



COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

MAESTÍA EN CIENCIAS GENOMICAS

“Acoplamiento de proteínas secretadas por *Streptococcus pneumoniae* a una nanopartícula de hierro”

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. Mariana Carrillo Morales

Director de tesis

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

México D.F. Enero, 2015

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.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, aprobó esta tesis el día 26 de enero del 2015, en la ciudad de México D.F. para optar el grado de Maestro en Ciencias Genómicas, a la Químico Farmacobiólogo Mariana Carrillo Morales.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dr. Marco Antonio Gonzáles López

A ti, que durante 23 años me brindaste
todo el cariño, apoyo y amor que la
mejor abuelita del mundo pudo dar.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de México por el apoyo académico brindado durante el tiempo de mi formación.

A CONACyT por el apoyo económico por medio del convenio SALUD-2012-01-181641 para la elaboración del proyecto y la beca académica que me fue proporcionada.

A los doctores que formaron parte de mi aprendizaje, en especial a mi comité tutorial (DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO, DRA. NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA, DRA. ELISA IRENE AZUARA LICEAGA, DR. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ LÓPEZ).

A la academia de profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas por todas enseñanzas en este tiempo (Dra. Elizabeth, Dra. Minerva, Dra. Mavil, Dra. Lili, Dra. Zelene, Dr. César, Dra. Itzel, Dr. Mauricio).

A mis compañeros de generación y posgrado por sus consejos, apoyo y convivencia durante este tiempo (Nayeli, David, Lucía, Ricardo, Karla, Montserrat, Kenji, Hugo, Cecilia, Francisco, José Luis, Helios, Jaqueline, Daniel, Ada, Jorge, Yebran, Alí, Olga, Francisco, Rubí, etc.)

A mis compañeros de laboratorio por todos los buenos momentos compartidos y el gran apoyo que día con día me brindaron (Elena, Alama, Cristian, Marlen, Domingo, Lupita), en especial al Dr. Marco por toda la paciencia para que pudiese tener un mejor desarrollo en el laboratorio.

A ti Edgar que siempre me has acompañado, aconsejado, pero sobre todo has sido el mejor de los amigos y un gran apoyo para mi desarrollo personal.

A mi familia (mami, daddy y mis hermanos), por creer y confiar en mí, ayudar en todas las formas posibles para que esta oportunidad pudiese darse, pero sobre todo, por el amor que siempre me dan. En particular a mis tíos (Marta y Roberto), que me han cuidado y apoyado como a una hija en este tiempo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	13
I.- INTRODUCCIÓN.....	14
1.- ANTECEDENTES GENERALES.....	14
1.1.- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
1.2.- Taxonomía.....	14
1.3.- Morfología y Crecimiento.....	15
1.4.- Estructura y Factores de Virulencia.....	16
1.4.1.- Cápsula.....	16
1.4.2.- Pared celular.....	17
1.4.3.- Membrana celular.....	17
1.4.4.-Factores de virulencia.....	17
1.4.4.1.- Cápsula.....	17
1.4.4.2.- Pared celular.....	17
1.4.4.3.- Neumolisina (pnumolisina).....	18
1.4.4.4.- Neuraminidasa.....	18
1.4.4.5.- Adherencia.....	18
1.4.4.6.- Autolisina (amidasa).....	18
1.4.4.7.- Proteasa de la inmunoglobulina A.....	19
1.4.4.8.- Hialuronidasa.....	19
1.4.4.9.-Proteínas de superficie PspA y PsaA.....	19
1.4.4.10.- Proteína PhpA.....	19
1.4.4.11.- Alfa-hemolisina.....	19
1.5.- Transmisión y Respuesta Inmune.....	20

1.6.- Tratamiento y Resistencia.....	22
1.6.1.- Tratamiento por excelencia.....	22
1.6.2.- Resistencia.....	22
II.- ESTADO DEL ARTE.....	25
2.- Nanotecnología.....	25
2.1.- Nanotecnología y su uso terapéutico.....	25
2.1.2.- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe ₃ O ₄).....	28
III.- ANTECEDENTES PARTICULARES.....	30
IV.- IMPORTANCIA.....	32
V.- OBJETIVOS.....	33
5.1.- Objetivo general.....	33
5.2.- Objetivos particulares.....	33
VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
VII.- METODOLOGÍA.....	35
7.1.- Cultivo bacteriano de <i>S. pneumoniae</i>	35
7.1.1.- Cultivo de <i>S. pneumoniae</i> en medio sólido.....	35
7.1.2.- Cultivo de <i>S. pneumoniae</i> en medio líquido.....	35
7.1.3.- Conservación bacteriana de <i>S. pneumoniae</i> en el laboratorio.....	35
7.2.- Pruebas de identificación bioquímica de <i>S. pneumoniae</i>	35
7.2.1.- Tinción Gram.....	35
7.2.2.- Determinación de la actividad de la catalasa.....	36
7.2.3.- Sensibilidad a optoquina de <i>S. pneumoniae</i>	36
7.3.- Curvas de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	36
7.4.- Purificación de proteínas de <i>S. pneumoniae</i>	36
7.4.1.- Obtención y purificación de proteínas secretadas de <i>S. pneumoniae</i>	36
7.4.2.- Cromatografía de afinidad.....	37
7.4.3.- Purificación de la proteína de 38KDa a partir de geles preparativos de poliacrilamida.....	37

