolidina unido a un anillo β -lactámico, al que está unido una cadena lateral (R). El núcleo de la penicilina es el principal requerimiento estructural para la actividad biológica. La cadena lateral determina muchas de las

características antibacterianas y farmacológicas de un tipo determinado de penicilinas (Figura 5) (Chandel y col, 2008).

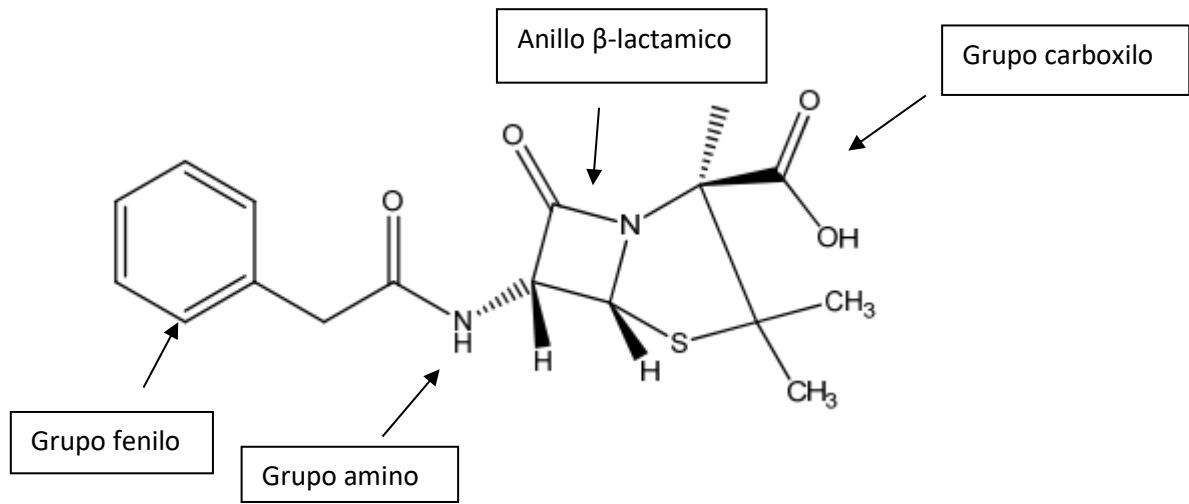


Figura 5. Estructura química de la penicilina G y sus distintos grupos funcionales

15.1 Mecanismo de acción de la penicilina G

La penicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana este proceso depende de que la molécula sea capaz de unirse a diferentes proteínas de unión a la penicilina (PBP), tales como las transpeptidasas responsables del entrecruzamiento de las cadenas del peptidoglicano uniendo grupos aminos de las cadenas donadoras a la D-alanina terminal del peptidoglucano, endopeptidasas encargadas de la terminación y carboxipeptidasas que se encarga de la elongación, distribuidas a través de la membrana plasmática. La unión de la penicilina a estas enzimas las bloquea comprometiendo su función en las distintas etapas de síntesis de la pared bacteriana como terminación, remodelación de la pared bacteriana, causando que la pared se debilite y se genere una lisis de la misma, la penicilina es muy eficaz contra microorganismo que están en un estado de crecimiento y replicación, pero es ineficaz en los organismos que se encuentran en un estado latente (Sugimoto y col, 2002).

15.2 Toxicidad

Las reacciones adversas a la penicilina G son muy comunes, se estima que aproximadamente del 3 al 10 % de las personas presentan alergia a los antibióticos betalactámicos, uno de los efectos secundarios en su uso es que genera, vómito, diarrea, fiebre, exantema, nefritis intersticial, hepatotoxicidad y neurotoxicidad en

casos de hipersensibilidad se pueden presentar urticaria, angioedema y anafilaxia (Arslan y col, 2006).

16. Eritromicina

Fue descubierta por Manuel Alexander Mc Guire en 1952, fue aislada de una cepa de *Streptomyces erythreus* en la isla de Panay. La eritromicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los macrólidos, es una polihidroxiketona de peso molecular de 733 g/mol y su fórmula molecular es $C_{37}H_{67}NO_{13}$, la molécula de eritromicina tiene una desosamina un grupo amino azúcar y un azúcar sin nitrógeno (cladinosa) y unidos a ellos hay un anillo lactonicomacroclícico (Figura 6). Aunque la eritromicina es un bacteriostático, se ha visto que a concentraciones altas *in vitro* este se comporta como un bactericida (Martínez y col, 2002).

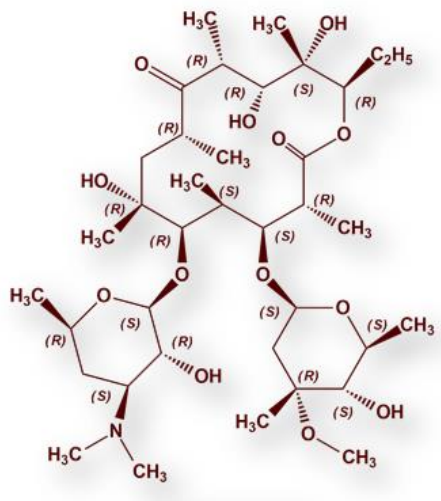


Figura 6. Estructura química de la eritromicina

16.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la eritromicina consta de interferir en la síntesis de proteínas mediante la unión a la subunidad 50s ribosomal bloqueando la reacción de translocación; cabe destacar que debido a que los ribosomas bacterianos y los del humano difieren entre ellos esto permite que la eritromicina solo actúe en bacterias. También es considerado como un fuerte inhibidor del citocromo CYP3A4 y de la glicoproteína P. Se absorbe de manera parcial a nivel del intestino delgado superior, es capaz de difundirse a través de fluidos intracelulares, permitiendo tener una

actividad inhibitoria en todos los sitios excepto en cerebro y el líquido cefalorraquídeo esto debido a que no puede atravesar la barrera hematoencefálica **(Araya y col, 2019)**.

16.2 Usos

La eritromicina es empleada para tratar varias infecciones bacterianas, su eficacia es mayormente en bacterias Gram positivas como *Legionella*, *Streptococcus*, *Bordetella*, *Campylobacter* y *Helicobacter*, en el caso de las bacterias Gram negativas, presentan una mayor resistencia a este antibiótico debido a que no puede atravesar la pared celular, no obstante, es eficaz contra algunas bacterias Gram negativas como *Proteus mirabilis* que carecen de pared celular **(Curry y col, 2001)**.

16.3 Toxicidad

Sus efectos adversos comúnmente son a nivel gastrointestinal debido a que la eritromicina es inactivada por los ácidos gástricos, también puede generar arritmias cardíacas, que generan la prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular, y fibrilación ventricular **(Stafstrom y col, 1995)**.

17. Ceftriaxona

La ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación, tiene un peso molecular de 554.58 g/mol su fórmula molecular es $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$, su vía de administración es intramuscular e intravenosa, este antibiótico es muy efectivo contra bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, aunque su efectividad es menor en bacterias Gram-negativas, la ceftriaxona es muy empleada contra infecciones *Enterobacteriaceae* resistentes a múltiples fármacos, por excelencia se emplea en infecciones de tracto urinario, tracto respiratorio, bacteriemia/septicemia, infecciones de la piel y meningitis pediátrica, la ceftriaxona posee un anillo betalactámico y un anillo dihidrotiazínico (Figura 7).

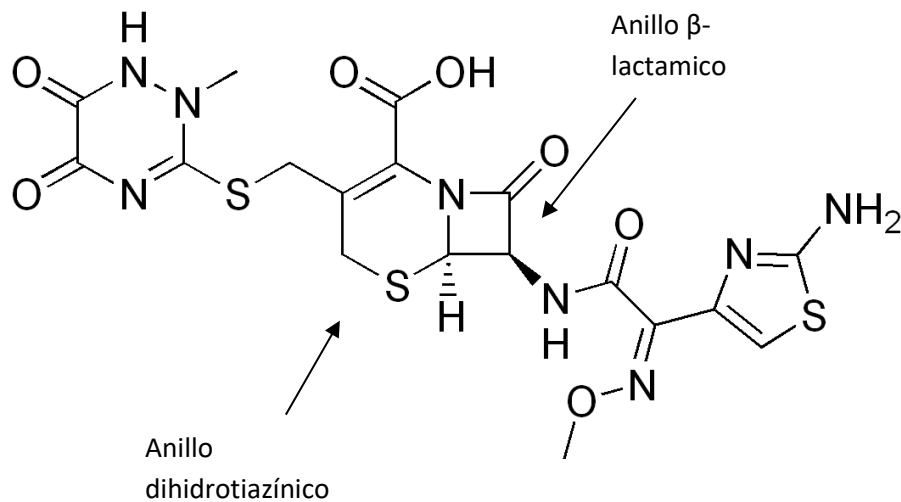


Figura 7. Estructura química de la ceftriaxona

17.1 Mecanismo de acción de la ceftriaxona

La ceftriaxona actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular, mediante la unión a las PBP, inhibiendo las enzimas transpeptidasas, responsables de la formación de enlaces cruzados de las cadenas de los péptidos de la pared celular, así mismo la ceftriaxona también activa la autolisina, generando una degradación de la pared celular llevando a las bacterias a la lisis celular.

17.2 Toxicidad

Los efectos secundarios generalmente se pueden presentar como diarrea, erupciones cutáneas, exantema y fiebre en altas dosis puede generar hepatitis y colestasis.

18. Bacterias resistentes a antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un problema en la actualidad debido al mal uso de estos ya que en varias ocasiones se genera selección positiva de las bacterias más resistentes a los antibióticos, esto debido a que en muchos casos no se termina el tratamiento o se administran antibióticos paulatinamente durante una infección bacteriana (Oldfield y col, 2014).

La resistencia a los antibióticos se puede generar de 3 formas distintas, una de ellas es de forma natural, que es cuando nos referimos que la bacteria obtiene resistencia

al antibiótico, pero esta nunca ha tenido contacto directo con el antibiótico, la resistencia adquirida es cuando la bacteria previamente a tenido interacción con el antibiótico en un individuo con un tratamiento inconcluso, esta resistencia adquirida es una de las que genera más bacterias resistencia a los antibióticos.

Por último tenemos la resistencia transmitida la cual es un de las más complejas ya que de pende de la interacción de 2 o más organismo no necesariamente del mismo género, ya que estos tienen la facultad de introducir fragmentos de DNA o plásmidos; esta resistencia a los antibióticos es lo que comúnmente se conoce como resistencia mediada por plásmidos que migran de una bacteria resistente a los antibióticos a otra bacteria que no posee resistencia a ellos, no solo las bacterias pueden conferir esta resistencia a los antibióticos también los virus puede dar esta resistencia a los antibiótico, así mismo las bacterias en un proceso de muerte pueden dejar su material genético disponible a otras bacterias las cuales lo introducen a ellas en pequeñas cantidades ya sea en cromosomas o plásmidos esto se le conoce como trasposomas, no obstante si el material genético es adquirido por completo se le denomina como integron (Figura 8) (González 2006, Noda y col, 2011).

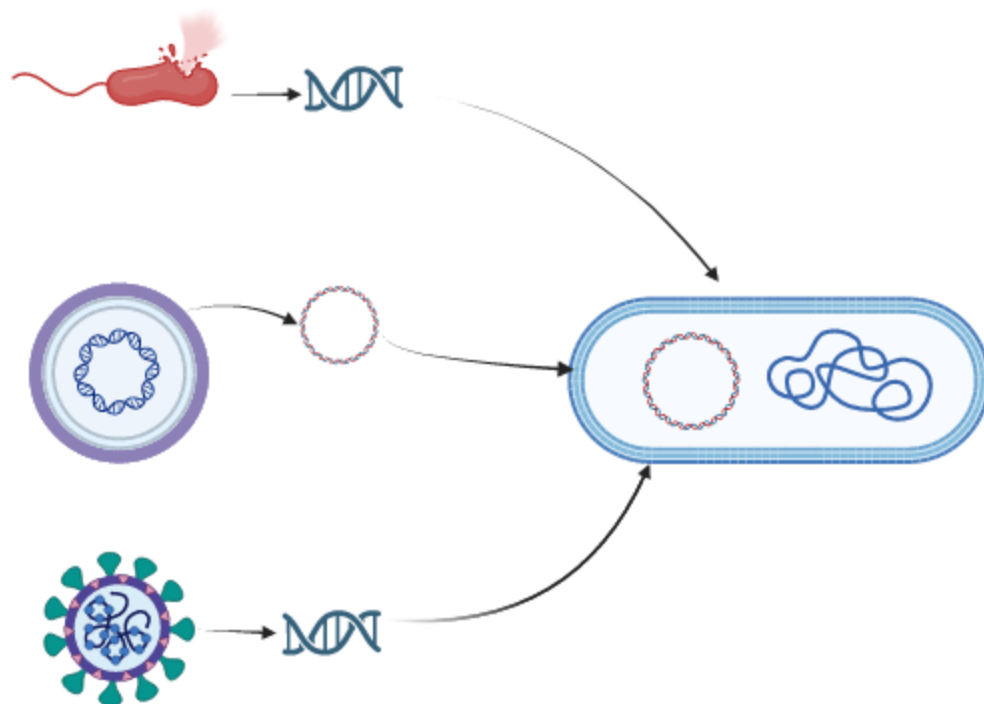


Figura 8. Resistencia obtenida. Posibles transferencias del material genético que otorga resistencia a los antibióticos a una bacteria que anteriormente no era resistente a los antibióticos.