7.4.4.- Preparación de la columna de intercambio.....	38
7.5.- Preparación de geles SDS-PAGE.....	38
7.5.1.- SDS-PAGE al 12%.....	38
7.6.- Tinción de geles SDS-PAGE.....	39
7.6.1.- Tinción con azul de Coomassie G-250.....	39
7.7.- Acoplamiento de proteínas a nanopartículas de óxido de hierro (NPs).....	39
7.8.- Cuantificación de proteínas.....	39
7.9.- Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	40
7.9.1.- Preparación de inóculos para los ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC).....	40
7.9.1.1.- Preparación de la concentración 0.5 de McFarlan.....	40
7.9.1.2.-Preparación del inóculo para el MIC.....	41
7.9.2.- Preparación de diluciones.....	41
7.9.2.1.- Preparación de las distintas concentraciones de nanopartículas para los ensayos de MIC.....	41
7.9.3.- Montaje en placa de ELISA de 96 pozos para los ensayos de MIC.....	41
7.10.- Ensayos de viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> en presencia de nanopartículas de óxido de hierro.....	41
7.11.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	41
7.11.1.- Preparación de la rejilla de cobre con una malla nominal de 200 con formvar.....	41
7.11.2.- Preparación de la rejilla de cobre-formvar con muestra.....	42
7.11.3.- Visualización de las muestras en el microscopio electrónico de transmisión.....	42
7. 12.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	42
7.12.1.- Preparación de muestras.....	42
VIII.- RESULTADOS.....	44
8.1.- Determinación de la susceptibilidad del <i>Streptococcus pneumoniae</i> a las	

nanopartículas de hierro.....	44
8.1.2.- Elección de nanopartículas.....	45
8.1.3.- Crecimiento bacteriano de <i>S. pneumoniae</i> en medio líquido.....	47
8.1.4.- Ensayos de concentración mínima inhibitoria.....	47
8.1.5.- Ensayos de viabilidad.....	52
8.2.- Purificación de proteínas secretadas por <i>S. pneumoniae</i> con afinidad a hierro.....	54
8.2.1.- Obtención de la proteína secretada y cromatografía de afinidad.....	54
8.2.2.- Elección e identificación de proteína secretada.....	55
8.3.- Acoplar la proteína GAPDH secretada por <i>Streptococcus pneumoniae</i> a una nanopartícula de hierro, creando un conjugado nanopartícula-proteína.....	56
8.3.1.- Cuantificación proteica.....	56
8.3.2.- Acoplamiento de proteína a nanopartículas de hierro.....	56
8.4.- Evaluación la susceptibilidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i> al bioconjugado.....	58
8.4.1.- Ensayo de concentración mínima inhibitoria.....	59
8.4.2.- Ensayos de viabilidad de tres cepas <i>S. pneumoniae</i>	62
8.5.- Determinación de la interacción del bioconjugado sobre la estructura bacteriana de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	63
8.5.1.- Observación en Microscopio Electrónico de Barrido.....	63
IX.- DISCUSIÓN.....	70
XI.- CONCLUSIONES.....	72
XII.- REFERENCIAS.....	73
XIII.- APÉNDICES.....	79

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C: grados centígrados.	µg/ml: microgramos por mililitro
µl: microlitros.	µm: micrómetros
aprox.: aproximadamente.	CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂ : dióxido de carbono	DNA: ácido desoxirribonucleico.
DO: densidad óptica.	DTT: Dithiothreitol.
<i>E. coli.</i> : <i>Escherichia coli</i>	EDTA: ácido etildiaminotetraacético
EMB: microscopia electrónica de barrido.	g: gravedades.
GAPDH: gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa.	hrs, h= horas, hora.
IgA: inmunoglobulina A.	<i>K. pneumoniae</i> : <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
KDa: kilodaltones.	L1-L4: lavado 1- lavado 4.
M: molar.	mg/ml: miligramos por mililitro.
MH: Mueller Hinton.	MIC: concentración mínima inhibitoria.
min: minutos.	ml: mililitro.
nm: nanómetros.	NPs: nanopartículas.
<i>P. aeruginosa</i> : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	pb: pares de bases.
PBP: proteínas de unión a penicilina.	PEG: polietilen glicol.
PM: peso molecular.	PS: polisacáridos capsulares.
PT: proteínas totales.	PVC: policloruro de vinilo.
<i>S. aureus</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> .	<i>S. pneumoniae</i> : <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
SDS: dodecilsulfato sódico.	TCA: ácido tricloroacético.
TEM: microscopia electrónica de transmisión.	TH= Todd Hewitt.
Tris-HCL: Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride	UFC: unidades formadoras de colonias

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1: cuadro comparativo del genoma entre las cepas de <i>S. pneumoniae</i> R6 y TIGR4.....	14
Tabla 2. Factores de virulencia y su función durante la colonización.....	19
Tabla 3. Factores bacterianos que facilitan la invasión.....	19
Tabla 4: Resistencia de <i>S. pneumoniae</i> en enfermedades no meníngeas en el año 2012.....	22
Tabla 5: Resistencia de <i>S. pneumoniae</i> en enfermedades meníngeas en el año 2012.....	22
Tabla 6. Probables funciones bactericidas de diferentes nanopartículas.....	26
Tabla 7: volúmenes necesarios para la preparación de la fase separadora en un gel de poliacrilamida de aproximadamente 10 cm x 7.4 cm.....	37
Tabla 8: volúmenes necesarios para la preparación de la fase concentradora en un gel de poliacrilamida de aproximadamente 10 cm x 7.4 cm.....	37
Tabla 9: volúmenes y concentraciones necesarias para la preparación de la curva estándar.....	39
Tabla 10: Identificación por masas de la proteína purificada por cromatografía de afinidad.....	54
Tabla 11: Resultados del análisis de Bradford para calcular la cantidad de proteína acoplada a las nanopartículas de hierro.....	55
Figura 1. Crecimiento y morfología de <i>S. pneumoniae</i> en agar sangre.....	15
Figura 2. Estructura y factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i>	18
Figura 3. Respuesta inmune a la invasión por <i>S. pneumoniae</i> en el pulmón.....	20
Figura 4. Esquemas de los distintos tipos de resistencia de <i>S. pneumoniae</i>	23
Figura 5. Comparación de tamaños de las nanopartículas.....	24
Figura 6. Uso de nanomateriales en la nanomedicina.....	28
Figura 7. Pasos a seguir para la preparación de formvar.....	41
Figura 8. Tinción Gram de tres cepas de <i>S. pneumoniae</i>	43
Figura 9. Determinación de la sensibilidad a optoquina en <i>S. pneumoniae</i>	43
Figura 10. Comparación de la reacción de catalasa.....	44
Figura 11. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de óxido de hierro.....	44
Figura 12. Curva de crecimiento normal de tres cepas de <i>S. pneumoniae</i>	45

Figura 13: MIC de la cepa ATCC 49619 para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG como las que están desnudas, a concentraciones que van desde 128 a 0.007 µg/ml.....	47
Figura 14: MIC de la cepa TIGR4 para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG como las que están desnudas, a concentraciones que van desde 128 a 0.007 µg/ml.....	48
Figura 15: MIC de la cepa R6 para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG como las que están desnudas, a concentraciones que van desde 128 a 0.007 µg/ml.....	49
Figura 16: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619.....	50
Figura 17: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> R6.....	51
Figura 18: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> TIGR4.....	51
Figura 19: Gel SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a hierro de las proteínas secretadas por la cepa R6 de <i>S. pneumoniae</i>	52
Figura 20: Gel SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a hierro de las proteínas secretadas por la cepa TIGR4 de <i>S. pneumoniae</i>	53
Figura 21: Curva estándar de Bradford.....	55
Figura 22: Imagen comparación visual de los cambios en las nanopartículas desnudas y recubiertas con la proteína.....	56
Figura 23: MIC realizado para <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619, para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína.....	58
Figura 24: MIC realizado para <i>S. pneumoniae</i> TIGR4, para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína.....	59
Figura 25: MIC realizado para <i>S. pneumoniae</i> R6, para evaluar la susceptibilidad del <i>S. pneumoniae</i> a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína.....	60
Figura 26: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 vs bioconjugado.....	61
Figura 27: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 vs bioconjugado.....	61
Figura 28: Evaluación de la viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> R6 vs bioconjugado.....	62
Panel A: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de <i>S. pneumoniae</i> R6 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir.....	63
Panel B: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir.....	64