19. Mecanismo de resistencia de *S. pneumoniae* a los distintos antibióticos

Si bien se han descritos varias bacterias resistentes a los antibióticos betalactámicos, muchas de ellas dependen del uso de una enzima llamada betalactamasa la cual puede hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos dejando inactivo el antibiótico; no obstante *S. pneumoniae* es una bacteria de mucho interés debido a que no utiliza una betalactamasa, para evadir los distintos antibióticos betalactámicos **(Noda y col, 2011)**.

El método que utiliza *S. pneumoniae*, para evadir antibióticos como penicilina y ceftriaxona es la modificación del sitio activo, los cuales podemos clasificar en modificación en las PBP y modificación ribosomal. Si bien el cambio de un solo aminoácido genera una proteína distinta, en este caso la modificación se lleva a cabo en las PBP, este cambio es significativo debido a que la afinidad de unión de los antibióticos betalactámicos al sitio activo se ve disminuida completamente **(Musser y col, 2020)**.

En el caso de los antibióticos macrólidos que actúan sobre la síntesis de proteínas, el mecanismo de evasión consiste en la modificación ribosomal, esto se lleva a cabo gracias a los genes (metilasa resistentes a eritromicina) *erm A* y *erm B* que generan modificación postranscripcional del rRNA 23S mediante la metilación de adenina generando cambios conformacionales en el sitio P generando una afinidad nula a la unión de los macrólidos, se ha visto que la expresión de un gen *erm* confiere una resistencia a eritromicina de 128 µg/ml **(Pechère, 2001)**.

VI. Hipótesis

La funcionalización de las AuNP's con los distintos antibióticos generará un complejo eficiente que inhibe el crecimiento y viabilidad de *S. pneumoniae*.

VII. Justificación

La neumonía es la principal causa de mortalidad infantil en niños de 0 a 5 años; en el 2019 se reportaron 740,180 defunciones en menores de 5 años. Pese a que la neumonía es generada por distintos agentes infecciosos, *S. pneumoniae* es la causa número uno a nivel mundial. El tratamiento para combatir infecciones generadas por

S. pneumoniae consiste en la administración de antibióticos de primera generación; se ha observado que *S. pneumoniae* ha obtenido una resistencia a distintos antibióticos betalactámicos.

Por este motivo mediante esta investigación se busca alternativas como el desarrollo de nano-conjugado, para mejorar la efectividad de los antibióticos, mediante la funcionalización de AuNP's, que han demostrado tener propiedades antibacterianas sobre distintos tipos de bacterias entre ella *S. pneumoniae*, generando un complejo que mejore ambos aspectos de los elementos a unir, generando una respuesta bactericida del nuevo nano-conjugado.

VIII. Objetivo

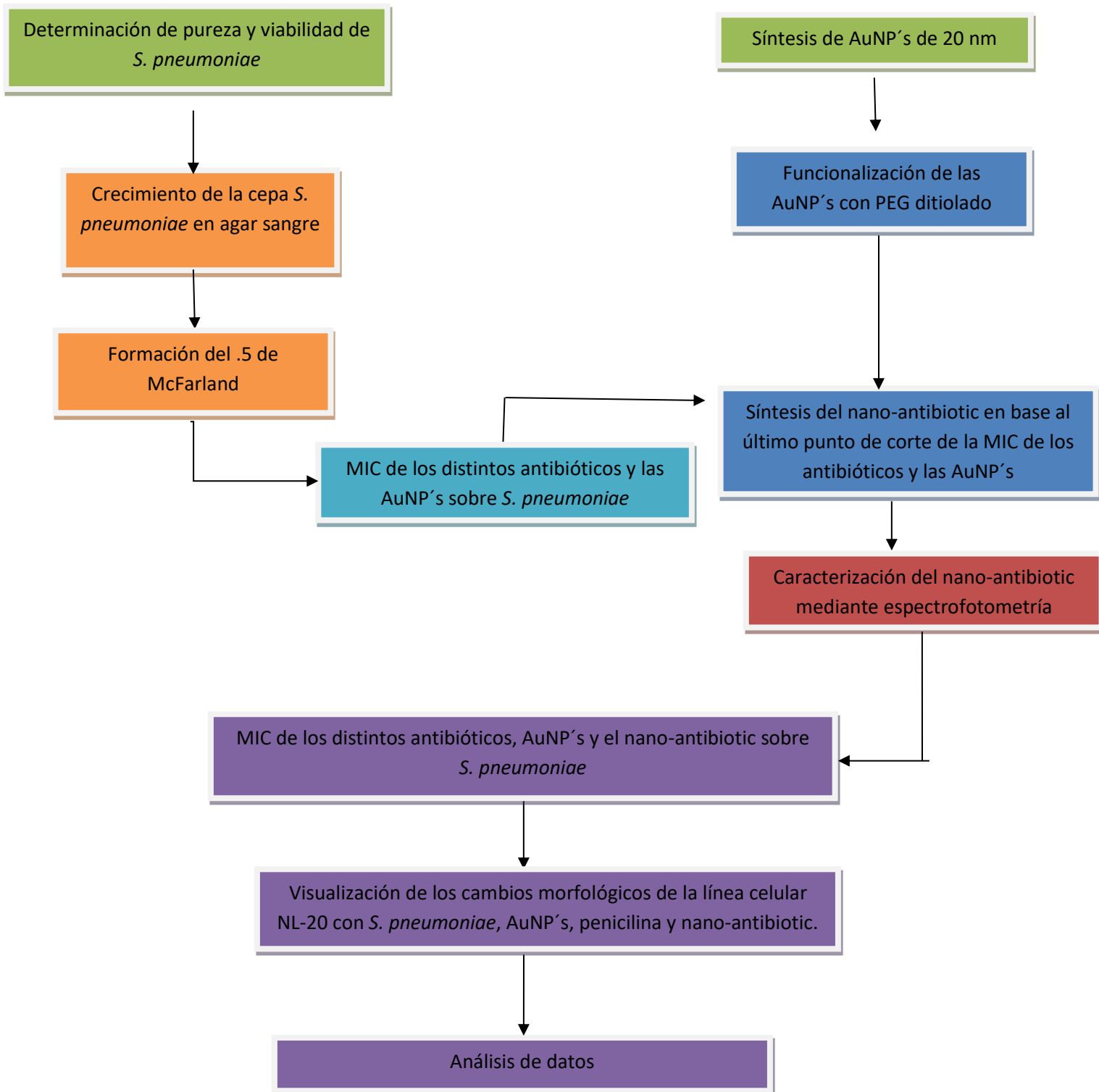
1. Objetivo General.

Desarrollar un nano-conjugado (nano-antibiotic) basado en la unión de AuNP's y distintos antibióticos como eritromicina, penicilina G y ceftriaxona, partiendo de las cantidades mínimas inhibitorias de los distintos elementos que inhiben el crecimiento bacteriano.

2. Objetivos particulares.

1. Construir un nano-conjugado (nano-antibiotic) basado en AuNP's y los antibióticos eritromicina, penicilina G y ceftriaxona
2. Comparar las CMI del nano-antibiotic, las AuNP's y los antibióticos eritromicina, penicilina G y ceftriaxona sobre *S. pneumoniae*, para ver si existe una disminución en la CMI del nano-antibiotic
3. Determinar la viabilidad de *S. pneumoniae* en presencia del nano-antibiotic y compararlo con las AuNP's y los antibióticos eritromicina, penicilina G y ceftriaxona por separado.
4. Analizar la morfología de la línea Celular NL-20 y que efecto tiene el anti-nanobiotic, AuNP's, antibiótico y *S. pneumoniae* sobre la línea celular NL-20.

IX. Esquema general de trabajo



X. Materiales y métodos

1. Determinación de la pureza y viabilidad de *S. pneumoniae*.

1.1 Cepa bacteriana

Para todos los experimentos se utilizó cultivos crioconservados de la cepa 49619 *S. pneumoniae*. La cepa se dejó en crecimiento en agar sangre suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrilada. Se incubaron a 37°C y con un ambiente de CO₂ al 5% durante 16 horas

1.2 Pruebas bioquímicas.

Se realizó la prueba de la catalasa y tinción de Gram la cepa bacteriana para garantizar la pureza, afirmando que es *S. pneumoniae* y que no presente una contaminación de otra bacteria.

1.3 Prueba de la catalasa.

La catalasa es una enzima que puede descomponer el H₂O₂ en O₂ y H₂O, en esta prueba se tomó una azada del crecimiento bacteriano presente en el agar sangre, y se colocó en un portaobjetos, seguidamente se adicionó una gota de H₂O₂ al 30%; si la prueba es positiva y la bacteria presenta catalasa se presenta la formación de burbujas en la gota adicionada, y se considera negativa si no se observa esta reacción, usando como control positivo a *Staphylococcus aureus*.

1.4 Tinción de Gram.

En la tinción de Gram se realizó colocando una gota de agua estéril en un portaobjetos, posteriormente se agregó una pequeña azada de la cepa *S. pneumoniae* y se esparció cubriendo una pequeña área del portaobjetos. La muestra se fijó en un porta objetos pasándolos rápidamente en el mechero con el fin de evaporar toda el agua. Una vez fijada la muestra se adiciono 1 ml de colorante cristal violeta y se dejó durante 1 min, pasado el tiempo se lavó con agua estéril posteriormente se agregó 1 ml de lugol y se dejó 1 min y se lavó con alcohol-cetona en una proporción 1:1, por último, se agregó la safranina y se dejó actuar durante 1 min, y se lavó con agua estéril. Las muestras se dejaron secar y se observaron en un microscopio óptico con los aumentos de 40X y 100X.

2. Curva de crecimiento de *S. pneumoniae*

Para determinar el crecimiento de *S. pneumoniae* se realizó una curva de crecimiento de la bacteria, incubándola en 100 ml de medio líquido Todd Hewitt y se le midió la densidad óptica al medio cada hora durante 24 h. Este estudio se realizó por triplicado, posteriormente se graficaron los resultados para predecir el comportamiento de *S. pneumoniae* (Izquierdo y col, 2020).

La curva de crecimiento es un procedimiento por el cual se puede observar el crecimiento de distintos organismos los cuales se puede medir a distintos tiempos gracias a un espectrofotómetro, a este estudio podemos determinar la velocidad de crecimiento y los distintos periodos o fases de esta curva los cuales se dividen en 4 secciones que son latencia, exponencial, estacionaria y muerte (Rodriguez y col 2019).

3. Síntesis de AuNP's

La síntesis de las AuNP's se llevó a cabo por el método de reducción química (Dong y col, 2020), de la cual se obtienen mayormente AuNP's de un tamaño de 20 nm. El tamaño de las AuNP's fue elegido por la descripción de los efectos antimicrobianos que estas poseen sobre *S. pneumoniae* (Ortiz y col, 2019). Para su síntesis se empleó ácido tricloroáurico (HAuCl_4 , 1 mM) en agua Milli-Q. Esta solución se puso en una parrilla de agitación constante a una temperatura de 320°C y 450 rpm una vez que comenzó a hervir se agregaron 18 ml de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 38.8 mM como agente reductor y se dejó a una temperatura de 200°C a 450 rpm durante 15 min durante este tiempo la solución presentó un cambio de coloración hasta alcanzar un color rojo carmesí, pasado los 15 min se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente. (Figura 9)



Figura 9. Procedimiento realizado para la síntesis de la AuNP's mediante reducción química. 1) Calentamiento del agua Milli Q. 2) Adición del ácido tetracloraurico. 3) agregación del agente reductor (citrato de sodio). 4) coloración final de la síntesis de las AuNP's.

4. Caracterización de AuNP's

Después de la síntesis de las AuNP's, se agregó en una celda 50 µl de la síntesis más 50 µl de agua Milli-Q y se leyó en el espectrofotómetro SPECTRO-star nano (BMG LABTECH) para obtener el espectro de absorción de las AuNP's como blanco se utilizó agua Milli-Q. Posteriormente se centrifugaron a 9300 rpm durante 20 min a una temperatura de 4°C esto se realizó para retirar los restos de citrato de sodio en el medio posterior mente se resuspendieron con agua mili Q las AuNP's.

5. Determinación del rendimiento de la síntesis de las AuNP's

Para determinar el rendimiento de la síntesis de las AuNP's, se comprobó por diferencia de peso en tubos Eppendorf. Para ello se pesó primero un tubo Eppendorf vacío, posteriormente se le añadió 1 ml de la síntesis de las AuNP's, se centrifugó a 15,000 rpm x 5 min, se retiró la mayor cantidad del sobrenadante y se puso en un concentrador durante 60 min a 60° C para eliminar el excedente de agua, al término del tiempo se volvieron a pesar y se realizó la resta del peso final menos el peso inicial

y poder determinar el aproximado del peso existente en 1 ml, este experimento se realizó 100 veces y se sacó la media de los pesos obtenidos.

6. Obtención del concentrado de AuNP's

Para poder probar las distintas concentraciones 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 y 2 µg/ml (Ortiz y col, 2015), se prepararon concentrados de AuNP's. En condiciones de esterilidad se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min, eliminando el sobrenadante y colectando el concentrado de AuNP's en un tubo esto con el promedio de AuNP's existentes en 1 ml.

7. Esterilidad de las AuNP's

Para comprobar la esterilidad de las AuNP's se metieron a la autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después se sembraron 10 µl de las AuNP's en una placa con agar sangre y se metió en la incubadora a una temperatura de 37°C con una atmosfera de CO₂ al 5% durante toda la noche.