Panel C: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir.....	65
Panel D: Imágenes de MEB de <i>S. pneumoniae</i> R6 tatadas con el bioconjugado.....	66
Panel E: Imágenes de MEB de <i>S. pneumoniae</i> TIGR4 tatadas con el bioconjugado.....	66
Panel F: Imágenes de MEB de <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 tratadas con el bioconjugado.....	67
Panel G: Imágenes de MEB de las nanopartículas de óxido de hierro sin bacterias.....	68

RESUMEN

El campo de nanotecnología ha crecido enormemente y está presente en prácticamente todos los ámbitos de nuestra vida diaria, como una computadora, un celular, ropa, autos, electrodomésticos y en la actualidad, ha incursionado en el ámbito médico. Las nanopartículas (NP's) es la manera en que la nanotecnología trata de ayudar y crear nuevas alternativas terapéuticas. La amplia gama de NP's que se han probado, han mostrado desde efectos citotóxicos, bactericidas o inertes tanto para células eucariotas como procariontes, los cuales son dependientes de la composición de las NP's.

Considerando estos puntos probamos las NP's de hierro (FeNP's), las cuales han mostrado ser inertes para algunos tipos celulares y bacterias.

Explotamos esta propiedad probamos su efecto sobre las cepas de *S. pneumoniae*, las cuales no se ven afectadas en su crecimiento hasta los 128 µg/ml de FeNP's. Con estos datos se purificó e identificó una proteína secretada por *S. pneumoniae* de 38.7 kDa, la cual es la proteína GAPDH y mostró tener afinidad por el grupo hemo. Con la proteína GAPDH logramos sintetizar un bio-conjugado FeNP-proteína, la cual no mostró tener un efecto bactericida hasta los 128 µg/ml en *S. pneumoniae*.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- ANTECEDENTES GENERALES

1.1.- *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus pneumoniae es un importante patógeno humano, agente etiológico de neumonía, meningitis, sinusitis, otitis media entre otros padecimientos. Su capacidad infecciosa lo ha convertido en un problema de salud mundial, debido a la aparición de cepas resistentes a penicilina (principal antibacterial usado como tratamiento), lo cual ha aumentado la morbilidad y mortalidad [10, 11, 12].

1.2.- Taxonomía.

Las primeras descripciones de *S. pneumoniae*, fueron hechas por Pasteur en 1881, quien lo llamó “microbio septicémico de la saliva”, y posteriormente por Stenberg quien lo denominó *Micrococcus pasteurii*. La relación como agente causal de la neumonía fue descubierta por Weichselbaun y Fraenkel, llamándolo neumococo (pneumon: pulmón y kokkos: grano), y en 1920 fue cambiado a *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología característica de formar cadenas cortas o en pares. Desde 1974, en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey fue denominado *Streptococcus pneumoniae*. Su hábitat en el humano y algunos animales suele ser el aparato respiratorio, pero en casos severos, se puede encontrar en otros tejidos, produciendo procesos inflamatorios supurativos [3, 10, 11, 12, 31].

S. pneumoniae está clasificado en: el dominio *Bacteria*, phylum *Firmicutes*, clase *Bacilos*, Orden *Lactobacillales*, familia: *Streptococcaceae* y género *Streptococcus* [11]. El género *Streptococcus* se clasifica usando como base su requerimiento de oxígeno en: aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios obligados.

Los anaerobios facultativos se clasifican de acuerdo a la hemólisis que producen en el agar sangre: alfa (halo verdoso alrededor de la colonia debido a la lisis parcial de los eritrocitos), beta (halo transparente alrededor de la colonia donde los glóbulos rojos han sido completamente lisados) y gamma (no se observa hemólisis puesto que no la producen), según la cual, el *S. pneumoniae* es un coco anaerobio facultativo alfa-hemolítico [1, 3, 6, 10, 11, 12].

Las cepas de *S. pneumoniae* representativas de uso común en el laboratorio son las cepas ATCC 49619, R6 y TIGR4, las cuales generalmente se usan para comparaciones entre cepas patógenas y no patógenas por las siguientes características (Tabla 1):

Tabla 1: cuadro comparativo del genoma entre las cepas de *S. pneumoniae* R6 y TIGR4.