8. Determinación de la potencia de los antibióticos

Para la determinación de la potencia de los antibióticos, muchos de los fabricantes indican la potencia del antibiótico en las especificaciones del producto; no obstante, en algunos de los casos los antibióticos son manejados por unidades, lo cual no es equivalente a la potencia la cual es expresada en µg/ml. En determinado caso que el antibiótico sea este expresado en unidades para calcular su potencia se tiene que tener a consideración su pureza, contenido de agua y fracción activa del antibiótico. Para este trabajo se utilizaron 3 antibióticos ceftriaxona, eritromicina y penicilina G, de los cuales solo la eritromicina tiene su potencia indicada la cual corresponde a 850 µg/ml para los demás antibióticos se tuvo que determinar la potencia y la cantidad necesaria para hacer una solución stock de 10ml a una potencia de 1280 µg/ml.

Determinación de la potencia.

$$Potencia = (Pureza) * (Fraccion activada) * (1 - contenido de agua)$$

Calculo para los mg a pesar para una solución stock a una potencia de 1280µg/ml.

$$\text{Peso (mg)} = \frac{10\text{ml} * 1280 \mu\text{g/ml}}{\text{potencia } \mu\text{g/mg}}$$

Se realizó una cuantificación a cada antibiótico para poder determinar cuánto antibiótico se le pego a las AuNP's mediante la medición de los lavados recuperados del sobrenadante, para ello se midió los distintos espectros de los antibióticos y se realizaron distintas lecturas de espectrofotometrías a diferentes concentraciones.

9. Determinación de concentración mínima inhibitoria de los antibióticos y las AuNP's sobre *S. pneumoniae*

Para determinar la concentración bactericida de los antibióticos y las AuNP's se realizó el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC), *S. pneumoniae* se dejó crecer en una placa de agar sangre con 5% de sangre desfibrilada de carnero, en un tubo de ensayo de 10 ml se agregaron 3 ml de medio todd-Hewitt estéril y se agregó una colonia del medio agar sangre para formar el punto 5 de McFarland el cual es el equivalente a 1.5×10^8 células por ml, después se realizó una dilución 1 a 100 del punto 5 de McFarland en 10 ml de medio Todd-Hewitt del inóculo se agregaron 100 µl en cada uno de los pozos de nuestra placa de 96 pozos, estos solo para los pozos del 1 al 10 y 12, para el pozo 11 se agregó solo medio Todd-Hewitt, y si se agregaron 100 µl de diferentes concentraciones de AuNP's. Iniciando en una concentración de 1024 µg/ml disminuyendo la concentración mediante diluciones seriadas hasta alcanzar un mínimo de 2 µg/ml la microplaca se incubó a una temperatura de 37 °C con un ambiente de 5% de CO₂ y fue monitoreada cada 2 horas realizando lecturas en un espectrofotómetro a 600 nm para determinar el crecimiento de la bacteria en la distintas condiciones.

En el caso de los antibióticos se consultó el manual de Normas de desempeño para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos y se comenzó de una potencia de 64 µg/ml en el caso de la penicilina, 8 µg/ml para la ceftriaxona y 16 µg/ml para la eritromicina.

10. Recubrimiento de AuNP's con Poly(ethylene glycol) dithiol

A partir del punto de corte de inhibición de las AuNP's se funcionalizaron las AuNP'S con 0.0025 mg de Poly(ethylene glycol) dithiol por ml y se mantuvo en agitación a 450 rpm durante 2 h cubriendo el matraz con papel aluminio y en condiciones de esterilidad. Al término de las 2 h se centrifugaron las AuNP's + PEG, a 15,000 rpm para eliminar los restos de PEG inmersos en el medio este procedimiento se realizó 3 veces, las AuNP's + PEG se almacenaron a 4°C.

11. Síntesis de los nano-antibiotic

Para la síntesis de los 3 distintos nano-antibiotic se partió del punto de corte de las AuNP's ya funcionalizadas con el PEG, y en un matraz estéril se adicionó el antibiótico en cantidades correspondiente al último punto de corte de inhibición de cada antibiótico penicilina 1 µg/ml, ceftriaxona 0.125 µg/ml y eritromicina 0.125 µg/ml.

Cada nano-antibiotic se dejó en agitación constante a una temperatura de 4°C durante 2 horas, al término del tiempo se centrifugo el nano-antibiotic y se midió la absorbancia del sobre nadante para ver si existían restos de antibiótico, el nano-antibiotic se almaceno a 4°C.

12. Caracterización del nano-antibiotic

Después de la síntesis de los nano-antibiotic, se agregó en una celda 50 µl de la síntesis más 50 µl de agua Milli-Q y se leyó en el espectrofotómetro SPECTRO-star nano (BMG LABTECH) para obtener el espectro de absorción del nano-antibiotic como blanco se utilizó agua Milli-Q esto se realizó para los 3 distintos nano-antibiotic.

13. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del nano-antibiotic

Se realizó nuevamente el ensayo de MIC debido a que es una nueva formulación del compuesto llamado nano-antibiotic, para ver el efecto bactericida del nano-antibiotic, comenzando con concentraciones de 1 µg/ml de penicilina unido a 512 µg/ml de AuNP's, se realizó el llenado de los pozos de la micro placa de 96 pozos, del 1 al 10 realizando diluciones seriadas hasta una concentración de 1/0.001 µg/ml, en el caso de los nano-antibiotic (ceftriaxona y eritromicina) se partió de 512 µg/ml de AuNP's con

0.125 µg/ml respectivamente, para el llenado de la placa se realizó diluciones seriadas hasta tener una concentración final de 1/1.0002 µg/ml para ambos casos, cada pozo se llenó con 100 µl del nano-antibiotic y se le agregaron 100 µl de *S. pneumoniae* en el pozo 12 solo se agregó la bacteria como control positivo y en el pozo 11 solo se agregó medio como blanco, la placa se metió a la incubadora a 37 °C con 5% CO₂ y se midió la absorbancia cada 2 horas, este experimento se realizó por triplicado y en 2 condiciones diferentes el primero el inóculo solo lleva medio y en la segunda condición el inóculo lleva sangre de carnero desfibrilada al 5%.

14. Línea celular NL-20

Para los ensayos de morfología celular se utilizó la línea celular NL-20 correspondiente a células bronquiales sanas, las células se cultivaron en medio F-12 (HAM) el cual tenía suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, L-glutamina antibiótico e insulina hidrocortisona y factor de crecimiento

15. Determinación de morfología de la línea celular NL-20

Para los ensayos de morfología celular, se llenaron 13 cajas Petri de 60x15mm con 25,000 células cada caja, una de las cajas se usó como control para monitorear el crecimiento de la línea celular NL-20 y se fijó a las 2 h con metanol, 12 cajas se pusieron en distintas condiciones. Se dividieron en 4 grupos de 3 cajas teniendo un total de 4 condiciones distintas con la presencia de *S. pneumoniae* en todas ellas. La primera condición fue *S. pneumoniae* más AuNP's, la segunda condición fue *S. pneumoniae* más el antibiótico penicilina, la tercera condición fue *S. pneumoniae* más el nano-antibiotic la cuarta condición fue la línea celular con la presencia de *S. pneumoniae* todas monitoreadas en un lapso de tiempo de 2, 4 y 6 horas. Las cajas se metieron a la incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Al término de las primeras horas las cajas se sacaron de la incubadora y se fijaron con metanol lo mismo se realizó a las 4 y 6 h.

XI. Resultados

1. Pruebas bioquímicas para determinación de pureza de *S. pneumoniae*

Se utilizó un cultivo crioconservado de *S. pneumoniae* (ATCC 49619) el cual se sembró en una caja de agar sangre y se incubó durante 16 h, se tomó una colonia de la bacteria y se realizó la prueba de la catalasa la cual resultó negativa debido a la ausencia de burbujas (Figura 10 B).

En la tinción de Gram se observaron bacterias esféricas que presentaron una coloración morada, muchas de ellas se presentaban en cadenas y algunas en diplococos, los resultados de estas dos pruebas confirman la presencia de *S. pneumoniae* (Figura 10 A).

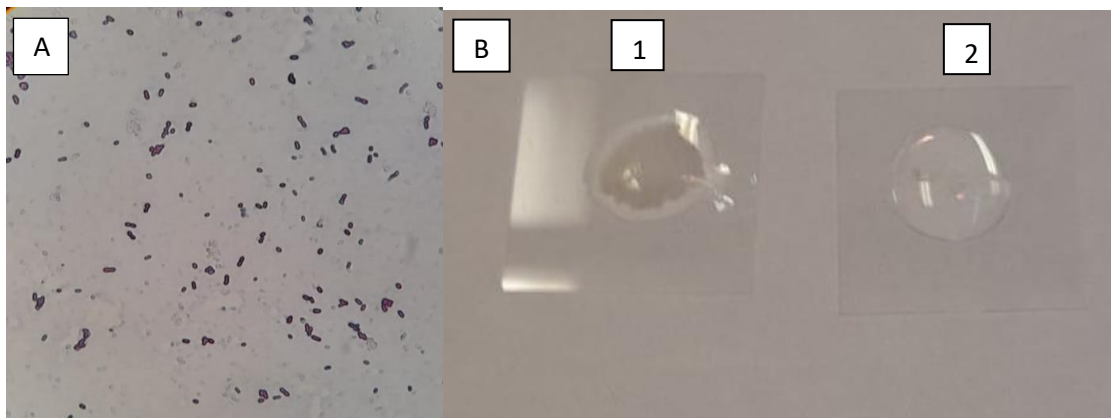


Figura 10. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae*. A) Tinción de *S. pneumoniae* B) prueba de la catalasa. 1) *S. aureus* catalasa positivo 2) *S. pneumoniae* catalasa negativo.

1.1 Curva de crecimiento de *S. pneumoniae*

Para observar el crecimiento de *S. pneumoniae* se midió la densidad óptica de un inoculo cada hora durante 24 h a una longitud de onda de 600 nm, posteriormente se graficó y se vio como esta crecía y se comportaba en condiciones normales este experimento se realizó por triplicado, esta curva de crecimiento nos sirvió como base para ver cómo reacciona esta bacteria con distintos agentes antibacterianos (Figura 11).

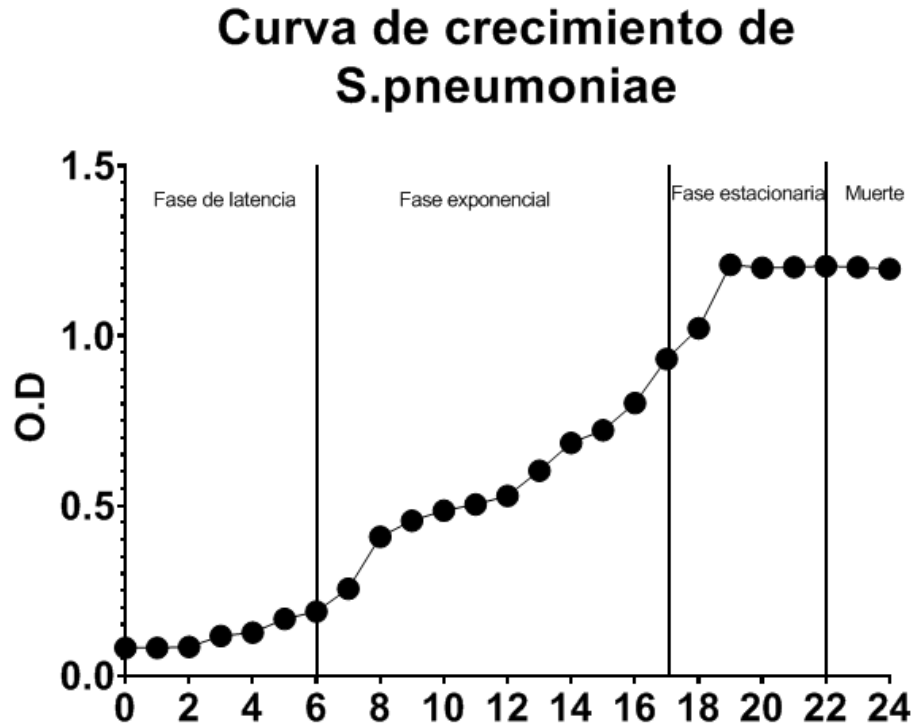


Figura 11. Curva de curva de crecimiento de *S.Pneumoniae* de la cepa 49619.

2.Síntesis de AuNP's de 20 nm

Se sintetizaron AuNP's de 20 nm mediante la reducción química la cual consiste en la nucleación y crecimiento sucesivo de las AuNP's, este proceso es generado por la presencia de citrato de sodio que actúa como agente reductor en esta síntesis el citrato

de sodio queda inmerso en las nanopartículas, lo cual genera que las AuNP's sean inestables.

El tamaño de las AuNP's puede variar dependiendo de la cantidad del agente reductor y la concentración de ácido tetracloraurico usado, en este procedimiento obtuvimos una solución de color rojizo lo cual nos confirmó una exitosa síntesis de AuNP's.

3. Caracterización de las AuNP's

Después de la síntesis de AuNP's se colocó una alícuota de 50 μ L de la solución de síntesis más 150 μ L de agua MiliQ en una celda y se leyó en el espectrofotómetro, la absorbancia de las AuNP's y nos dio una longitud de onda de 520 nm. (Figura 12).