CEPA R6	CEPA TIGR4	CEPA ATCC 49619
Único cromosoma circular con 2038615 pb. Contenido C+G= 40%. 2043 proteínas predichas y 73 genes de RNA no codificantes con 4 operones rRNA. Deleción de 7504 pb en la región ~18-kpb que contendría siete genes que codifican para la cápsula. La cepa antecesora es la cepa D39 [60].	Único cromosoma circular con 2160837 pb. Contenido C+G= 39.7% 2236 genes identificados con 4 operones RNA. Originaria de un aislado clínico. [59]. Mantiene los genes que codifican para la cápsula, tiene 9 genes divergentes y 6 de ellos presentan nucleótidos atípicos.	Único cromosoma circular con aproximadamente 690 pb más que las dos cepas anteriores. Contenido C+G= aprox. 40%. Contiene los genes que codifican para la cápsula.

1.3.- Morfología y Crecimiento.

S. pneumoniae es un diplococo Gram positivo, lanceolado, de 0.5 a 1.5µm de diámetro, arreglado en pares o cadenas cortas (en medio líquido), encapsulado, no esporulado, catalasa y oxidasa negativa, sensible a la optoquina e inmóvil. Para su crecimiento requieren medios enriquecidos, con un pH de 7.6, a una temperatura de 37°C y una concentración de CO₂ de entre 5 y 10% [1,3, 4, 7]. Aunado a esto, *S. pneumoniae* necesita cantidades de hierro para su supervivencia y colonización figura 1, para esto se presupone que cuenta con un mecanismo que consiste en secretar proteínas llamadas hemóforos, estas proteínas unen el grupo hemo y lo dirigen a proteínas llamadas receptor, ya que debe obtenerlo directamente de su hospedero.



Figura 1. Crecimiento y morfología de *S. pneumoniae* en agar sangre. Se observa la hemólisis alfa o parcial en halos verdoso alrededor de la colonia debido a la actividad de la alfa hemolisina, así como la forma típica de la colonia.

1.4.- Estructura y Factores de Virulencia.

1.4.1.- Cápsula

S. pneumoniae está rodeado de una cápsula polisacárida, siendo esta su estructura más externa, la cual lo protege de ser fagocitado por los leucocitos y permite su reproducción en los tejidos del huésped, por lo que se considera el principal factor de virulencia, ésta se sintetiza continua y rápidamente durante la fase logarítmica de crecimiento, figura 2. Constituida por polímeros de alto peso molecular que consisten en unidades de oligosacáridos (2-8 monosacáridos) repetitivas ligadas covalentemente a la pared celular. Existen variantes morfológicas de cepas de neumococo, clasificadas en función del fenotipo que presentan en placas transparentes de agar, ya sean opacas o transparentes. Las primeras presentan mayor cantidad de cápsula polisacárida, un menor contenido de ácidos teicoicos en la pared celular y se han asociado con una mayor virulencia, debido a un incremento de la supervivencia en la sangre. Las transparentes poseen menor cantidad de cápsula y mayor contenido de ácidos teicoicos, aumentando su capacidad para colonizar la nasofaringe [1, 6].

Rebecca Craighill Lancefield en 1933, fue la primera en usar los polisacáridos capsulares (PS) para su identificación, extrayéndolos y enfrentándolos con anticuerpos específicos, actualmente se conocen 93 diferentes [32], en esta parte es donde más varía el *S. pneumoniae* ya que lleva a cabo un proceso llamado transformación (incorpora material genético del medio proveniente de otros microorganismos), permitiendo una adaptación más rápida y eficiente al medio [32]. El polisacárido capsular es un antígeno no proteíco, que induce la formación de anticuerpos en los humanos, este antígeno es T independiente y puede interactuar directamente con las células B [3, 6].

1.4.2.- Pared celular.

Rodea a la membrana citoplasmática y confiere la morfología típica, protegiéndola de la lisis osmótica o mecánica. Es el medio de intercambio de solutos entre el exterior y el interior celular, punto de unión para proteínas del crecimiento, división celular e interacciones de la célula con el medio exterior. Tiene funciones en la colonización, adherencia, inflamación e invasión bacteriana [1, 6].

Está constituida por subunidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico, enlazadas por puentes peptídicos $\beta 1 \rightarrow 4$ [2], con un espesor de 15-40 nm. Contiene ácido teicoico, rico en galactosamina, fosfato y en colina con una función reguladora de la hidrólisis. Se dispone de dos formas en la pared celular, una expuesta en la superficie celular (sustancia C o polisacárido C (C-PS)), el cual está ligado covalentemente al peptidoglicano por residuos de ácido murámico y puede activar el sistema del complemento por la vía alterna [1,9]. También están la proteína R (especie específica) y la proteína M (tipo específica) [9, 6].