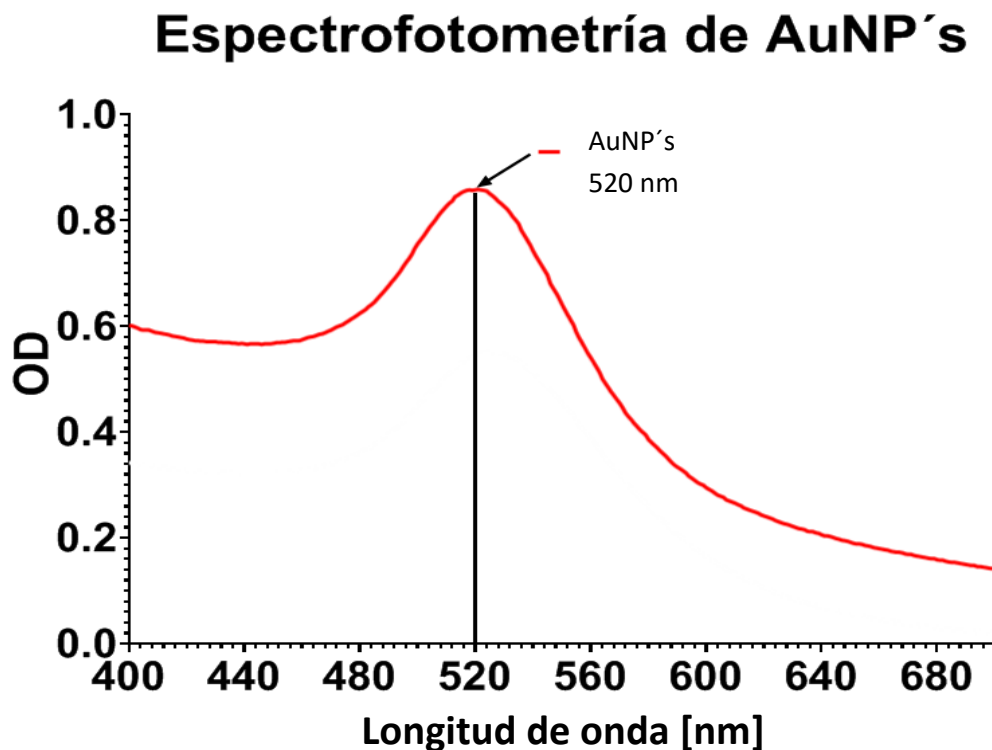


Figura 12. Espectrofotometría de las AuNP's. Se realizó un barrido de la síntesis de la AuNP's, la longitud de onda de la síntesis de AuNP's que se obtuvo fue de 520 nm con una O.D 8.2.

4. Determinación del rendimiento de la síntesis de AuNP's

La determinación del rendimiento de síntesis de las AuNP's se obtuvo por diferencia de peso en tubos Ependorff de 1.5 ml se realizaron 10 síntesis distintas y se tomaron 10 ml de cada una de las síntesis, en total se obtuvieron un total de 100 pesos secos

para determinar la cantidad en promedio de AuNP's en un ml. El promedio del rendimiento de síntesis de AuNP's fue de 0.553 $\mu\text{l/ml}$ el rendimiento obtenido se utilizó para realizar los demás experimentos (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio de síntesis de AuNP's mediante el método de reducción química

Síntesis de AuNP's	Promedio del peso de los 10 tubos de las AuNP's μg
1	0.515
2	0.538
3	0.534
4	0.506
5	0.612
6	0.584
7	0.579
8	0.514
9	0.584
10	0.567
Promedio	0.553

Columna 1 número de síntesis de AuNP's realizada. Columna 2 promedio obtenidos por peso seco de las síntesis de AuNP's.

5. Esterilidad de las AuNP's

Para asegurar la esterilidad de las AuNP's antes de funcionalizarlas con PEG dithiol, se sometieron a esterilización durante 15 min a una temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$, posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se tomaron 20 μl y se sembraron en una caja de agar sangre y se incubaron durante 18 h, se revisó la caja y no se observaron crecimiento de ningún organismo (Figura 13).



Figura 13. Determinación de la esterilidad de las AuNP's. Se tomaron 20 μl de AuNP's y se sembraron en una caja de agar sangre a las 18 h no se observaron crecimiento de ninguna bacteria lo cual nos garantiza la esterilidad de nuestras AuNP's.

6. Concentración mínima inhibitoria de los antibióticos

La CMI de la penicilina G fue de 1 µg/ml, en cantidades inferiores se observó un crecimiento de la bacteria la cual fue medida mediante espectrofotometría, y se graficaron los resultados obtenidos de la CMI, para asegurar que no existiera un efecto de bacteriostático, se tomó 10 µl de cada pozo, empezando donde no se aprecia crecimiento y se sembró en una caja de agar sangre dividida en 8 espacios, este experimento se realizó por triplicado. En el caso de la eritromicina y ceftriaxona la CMI fue de 0.125 µg/ml para ambos casos, se realizaron los mismos procedimientos, no se observó crecimiento en la placa agar sangre por encima de esta cantidad lo cual confirma los resultados obtenidos por espectrofotometría.

7. Concentración mínima inhibitoria de las AuNP's

La CMI de las AuNP's, de acuerdo a la literatura, es de 512 µg/ml (**Ortiz y col, 2015**), por ellos se partió de una concentración de 1024 µg/ml. Se realizaron diluciones seriadas, empezando por una concentración de AuNP's de 1024 µg/ml y se probó la CMI de las AuNP's en una placa de 96 pozos empezando de una concentración de 1024 µg/ml hasta 2 µg/ml (Figura 14). Se les midió la O.D cada 2 h durante 24 h para ver si crecían en la placa de 92 pozos.

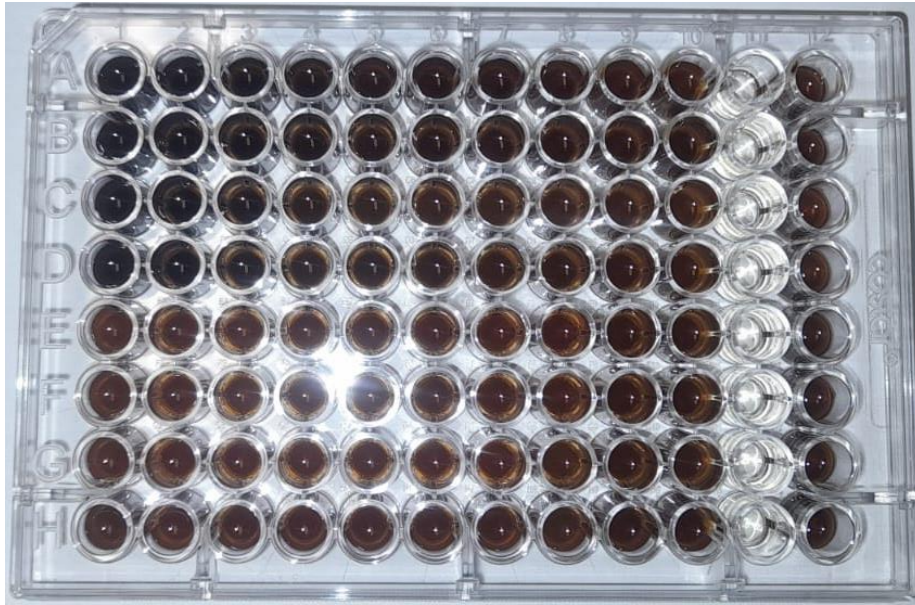


Figura 14. Prueba de CMI de AuNP's en *S. pneumoniae*. En los pozos 1 al 10 contiene diluciones seriadas empezando con 1024 $\mu\text{g/ml}$ hasta 2 $\mu\text{g/ml}$ de AuNP's a cada pozo se le agregaron 100 μl de AuNP's y 100 μl de *S.pneumoniae*, el pozo 11 contiene medio libre de *S. pneumoniae* que funciona como blanco el pozo 12 contiene a *S.pneumoniae* sin AuNP's que funciona como control positivo.

La concentración mínima inhibitoria de las AuNP's fue de 512 $\mu\text{g/ml}$ mientras en las concentraciones menores a 512 $\mu\text{g/ml}$ se observó un crecimiento de la *S. pneumoniae*, se sembraron 10 μl en una placa agar sangre dividida en 8 para comprobar los resultados obtenidos por el espectrofotómetro, lo cual corrobora que el efecto bactericida de la AuNP's es efectivo en esa concentración (Figura 15 y 16).

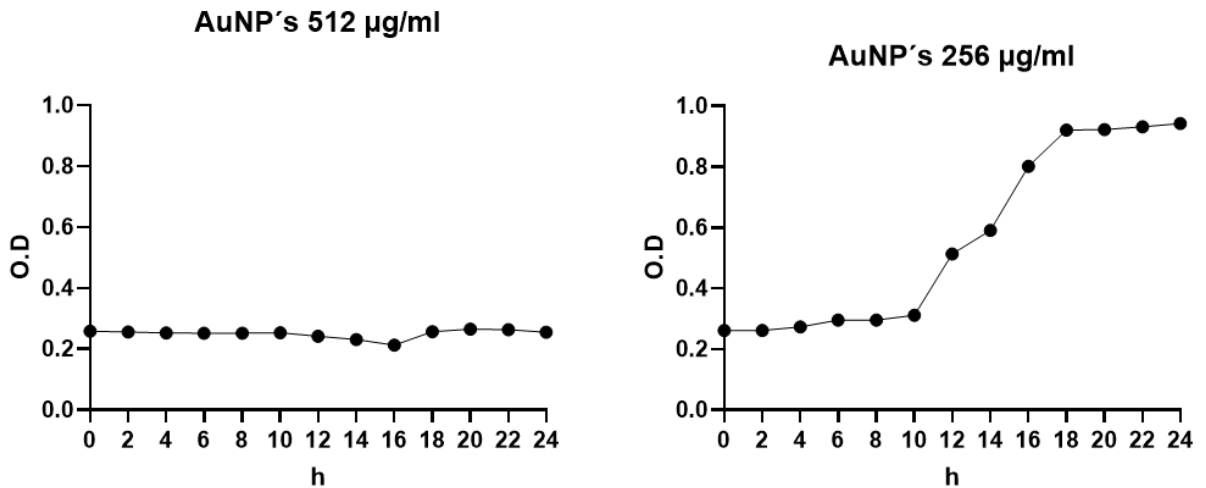


Figura 15. Curvas de crecimiento de *S. pneumoniae* en presencia de AuNP's lado izquierdo la concentración de las AuNP's fue de 512 $\mu\text{g/ml}$ no se observó un cambio en la O.D monitoreada durante 24 h, lo cual indica que no creció *S. pneumoniae*, lado derecho la curva de crecimiento de *S. pneumoniae* con presencia de AuNP's a una concentración de 256 $\mu\text{g/ml}$, en esta curva se observa como la O.D de *S. pneumoniae* incrementa debido a que la cantidad de AuNP's no es suficiente para inhibir el crecimiento.



Figura 16. Medio de cultivo agar sangre, resiembra de la microplaca de 96 pozos: 1 control positivo de *S. pneumoniae*. 2 Resiembra de *S. pneumoniae* con una concentración de AuNP's de 1024 µg/ml no se observa el crecimiento de *S. pneumoniae*. 3 Resiembra de *S. pneumoniae* con una concentración de AuNP's de 512 µg/ml no se observa el crecimiento de *S. pneumoniae*. 4,5,6,7 resiembra de *S. pneumoniae* con concentraciones de 256, 128, 64, y 32 µg/ml respectivamente, se observa que a estas concentraciones a *S. pneumoniae* puede crecer sin problema. 8 Control negativo.

8. Recubrimiento de las AuNP's con Polietilenglicol ditiol

Para recubrir las AuNP's se utilizó Polietilenglicol ditiol ditiol (PEG ditiol) el cual es un polímero formado por las interacciones de etileno y agua, es ampliamente utilizado en medicamentos el cual favorece a la permanencia dentro del cuerpo, para asegurar la funcionalización de las AuNP's se utilizó PEG ditiol el cual posee 2 grupos tioles (Figura 17); uno de ellos será utilizado para adherirse a las AuNP's mientras que el otro grupo tiol queda libre para formar la unión del grupo tiol con el medicamento deseado se espera que las AuNP's formen puentes que se unan entre sí, esto debido a la afinidad por el grupo tiol. (Figura 18).

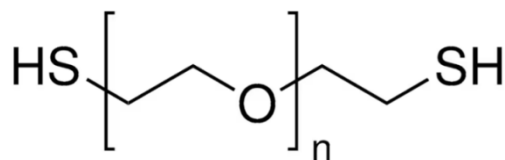


Figura 17. Estructura química del Polietilenglicol ditiol. Véase que los grupos tioles quedan expuestos a ambos lados.