1.4.3.- Membrana celular.

Contiene al antígeno de Forssman, que está formado de ácido lipoteicoico y ácido teicoico ligado covalentemente a lípidos, se encuentra distribuido en la membrana y está en las moléculas de C-PS expuestas en la superficie. Las partes lipídicas están ancladas en la doble capa de lípidos de la membrana plasmática. La presencia de este antígeno inhibe fuertemente la autolisina neumocócica y regula la actividad de la enzima mureína hidrolasa (actividad en la lisis bacteriana), y es excretado durante la fase estacionaria del crecimiento, y su pérdida lleva a la degradación de la pared [6, 9].

1.4.4.-Factores de virulencia.

1.4.4.1.- Cápsula.

Resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares, lo que permite un mecanismo de escape eficiente de las defensas del hospedero. Inhibe la activación del complemento por la vía alterna degradando el fragmento C3b que se une a la superficie bacteriana. Las variaciones en la composición química y la cantidad de polisacárido capsular producido determinan la supervivencia de la bacteria en la circulación y permiten ocasionar enfermedad invasora [30], figura 2.

1.4.4.2.- Pared celular.

Involucrada en la inflamación debida a la infección, que es causada por los ácidos teicoicos y los fragmentos de peptidoglicano de la pared celular. Activa la vía alterna del complemento, que lleva a la producción de citosinas, dando como resultado fiebre y choque anafiláctico. Ayuda en la modulación, a través de la variación de fase (modificación que le permite a *S. pneumoniae* un cambio de una cepa no virulenta a una cepa virulenta), para la distribución de subcomponentes de la pared

relacionados con la internalización de la bacteria o la inducción de la respuesta inflamatoria durante el proceso de infección [25].

1.4.4.3.- Neumolisina (pnumolisina).

Citotoxina intracelular que destruye la membrana de los glóbulos rojos, no es secretada, es liberada en la lisis bacteriana. Su peso molecular es de 52,8 kDa, está involucrada en el mecanismo de escape de la bacteria contra la respuesta inmune del hospedero, ya que impide la activación de la vía clásica del complemento. Se une al colesterol de la membrana de la célula eucariótica a la que destruye a través de la formación de poros. A su actividad se debe la hemólisis observada al ser cultivada en medios con sangre.

1.4.4.4.- Neuraminidasa.

Proteína de 107 KDa y está asociada a la pared celular, separa por hidrólisis el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células y en fluidos corporales, facilitando la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero, disminuyendo la viscosidad del moco que reviste el epitelio respiratorio exponiendo los receptores y facilitando la colonización [10].

1.4.4.5.- Adherencia.

S. pneumoniae establece una íntima interacción con el moco del tracto respiratorio, se adhiere a la superficie de las células epiteliales, esta unión está mediada por un receptor de disacáridos en la fibronectina, presente en las células epiteliales faríngeas humanas, esta unión puede estar mejorada y/o facilitada por previas infecciones del virus de la gripe, o la neuraminidasa viral, la cual escinde el ácido siálico de glicoesfingolípidos, el que está presente en el tejido pulmonar humano, exponiendo otras estructuras que funcionan como receptores para adherir neumococos y posteriormente es capaz de invadirlas [1, 5, 6,].

1.4.4.6.- Autolisina (amidasa).

Hidroliza la capa de peptidoglicano en un sitio específico (entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico) durante la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria. Depende de la presencia de fosfato de colina en el ácido teicoico de la pared celular, lo que permite la división celular. Está localizada en la membrana celular. La lisis del neumococo por sales biliares, ocurre a través de la activación de esta enzima, y es activada por la lisozima humana, factor de defensa del hospedero liberado durante la infección y la inflamación, e induce así la lisis del neumococo, lo que aumenta el proceso inflamatorio [11].

1.4.4.7.- Proteasa de la inmunoglobulina A.

Enzima extracelular, hidroliza e inactiva la inmunoglobulina A1, rompiendo la unión prolil-treonil de la molécula de IgA presente en las mucosas, lo que facilita la adherencia y colonización inicial [10, 11, 12].

1.4.4.8.- Hialuronidasa.

Enzima responsable de cortar el ácido hialurónico y es secretada durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano [10].

1.4.4.9.-Proteínas de superficie PspA y PsaA.