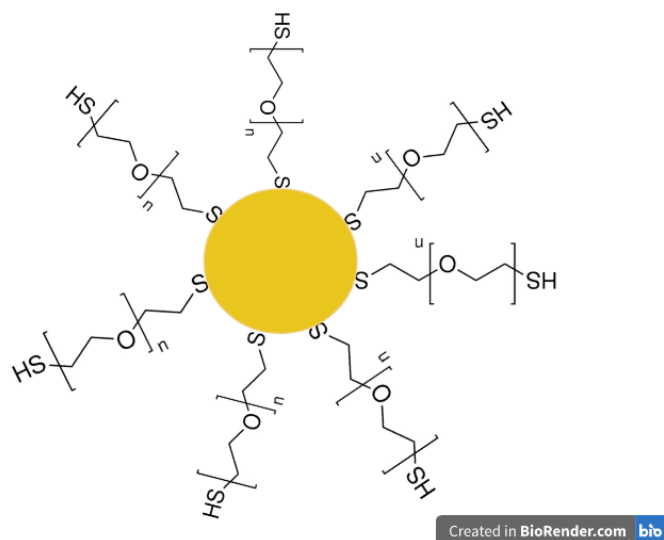


Figura 18. Esquema de la funcionalización de las AuNP's con el PEG ditiol. Propuesta como se vería las AuNP's suncionalizadas, un grupo tiol forma una unión fuerte entre el azufre y la AuNP's recubriéndola en su totalidad y modificando su superficie, así mismo se deja un grupo tiol expuesto para la agregación de distintas moléculas (proteínas, fármacos, etc.).

Se agregó PEG ditiol a una concentración de 0.0025g/ml, después se dejó en agitación constante a 450 rpm durante 2 h, posteriormente se realizó una espectrofotometría de las AuNP's funcionalizadas con el PEG ditiol y se observó un desplazamiento de la curva el desplazamiento de la curva fue de entre 3 y 4 nanómetros los cuales nos dio como resultado AuNP's recubiertas con PEG este desplazamiento confirma la modificación de la superficie de las AuNP's, se realizaron 3 lavados de 20 min a 9300 RPM, para eliminar los residuos de PEG que no se logró unir a las AuNP's.

9. Caracterización de la AuNP's + PEG ditiol

Para lograr comprobar el cambio de las AuNP's se realizó espectrofotometría después de los lavados descritos y se logró ver un desplazamiento de la gráfica esto nos confirma que la superficie de las AuNP's fue modificada lo cual genera una desviación de la absorbancia de la luz reflejada en la AuNP + PEG ditiol (Figura 19).

Espectrofotometría de AuNP's

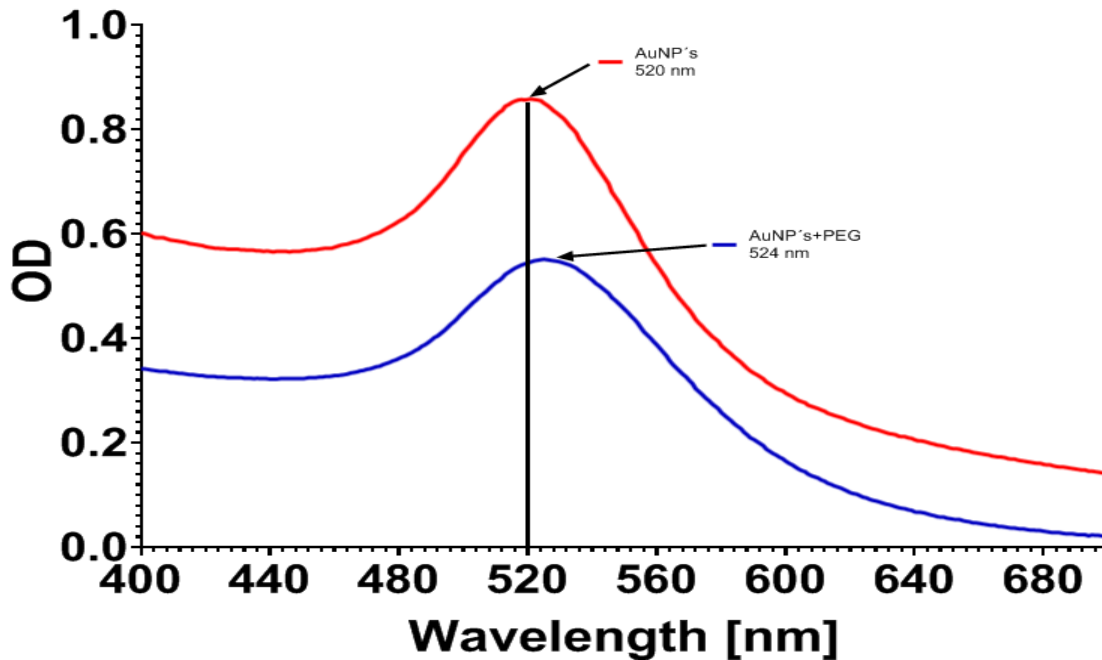


Figura 19. Espectrofotometría de las AuNP's. Grafica roja espectrometría de las AuNP's sin funcionalizar su longitud de onda corresponde a 520 nm, grafica azul espectrometría de las AuNP's + PEG ditiol la longitud de onda corresponde a 524 nm, obsérvese un desplazamiento de las AuNP's + PEG ditiol, lo cual confirma un cambio en su superficie.

10. Cuantificación del antibiótico unido a las AuNP's

Para determinar cuánto antibiótico se unió a las AuNP's se realizó la espectrofotometría a diferentes disoluciones del antibiótico para determinar la longitud de onda que estas poseen y la densidad óptica que tiene las diferentes cantidades del antibiótico este proceso se realizó cuatro veces para cada antibiótico se promediaron los resultados obtenidos y se realizó una curva estándar de la cantidad de antibiótico (Tabla 3, 4 y 5) (Figura 20).

Tabla 3. O.D de distintas concentraciones de penicilina G.

Concentración Penicilina G $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	promedio
8	0.121	0.262	0.222	0.257	0.2155
16	0.226	0.3	0.284	0.36	0.2925
32	0.46	0.379	0.364	0.52	0.43075
64	0.814	0.626	0.722	0.835	0.74925
128	1.704	0.8	0.844	1.094	1.1105
256	3.312	2.108	2.036	2.248	2.426

Tabla 4. O.D de distintas concentraciones de eritromicina.

Concentración Eritromicina $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	promedio
8	0.386	0.289	0.321	0.295	0.32275
16	0.408	0.452	0.424	0.411	0.42375
32	0.87	0.74	0.83	0.79	0.8075
64	1.32	1.44	1.24	1.21	1.3025
128	1.503	1.481	1.465	1.512	1.49025
256	2.252	2.563	2.324	2.175	2.3285

Tabla 5. O.D de distintas concentraciones de ceftriaxona.

Concentración Ceftriaxona $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	promedio
8	0.232	0.241	0.212	0.217	0.2255
16	0.243	0.298	0.279	0.304	0.281
32	0.548	0.522	0.541	0.538	0.53725
64	0.886	0.842	0.851	0.866	0.86125
128	1.592	1.604	1.722	1.542	1.615
256	3.121	2.924	3.201	2.985	3.05775

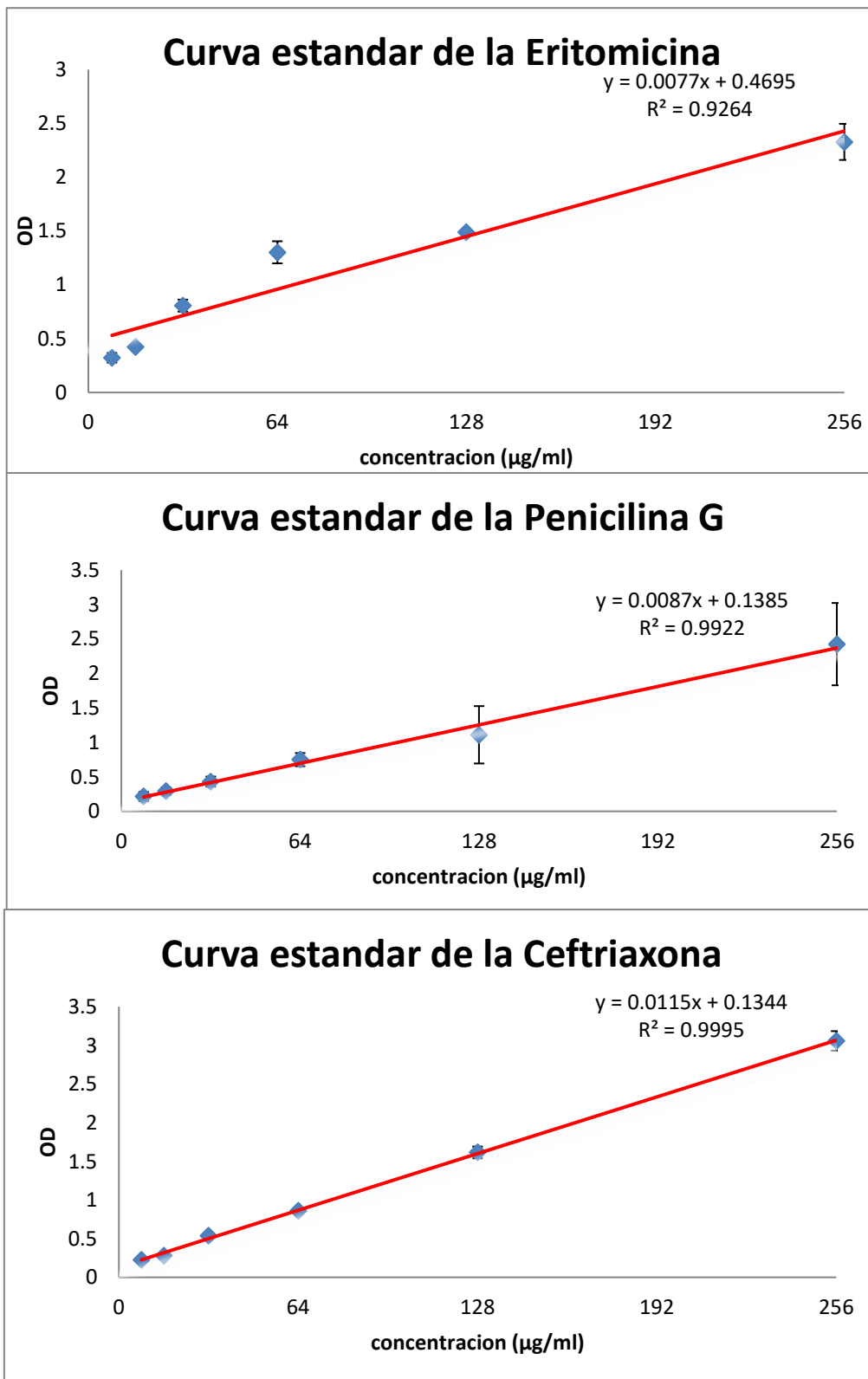


Figura 20. Curva estandar de eritromicina, penicilina G y ceftriaxona.

11. Funcionalización de las AuNP's + PEG ditiol con antibiótico

Para funcionalizar las AuNP's recubiertas con el PEG ditiol con el antibiótico se utilizaron distintos antibióticos como penicilina G, ceftriaxona y eritromicina, esto para generar 3 distintos complejos los cuales recibieron el nombre de nano-antibiotic (Antibiótico correspondiente). Se comenzó con una solución stock de antibiótico a una potencia de 1280 µg/ml, se vertieron 10 ml del antibiótico a 90 ml de las AuNP's previamente recubiertas con el PEG ditiol y se dejó en agitación a 450 RPM durante 2 horas a una temperatura de 4°C, posteriormente se centrifugaron a 9300 RPM para formar un botón de NP's ya funcionalizadas, posteriormente se retiró el sobrenadante, se realizaron 4 lavados para eliminar el exceso del antibiótico, se midió el espectro de luz UV/vis de los 4 lavados para comprobando la existencia del antibiótico en el sobrenadante, lo cual indicó que no todo el antibiótico se une a las AuNP's y solo se puede unir a ellas una cantidad determinada debido al espacio existente en la superficie (Tabla 6).

Tabla 6. Antibiótico encontrado en los lavados.

Lavados	1	2	3	4	Total recuperado	Antibiótico unido µg/ml
Antibióticos						
Penicilina G	1.034	0.61	0.47	0.29	2.404	2.32
Eritromicina	1.054	0.71	0.35	0.20	2.314	1.59
Ceftriaxona	1.165	1.12	0.51	0.25	3.045	1.06

Después de los lavados del complejo se midió el espectro y se observó el cambio de las AuNP's.

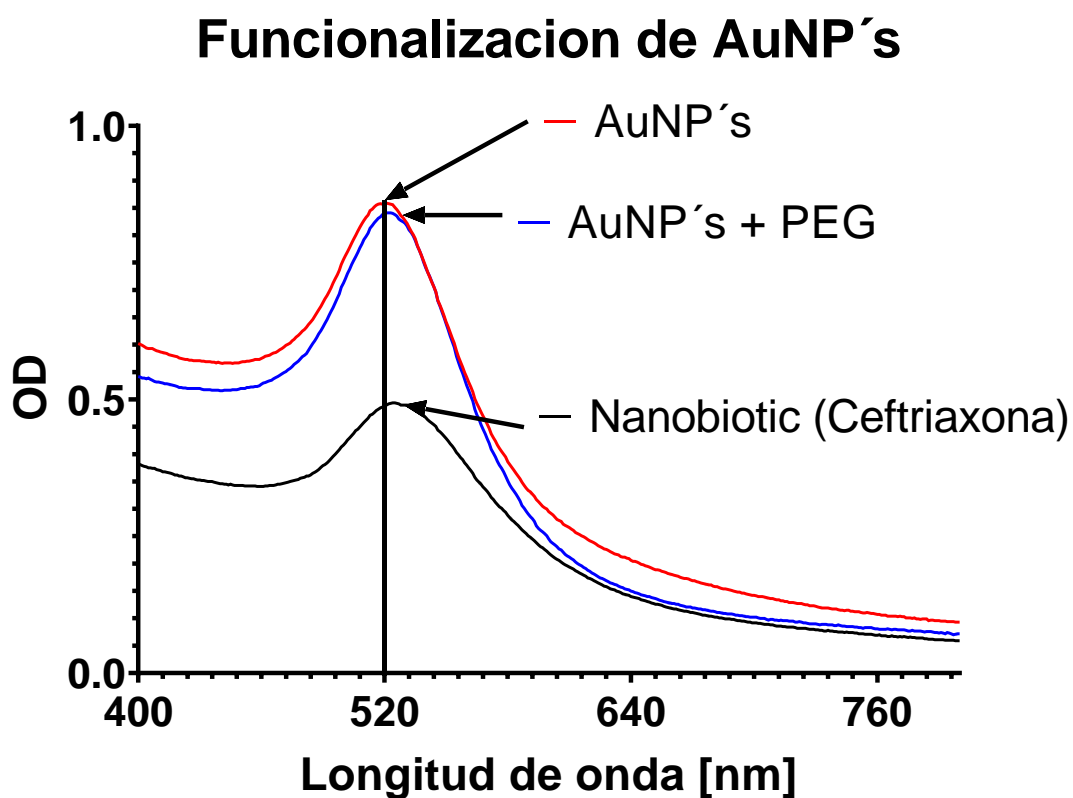
12. Síntesis del nano-antibiotic

Para la síntesis de los nano-antibiotic se partió de la CMI de las AuNP's la cual fue de 512 µg/ml y se combinó con la CMI de los antibióticos, estos se dejaron en agitación constante a 450 RPM durante 2 h a una temperatura de 4°C, al término de la funcionalización se centrifugaron los distintos nano-antibiotics y se midió el sobrenadante, mediante espectro de luz UV/vis lo cual nos dio como resultado la

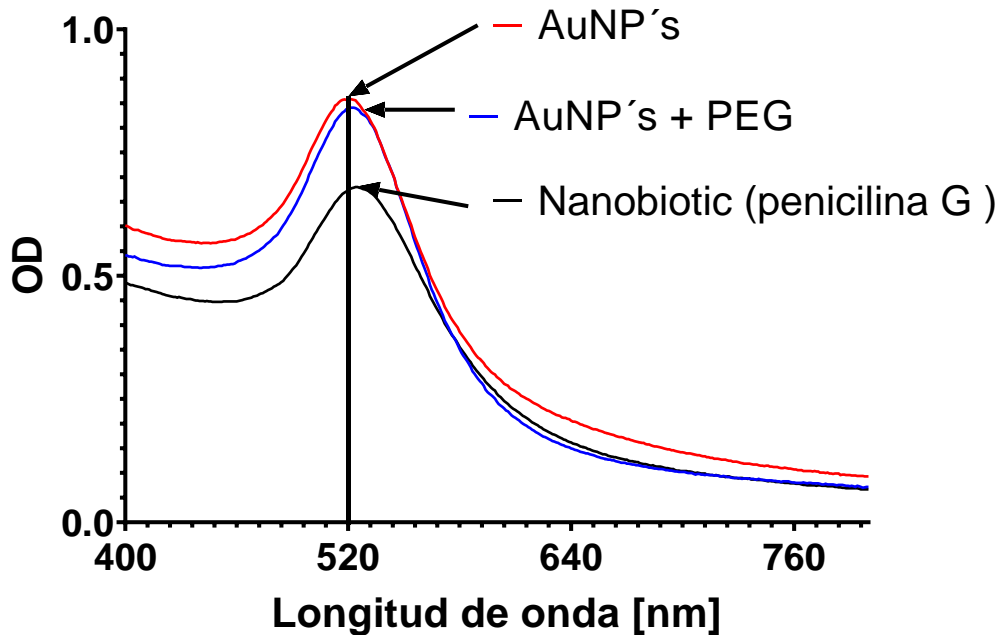
ausencia de antibiótico debido a que la cantidad de antibiótico agregado es menor a la cantidad de antibiótico que se puede adherir a las AuNP's esto nos dio una nueva formulación de 3 nuevos anti-bacteriales.

13. Caracterización de los nano-antibiotic

Cada nano-antibiotic se midió mediante espectrofotometría, lo cual nos dio un desplazamiento de la curva entre 2-4 nm confirmando la modificación de la superficie de las AuNP's + PEG (Figura 21).



Funcionalización de AuNP's



Funcionalización de AuNP's

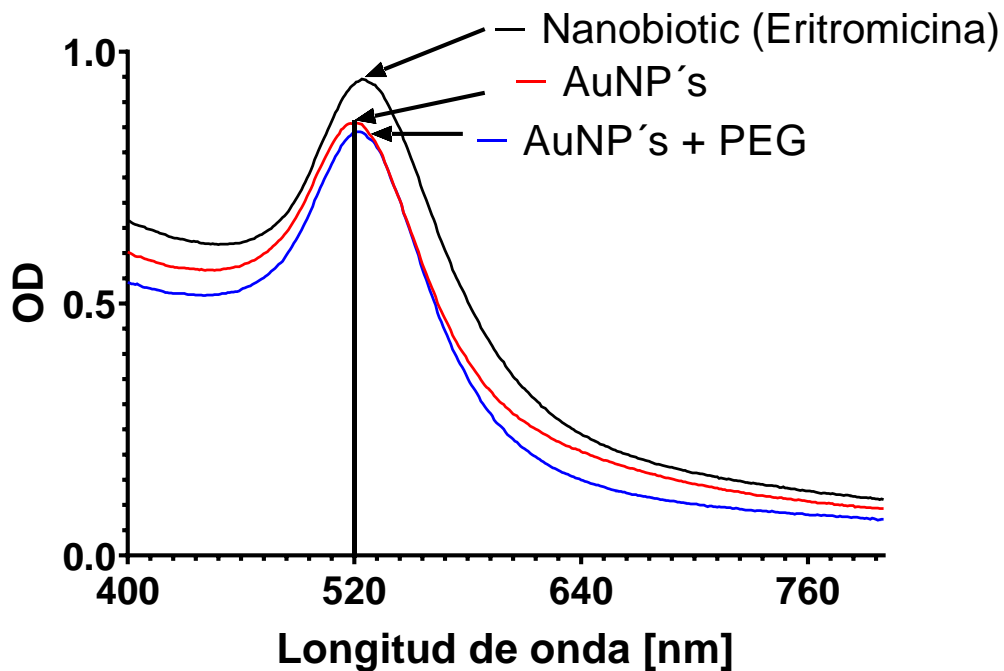


Figura 21. Espectrometría comparativa. Las AuNP's funcionalizadas con penicilina G, eritromicina y ceftriaxona, obsérvese el desplazamiento de la curva en comparación de las AuNP's solas y recubiertas con PEG, este desplazamiento indica el cambio de la superficie de las AuNP's.

14. CMI de los nano-antibiotic

La CMI del nano-antibiotic se realizó por diluciones seriadas en la cuales se vio una CMI fue menor a los elementos separados. En el caso del nano-antibiotic (penicilina G) se observó en las lecturas del espectrofotómetro monitoreadas durante 24 h, que la CMI disminuyo hasta cantidades de 128/0.25 µg/ml (AuNP's /penicilina G) lo cual representa una disminución en la cantidad de AuNP's y penicilina G, por debajo de estas cantidades se presentó un incremento en la O.D confirmando el crecimiento de bacterias, para asegurar esto se tomaron 10 µl y se sembraron en placas de agar sangre y se incubaron durante 24 h. Al revisar las placas se apreció una ausencia de crecimiento por encima de nuestra CMI el crecimiento solo se pudo ver en cantidades por debajo de la CMI, esto afirmo el efecto bactericida que tuvo el nano-antibiotic (penicilina G),

En el caso del nano-antibiotic (Ceftriaxona) la CMI fue de 256/0.06 µg/ml (AuNP's/Ceftriaxona) se aplicó el mismo procedimiento, que se utilizó en el nano-antibiotic (penicilina G) corroborando los resultados obtenidos mediante el espectrofotómetro y sembrados en placas agar sangre, se visualizó que por debajo de la CMI se aprecia crecimiento de *S. pneumoniae*.

Para el nano-antibiotic (eritromicina), los resultados obtenidos en el espectrofotómetro mostraron inhibición del crecimiento en cantidades de 512/0.12 µg/ml y 256/0.06 µg/ml (AuNP's/Eritromicina) en cantidades por debajo de la CMI obtenida se tuvo un incremento en la O.D que correspondían al crecimiento de *S. pneumoniae*, al momento de sembrarlas en placas agar sangre y revisarlas, a las 24 h estas presentaron crecimiento de *S. pneumoniae*. Esto también fue visible en cantidades por encima de la CMI indicando que la combinación de estos 2 elementos genera un bacteriostático, pese a que en la formulación de ambos elementos en cantidades que, si inhiben el crecimiento de la bacteria, deberían matarla sin problemas, no obstante, al combinar estos elementos se vuelven un bacteriostático y no un bactericida.

15. Morfología de la línea celular NL-20

Para la observación de morfología celular solo se utilizó el nano-antibiotic (penicilina G) esto debido a que fue el que necesitó menor cantidad de AuNP's y penicilina G. Se

sembraron 13 cajas con 25,000 células en cada caja y se dejaron crecer durante 24 h, posteriormente a 12 de ellas se les agregó 1 ml de *S. pneumoniae* con una cantidad aproximada de 1,000 bacterias y se les agregó un agente bactericida distinto y se monitorearon durante periodos de 2, 4 y 6 h para ver los cambios morfológicos en las células. Tres cajas contenían *S. pneumoniae* + AuNP's (512 µg/ml), otras 3 contenían *S. pneumoniae* + penicilina G (1 µg/ml), otras 3 contenían *S. pneumoniae* + nano-antibiotic penicilina G (128/0.25 µg/ml) y las últimas 3 solo contenían a *S. pneumoniae*. La última caja no se le agregó nada para compararla en condiciones normales.

Al observar la morfología de la línea celular NL-20 en condiciones normales se apreció que su estructura se encuentra bien definida en la cual se puede distinguir el citoplasma el núcleo y una morfología intacta. (Figura 22)

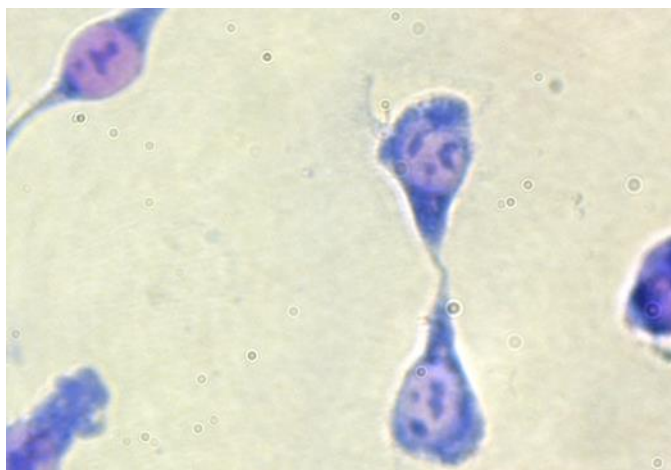


Figura 22. Línea celular NL-20 con tinción Giemsa, esta tinción permite observar una coloración intensa del material genético de color morado mientras que el citoplasma se tiñe de un color azulado claro.

Para el caso de la línea celular más la adición de *S. pneumoniae*, a las 2 h se puede observar como las células pierden su morfología y estas pasan de una forma extendida a una forma redonda debido a las condiciones de estrés que genera *S. pneumoniae*. A las 4 h las células presentan un relieve desgastado y poca coloración debido a que estas están entrando en muerte celular generada por *S. pneumoniae*. A las 6 h el número de campos visibles en la caja de células es muy poco debido a que gran parte de las células ya han muerto, en los campos visuales encontrados se presentan las mismas condiciones que a las 4 h células con relieves de su citoplasma desgastado y

un núcleo celular con poca coloración (Figura 23). Al resembrar la línea celular NL-20 se observó la presencia de *S. pneumoniae*.

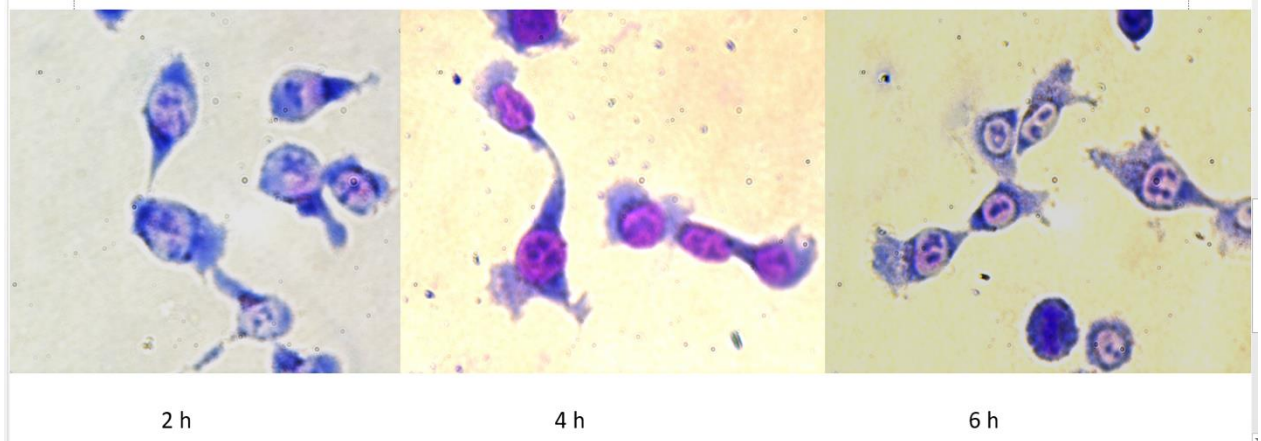


Figura 33. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* a 2, 4 y 6 h.