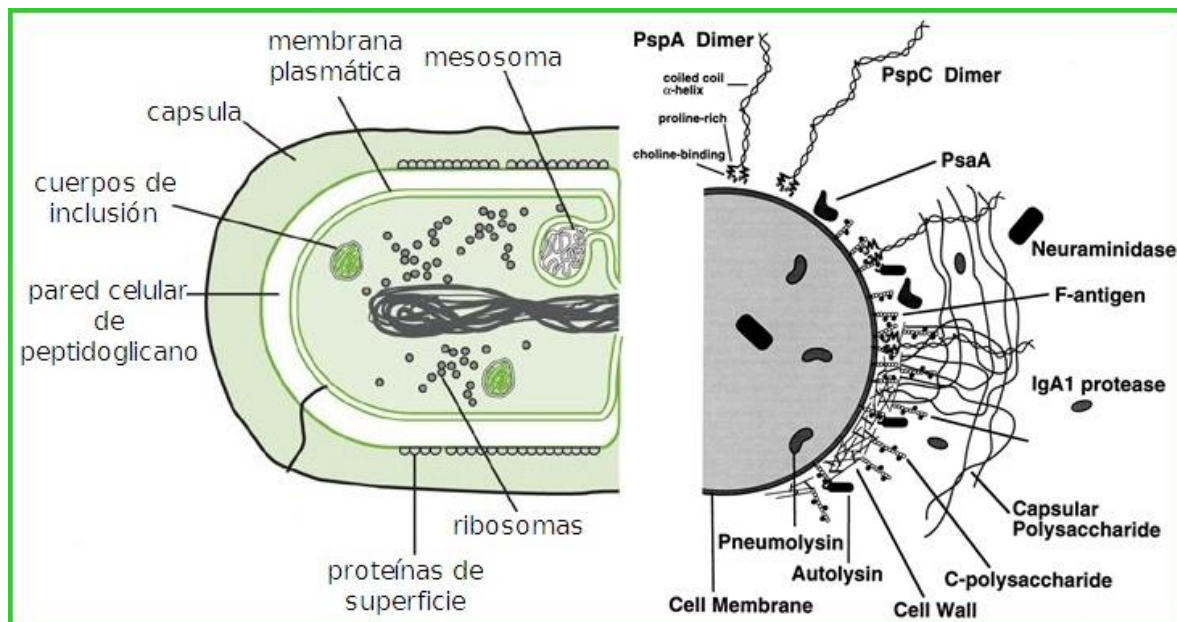
Participan en la adherencia inicial a la célula blanco [11].

1.4.4.10.- Proteína PhpA.

Proteína de superficie que tiene actividad de degradación de C3, con esto previene el aclaramiento debido al complemento [9, 11].

1.4.4.11.- Alfa-hemolisina.

Degrada eritrocitos en la sangre, para obtener algunos factores que necesita para su óptimo desarrollo.



Rosenthal & Tan : Rapid Review Microbiology and Immunology, 3rd Edition

Figura 2. Estructura y factores de virulencia de *S. pneumoniae*. Del lado izquierdo se muestra la estructura general de las bacterias Gram positivas, la cual es con la que cuenta el *S. pneumoniae*; del lado derecho se muestra la estructura particular del *S. pneumoniar* así como la localización de sus principales factores de virulencia.

1.5.- Transmisión y Respuesta Inmune.

El *S. pneumoniae* habita en el tracto respiratorio superior del humano, su transmisión se da de persona a persona, por medio del contacto directo con secreciones de pacientes enfermos. La respuesta inmune depende del estadio infeccioso y se lleva en diferentes etapas.

* Adherencia al epitelio nasofaríngeo: primer paso en la colonización por *S. pneumoniae* [5]. Algunos de los factores de virulencia como la cápsula y algunas proteínas de membrana (PspA, PsaA), juegan un papel relevante durante la colonización (Tabla 2) [8].

Tabla 2. Factores de virulencia y su función durante la colonización.

FACTOR DE VIRULENCIA	Función
Polisacáridos capsulares.	Evita que sea detenido en el moco nasal, permitiendo el acceso a las superficies epiteliales. Inhibe la opsonofagocitosis eficaz.
CHoP	Se une a rPAF en el epitelio nasofaríngeo
CbpA (PspC)	Se une al componente secretor humano en un receptor polimérico de Ig durante la primera etapa de la translocación a través del epitelio.
NanA, BgaA and StrH	Actúa de forma secuencial para cortar azúcares a partir de glicoconjugados humanos, revelando los receptores de adhesión.
Hyl	Descompone componentes de la matriz extracelular que contienen ácido hialurónico.
PavA	Se une a fibronectina.
Eno	Se une a plasminógeno.