Cuando se observó la línea celular con *S. pneumoniae* + AuNP's a las 2 h se apreciaron cúmulos de una coloración morada intensa esto podría tratarse de material genético celular unido a AuNP's, de células que entraron a apoptosis, también se aprecia como estos cúmulos se encuentran en mayor parte en la superficie de las células podemos decir que posiblemente el oro tenga afinidad por alguna proteína de superficie de las células las cuales al principio se aglomeran en superficie y entran por ruptura de está cubriéndose de proteínas y material genético, o también estas pueden entrar directamente a la célula y llegar rápidamente al material genético debido a la afinidad que tiene el oro por el ADN. A las 4 h el número de cúmulos aumento y los campos visuales de células completas disminuyeron lo cual indica que las AuNP's tienen un efecto citotóxico para las células, a las 6 h no se observó un cambio significativo comparado a las 4 h (Figura 24). Al sembrar la línea celular NL-20 esta no creció debido al daño generado por las AuNP's y *S. pneumoniae*.

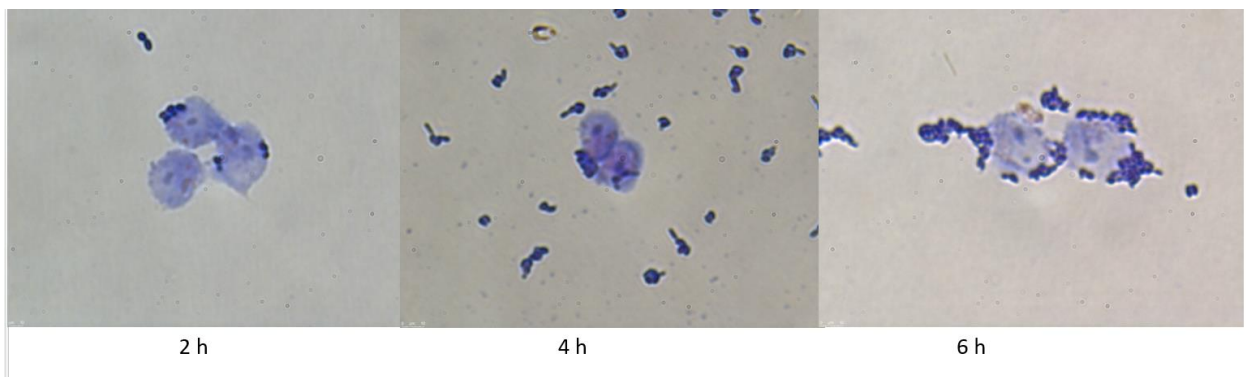


Figura 24. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y AuNP's a 2, 4 y 6 h

Los resultados obtenidos de la línea celular con la adición de *S. pneumoniae* + penicilina G, se observaron a las 2 h y no se apreció un gran cambio en la estructura de las células, lo que sugiere que el antibiótico no resulta ser tóxico para la línea celular, al igual que no se vieron cambios morfológicos correspondientes a la invasión de *S. pneumoniae*, lo cual sugiere que el antibiótico eliminó a la bacteria. Al revisar la línea celular a las 4 h se visualizó que la estructura de las células cambió, las prolongaciones citoplasmáticas cambiaron posiblemente por el tiempo de exposición del antibiótico y la concentración de este, generando un pequeño estado de estrés celular, no obstante, la morfología celular indica que las células son viables, en el caso de las 6 h se apreció que mayoritariamente que todas las células presentaban este patrón (Figura 25). Cuando se resembró la línea celular NL-20 esta creció normalmente y no presentó contaminación por *S. pneumoniae*, lo cual muestra el efecto bactericida del antibiótico.

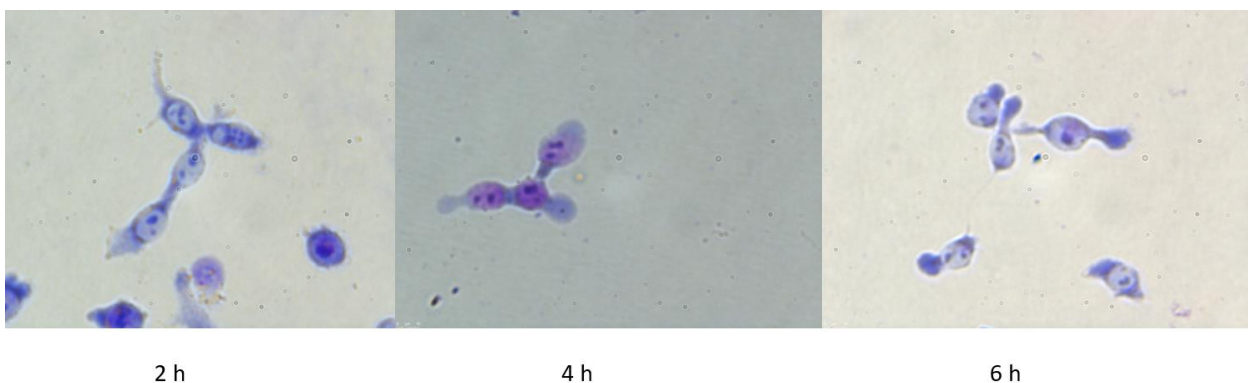


Figura 25. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y penicilina G a 2, 4 y 6 h

En el caso de la línea celular con la adición de *S. pneumoniae* + nano-antibiotic (penicilina), se observó a las 2 h y presento el mismo patrón que los antibióticos, las células presentaron cambios en las prolongaciones citoplasmáticas, sin embargo no se presentó una aglomeración de lo que podría ser material genético como en el caso de las AuNP's, este patrón se repitió a las 4 y 6 h de exposición lo que sugiere que el efecto del nano-antibiotic (penicilina) es muy similar al de los antibióticos y en ausencia de cúmulos de material genético generado por las AuNP's indica que la funcionalización de las AuNP's con antibiótico disminuye el estrés generado en las células (Figura 26). Al momento de resembrar la línea celular NL-20 se observó que esta creció sin problemas y no mostro una contaminación de *S. pneumoniae*.

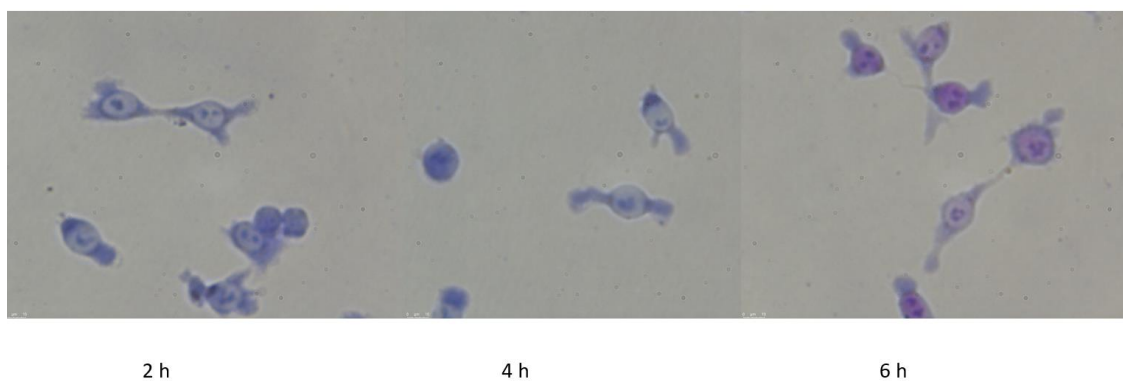


Figura 26. Morfología de la línea celular NL-20 con presencia de *S. pneumoniae* y el nano-antibiotic (penicilina G) a 2, 4 y 6 h

XII. Discusión

La creación de tratamientos alternativos para enfermedades causadas por *S. pneumoniae*, es un área de interés debido al aumento existencial de bacterias resistentes a los antibióticos de primera generación. El efecto bactericida que posee las AuNP's sobre *S. pneumoniae*, nos hizo considerar que se podía mejorar este efecto, debido a que las AuNP's son fáciles de funcionalizar y en varias áreas de la medicina e investigación clínica son usadas como vehículos **(Fuentes, 2012)**. Se propuso la funcionalización de las AuNP's con los antibióticos más utilizados en el área clínica y que con mayor frecuencia se han reportado casos de resistencia hacia estos, esto con el objetivo de obtener un efecto bactericida que disminuya las cantidades de AuNP's y antibiótico requeridas para eliminar a *S. pneumoniae*.

El nano-antibiótico que se diseñó mostró tener propiedades antibacterianas, conservando los beneficios de las AuNP's y los antibióticos, reduciendo las cantidades mínimas necesarias para tener un efecto bactericida sobre *S. pneumoniae*, en el caso del nano-antibiótico (penicilina G) pasamos de 512 µg/ml a 128 µg/ml de AuNP's y de 1 µg/ml a 0.25 µg/ml de penicilina G, el nano-antibiótico (ceftriaxona) paso de 512 µg/ml a 256 µg/ml de AuNP's y de 0.12 a 0.06 µg/ml de ceftriaxona, lo que significa una disminución del 75 % y el 50 % respectivamente, lo cual indica que las AuNP's al funcionalizarlas con antibiótico tienen un efecto sinérgico, potencializando la actividad bactericida en menores cantidades. Al igual que otros artículos, mencionan funcionar las AuNP's con antibióticos, todos ellos describen que existe una mejora en la actividad bactericida sobre distintas bacterias **(Saha y col, 2007, Payne y col, 2016)**. Sin embargo, describen que sólo obtuvieron una mejora del 10 al 20% a diferencia de nuestro nano-antibiótico que obtuvo una eficacia del 75%. Aunque se han generado distintos complejos donde funcionalizan AuNP's con distintos antibióticos muchos de ellos utilizan como agente reductor al antibiótico lo cual compromete su funcionalidad, pero garantiza su presencia dentro de la nanopartícula **(Saha y col 2007)** a diferencia del nano-antibiótico, el antibiótico solo recubre la superficie de las AuNP's, garantizando la integridad del antibiótico.

En el caso del nano-antibiótico (eritromicina) mostró un efecto sinérgico, en el cual ambos elementos pierden su función de bactericida y termina siendo un bacteriostático

en cantidades de 512 y 256 µg/ml de AuNP's y 0.12 y 0.06 µg/ml de eritromicina, esto solo se logró ver en el antibiótico eritromicina, en base a su mecanismo de acción sabemos que actúa a nivel de síntesis de proteínas, no obstante, la eritromicina actúa como bacteriostático en cantidades menores (**Robles, 1983**), por ello se cree que sus propiedades predominan en la síntesis del nano-antibiotic, o bien las AuNP's no permite que llegue el antibiótico a su blanco, este efecto no es visible en los otros nano-antibióticos debido a que los antibióticos con los que se funcionalizaron actúan a nivel de síntesis de pared celular, en base a este mecanismo de acción podemos decir que la cercanía de su blanco favorece la efectividad de nano-antibiotic, aunque para este nano-antibiotic (eritromicina) no pudo tener efecto bactericida debido a las cantidades de eritromicina usadas una solución sería incrementar la cantidad de eritromicina usa pero eso pondría en duda si el efecto bactericida se debe por la formulación del nano-antibiotic o por la cantidad de antibiótico empleada.

En la línea celular NL-20 que se infectó con *S. pneumoniae* mostro cambios conformacionales correspondiente a la invasión bacteriana como lo describen distintos artículos (**Shubach y col 2013, Valdés y col 2018**), en los cuales las extensiones citoplasmáticas que poseen las células se empiezan a deformar y la pared celular muestra irregularidades correspondientes a la ruptura de esta.

Las AuNP's mostraron tener efecto adverso sobre la línea celular NL-20 ya que esta generaban la lisis celular y solo se lograba ver la formación de cúmulos de material genético debido a la aglomeración de AuNP's y material genético, este cambio se apreció más con el paso del tiempo ya que se observó que el número de campos visuales era menor pero los cúmulos de material genético aumentaba y este tenía una afinidad por la pared celular ya que en varios casos se visualizó que rodea a las células o se pone sobre su superficie de estas, los efectos de las AuNP's sobre distintas líneas celulares se han descrito en varios artículos en los cuales sugiere que el tamaño y forma de esta dependen del efecto tóxico que puedan poseer (**Mateo y col, 2013**).

Al probar el antibiótico sobre la línea celular NL-20 mostró no tener efectos tóxicos sobre la línea celular NL-20, pero si para *S. pneumoniae*, ya que no se apreció un cambio conformacional, que las células presentan cuando son invadidas por *S. pneumoniae*

El recubrimiento de las AuNP's con el PEG y el antibiótico genera que las AuNP's sean más estables, y evita la aglomeración entre estas, debido a que el nano-antibiotic (Penicilina G) mostró no tener efectos tóxicos en la línea celular NL-20 infectada con *S. pneumoniae* en la cantidad de 128/0.25 µg/ml, lo que sugiere que su efecto es solo contra *S. pneumoniae*, debido a que no presenta cambios conformacionales correspondientes a la invasión de *S. pneumoniae*. **(Chapa y col, 2022).**

Limitaciones del estudio y perspectivas.

De acuerdo a los resultados obtenidos y los experimentos realizados, mostraron tener ciertas limitaciones, como la comprobación de la unión del antibiótico a las AuNP's debido a que existen métodos más eficientes para comprobar su existencia, como la difracción de rayos X, el complejo nano-antibiotic mostro ser más eficiente que sus elementos separados, necesitando menores cantidades de AuNP's y antibiótico no obstante en este estudio se utilizó la cepa *S. pneumoniae* 49619 la cual es una cepa sensible a los antibióticos y no permite observar el potencial completo de los nano-antibiotic, si estos pueden ser usados en bacterias resistentes a los antibióticos proponiendo una posible alternativa para acabar con bacterias resistentes a los antibióticos.

XIII. Conclusiones

- La síntesis de los 2 nano-antibióticos (penicilina G y ceftriaxona) mostraron tener propiedades antibacterianas.
- La síntesis del nano-antibiótico (eritromicina) presentó efecto bacteriostático.
- La CMI obtenida fue menor para el nano-antibiótico (penicilina G y ceftriaxona), a diferencia de sus elementos que lo componen por separado.
- La funcionalización de las AuNP's con el PEG ditiol y el antibiótico estabilizan las AuNP's.
- La morfología de la línea celular NL-20 no se ve alterada por la presencia del nano-antibiótico a diferencia de las AuNP's que generan muerte celular.
- El uso del nano-antibiótico sobre la línea celular NL-20 en presencia de *S. pneumoniae* mostro tener un efecto bactericida y no daño a la línea celular NL-20.

En base a los resultados obtenidos la hipótesis se cumple en el caso de los nano-antibióticos penicilina G y ceftriaxona debido a que requirieron menores cantidades de sus compuestos para eliminar a *S. pneumoniae*, demostrando que la funcionalización de las AuNP's con antibióticos genera un complejo capaz de inhibir el crecimiento de *S. pneumoniae*. No obstante, la hipótesis no se cumple para el nano-antibiótico eritromicina, debido a que no hubo un efecto bactericida, pero sí un efecto bacteriostático pese a que se partió de cantidades donde ambos elementos por separado sí tienen efecto bactericida al unirlos este efecto se perdió, lo cual sugiere que la unión de las AuNP's y antibiótico no siempre genera un complejo mejor que sus elementos separados.

XIV. Referencias

1. ARAYA, D. (2019). Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. *Acta Médica Costarric*, 28(2), 79-83.
2. Blamey, R. (2014). Vacunas anti-neumocóccicas en adultos: actualización. *Revista chilena de infectología*, 31(5), 607-609.
3. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44–52.
4. Cedano Cuadros, N. A. (2018). Evaluación de las propiedades antibacterianas de nanopartículas de cobre sintetizadas a partir de CuSO₄ y extracto de Eucalipto.
5. Cripps, A. W., Folaranmi, T., Johnson, K. D., Musey, L., Niederman, M. S., & Buchwald, U. K. (2021). Immunogenicity following revaccination or sequential vaccination with 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23) in older adults and those at increased risk of pneumococcal disease: a review of the literature. *Expert Review of Vaccines*, 20(3), 257–267.
6. Curry, J. I., Lander, T. D., & Stringer, M. D. (2001). Erythromycin as a prokinetic agent in infants and children. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 15(5), 595-603.
7. Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of precision gold nanoparticles using Turkevich method. *KONA Powder and Particle Journal*, 37, 224-232.
8. Enfermedades neumocóccicas en niños: Presentación clínica y tratamiento. (2012). *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México*, 55(2), 44–52.
9. Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., & Kjærsgaard, R. S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 854–879. doi:10.1093/femsre/fux037

10. Ercibengoa, M. (2021). Assessment of the optochin susceptibility test to differentiate *Streptococcus pneumoniae* from other viridans Group Streptococci. *Clin Lab*, 67(3).
11. Ferrer, V. F. (2006). Infecciones por neumococo. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(50), 3266-3273.
12. Fuentes, E. A. (2012). *Funcionalización de nanopartículas de oro con el péptido clpffd para potenciales aplicaciones en biomedicina (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona)*.
13. Gea-Izquierdo, Enrique. (2021). Neumonía: La pandemia ignorada. *Vive Revista de Salud*, 4(12), 3-8. Epub 00 de diciembre de 2021. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.104>
14. Gil, E., Noursadeghi, M., & Brown, J. S. (2022). *Streptococcus pneumoniae* interactions with the complement system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 929483.
15. González, Á. B. (2006). Importance of the bacterial resistance in pediatrics. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 19(76), 121-125.
16. GRIMALDI, D. C., García, G. A., & Casadiego, C. A. (2008). Nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento médico. *Universitas Médica*, 49(3), 388-398.
17. Hernández Brito, E. (2020). Susceptibilidad a la afección neumocócica en niños y en adultos: de los efectos mendelianos de la inmunidad a los estudios genéticos poblacionales (Doctoral dissertation).
18. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1313&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle
19. Izquierdo-Fiallo, K., Guerra-Peña, Y., Remedios-Jiménez, L., Lemus-Cortés, A., Burget-Batista, A., & Pérez-Quiñoy, J. L. (2020). Estudio de consistencia de un cultivo en zaranda de *Streptococcus pneumoniae* 19A a escala de 40 L. *VacciMonitor*, 29(2), 47–50.
20. Jesudason, T. (2024). WHO publishes updated list of bacterial priority pathogens. *The Lancet Microbe*, 5(9).
21. Jutinico Shubach, A. P., Malagón Garzón, E., & Sánchez Mora, R. M. (2013). Cultivo de la línea celular HEp-2: doblaje poblacional y coloración con Giemsa

- Perspectivas para el estudio de la infección con *Chlamydia trachomatis*. *Nova*, 11(20), 23-33.
22. Koelman, D. L. H., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. J. C. M. (2020). *Resurgence of pneumococcal meningitis in Europe and Northern America*. *Clinical microbiology and infection*, 26(2), 199-204.
 23. Letek, M. (2020). Alexander Fleming, The discoverer of the antibiotic effects of penicillin. *Frontiers for Young Minds*, 7(7).
 24. Lopardo, H. (2014). *Cocos gram positivos catalasa negativos* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
 25. López Pastrana, D. (2022). Análisis de la resistencia a eritromicina de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19a en hospitales pertenecientes a red GIVEBPVac durante el periodo 1993-2019.
 26. Manna, S., Werren, J. P., Ortika, B. D., Bellich, B., Pell, C. L., Nikolaou, E., ... & Satzke, C. (2024). *Streptococcus pneumoniae* serotype 33G: genetic, serological, and structural analysis of a new capsule type. *Microbiology spectrum*, 12(1), e03579-23.
 27. Marquart, M. E. (2021). Pathogenicity and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Cutting to the chase on proteases. *Virulence*, 12(1), 766-787.
 28. Martínez Garriga, B. (2005). *Contribución al estudio de los mecanismos moleculares de la resistencia a ciprofloxacina en "Streptococcus pneumoniae"*. Universitat de Barcelona.
 29. Mateo, Diego, Morales, Paloma, Ávalos, Alicia, & Haza, Ana I. (2013). Nanopartículas de oro: aplicaciones y citotoxicidad in vitro. *Acta toxicológica argentina*, 21(2), 102-109.
 30. McDevitt, E., Khan, F., Scasny, A., Thompson, C. D., Eichenbaum, Z., McDaniel, L. S., & Vidal, J. E. (2020). Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* Results in Alpha-hemolysis by Oxidation of Oxy-hemoglobin to Met-hemoglobin. *Msphere*, 5(6), 10-1128.
 31. Muñoz Chiriguay, A. C. (2018). Factores de riesgo su influencia en la rinofaringitis en niños menores de 10 años de la ciudadela Lupita Cantón Baba. Los Ríos. Septiembre 2017-febrero (Bachelor's thesis, BABAHOYO, UTB 2018).

32. Musser, J. M., Beres, S. B., Zhu, L., Olsen, R. J., Vuopio, J., Hyyryläinen, H. L., ... & Palzkill, T. (2020). Reduced *in vitro* susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to β -lactam antibiotics associated with mutations in the *pbp2x* gene is geographically widespread. *Journal of clinical microbiology*, 58(4), 10-1128.
33. Naranjo-Herrera, Ana María, Correa-Torres, Sandra Natalia, & Herrera-Barros, Adriana Patricia. (2017). Evaluación de la propiedad antimicrobial de las nanopartículas de oro sintetizadas con extractos de *tamarindus indica* L y *mangifera indica* L. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 18(4), 389-398. Recuperado en 04 de octubre de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432017000400389&lng=es&tlng=es.
34. Noda Albelo, A., Vidal Tallet, L. A., Vidal Tallet, J. I., & Hernández Álvarez, L. (2011). *Streptococcus pneumoniae*, mecanismos de resistencia antimicrobiana. *Revista Cubana de Pediatría*, 83(3), 288-295.
35. Okuda, M. (2015). Mechanism of action of a class of antibiotics from their entry to their target in bacteria: a real time visualization (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
36. Oldfield, E., & Feng, X. (2014). Resistance-resistant antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(12), 664-674.
37. Oroz, M. M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Anales de Química de la RSEQ*, (1), 33-41.
38. Ortiz-Benitez, E. A., Carrillo-Morales, M., Velázquez-Guadarrama, N., Fandiño-Armas, J., & Olivares-Trejo, J. D. J. (2015). Inclusion bodies and pH lowering: as an effect of gold nanoparticles in *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics*, 7(7), 1173-1179.
39. Ortiz-Benítez, E. A., Velázquez-Guadarrama, N., Durán Figueroa, N. V., Quezada, H., & Olivares-Trejo, J. D. J. (2019). Antibacterial mechanism of gold nanoparticles on *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics*, 11(7), 1265-1276.
40. Ospina-Henao, Sebastián, Torres, Juan Pablo, Brea, José, & Ávila-Agüero, María L.. (2023). Vacunas conjugadas contra neumococo en pediatría, su impacto en la Salud Pública. *Andes pediátrica*, 94(2), 246-253. Epub 15 de abril de 2023.

41. Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, 38(6), 864-870.
42. Payne, J. N., Waghvani, H. K., Connor, M. G., Hamilton, W., Tockstein, S., Moolani, H., ... & Dakshinamurthy, R. (2016). Novel synthesis of kanamycin conjugated gold nanoparticles with potent antibacterial activity. *Frontiers in microbiology*, 7, 607.
43. Pechère J. C. (2001). *Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. International journal of antimicrobial agents*, 18 Suppl 1, S25–S28. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00407-1](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00407-1)
44. PREADO J., VALERIA. (2001). Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS BÁSICOS. *Revista chilena de infectología* , 18 (Supl. 1), 6-9.
45. Rodriguez Molina, M., & Chambi Rodriguez, A. D. (2019). Determinación de la curva de crecimiento microbiano Saccharomyces Boulardii en tunta variedades chaska y negra. *Fides et Ratio - Revista de Difusión cultural y científica de la Universidad La Salle en Bolivia*, 18(18), 201–214.
46. Russell, A. D. (2004). Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*, 152-186.
47. Saha, B., Bhattacharya, J., Mukherjee, A., Ghosh, A., Santra, C., Dasgupta, A. K., & Karmakar, P. (2007). *In vitro structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics. Nanoscale Research Letters*, 2, 614-622.
48. Serrano-Mayorga CC, Ibáñez-Prada ED, Restrepo-Martínez JM, Garcia-Gallo E, Duque S, Severiche-Bueno DF, Severiche-Bueno DF, Gomez S, Vargas H, Reyes LF. The potential impact of PCV-13, PCV-15 and PCV-20 vaccines in Colombia. *Vaccine*. 2024 Mar 7;42(7):1435-1439. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.01.086. Epub 2024 Feb 9. PMID: 38336559.
49. Short, K. R., Reading, P. C., Wang, N., Diavatopoulos, D. A., & Wijburg, O. L. (2012). Increased nasopharyngeal bacterial titers and local inflammation facilitate transmission of Streptococcus pneumoniae. *MBio*, 3(5), 10-1128.
50. Stafstrom, C. E., Nohria, V., Loganbill, H., Nahouraii, R., Boustany, R. M., & DeLong, G. R. (1995). Erythromycin-induced carbamazepine toxicity: a

- continuing problem. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 149(1), 99-101.
51. Sugimoto, M., Fukami, S., Kayakiri, H., Yamazaki, S., Matsuoka, N., Uchida, I., & Mashimo, T. (2002). The β -lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of action at GABAA receptors. *British journal of pharmacology*, 135(2), 427-432.
52. Valdés-Hernández, I., Valdés-Martínez, J., Rodríguez-Sánchez, H., Yglesias-Rivera, A., Díaz-García, A., & Echemendía-Font, M. (2018). Diferencias en la fagocitosis de *Mycobacterium´ habana´ TMC 5135* en cultivos celulares de macrófagos murinos. *VacciMonitor*, 27(1), 1-7.
53. Wing, C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29.
54. Yaghoobi, A., Abiri, R., Alvandi, A., Manouchehri, I., Arkan, E., & Jalalvand, A. R. (2024). A novel biosensing strategy for identification of three important bacteria causing meningitis. *Journal of Microbiological Methods*, 222, 106954.