* Invasión: dependerá de distintos factores, los principales son, el estado inmunológico del paciente y la virulencia de la cepa [30]. Para que llegue a los bronquios y pulmones dependerá del fallo de las defensas específicas (IgA) y no específicas (tos, secreción mucosa, y el transporte ciliar) [5, 8]. Algunos de los factores que tienen actividad durante la invasividad se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Factores bacterianos que facilitan la invasión.

Factor	Función
Ply	Toxina citolítica, activa el complemento [29].
PspA	Previene la unión de C3 sobre la superficie neumocócica. Se une lactoferrina [24].
LytA	Digiere la pared celular liberando así los factores de inducción de la inflamación.

PsaA	Componente del sistema de transporte ABC, implicado en la resistencia al estrés oxidativo.
PiaA and PiuA	Componentes del sistema de transporte ABC, implicado en la resistencia al estrés oxidativo.
NanA and NanB	Ayudan a revelar receptores para la adhesión, la modificación de las superficies de bacterias competidoras que están dentro del mismo nicho y/o modificar la función de las glicoproteínas del hospedero.

Durante estos periodos se despierta una respuesta inmune innata, comenzando con la activación de las tres vías del complemento [26], teniendo una mayor importancia la vía clásica (activada por el polisacárido C) [27], seguida de la vía alterna y finalmente la vía de las lectinas. Algunos factores bacterianos que despiertan la respuesta del complemento son: proteínas de superficie PhpA, PspA, PspC y neumolisina [5, 7, 8]. Algunos PPRs se ha visto que detectan PAMPS de *S. pneumoniae*, como LPS, proteína C reactiva, las cuales ayudan en el aclaramiento de la infección, así como en la respuesta inflamatoria al actuar de forma correcta ante el patógeno. Algunos de los PPRs actualmente más estudiados, son los Toll Like Receptors, en especial TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9.

Parte de la respuesta inmune, viene dado por la unión de las proteínas LBP a los polisacáridos de la cápsula. Es aquí donde las células CD14, actúan como co-receptores para facilitar la respuesta ante los polisacáridos de la cápsula. Las células T CD4+, aparecen durante la infección temprana. La respuesta inmune es compleja e involucra muchas proteínas y es dependiente del lugar de infección [7, 8] (Figura 3). Otro factor importante que favorece la adhesión, colonización e infección de *S. pneumoniae*, es el sinergismo dado por infecciones por otros microorganismos, como *Haemophilus influenzae* y virus de la influenza [28, 5], que facilitan la entrada de *S. pneumoniae*, al exponer los receptores que permiten una mejor adherencia.

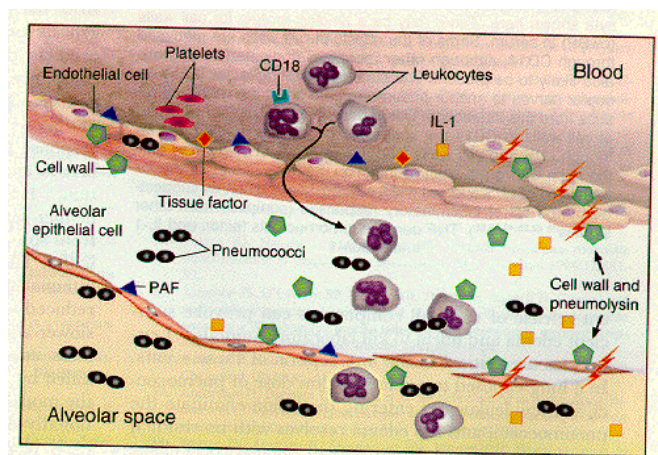


Figura 3. Respuesta inmune a la invasión por *S. pneumoniae* en el pulmón. En la imagen se muestra el mecanismo de acción del *S. pneumoniae* para invadir los pulmones, desde el torrente sanguíneo así como la respuesta inmune (leucocitos y citosinas) desplegada.

Obtención de hierro.

Se sabe que las bacterias cuentan con distintos métodos para la obtención de Fe extracelular, cuentan con proteínas que tienen afinidad por este elemento, por lo que se eligió para trabajar una proteína secretada por *S. pneumoniae* por lo que fue necesario cultivar las bacterias en medio líquido TH para una mayor obtención de la misma.

1.6.- Tratamiento y Resistencia.

1.6.1.- Tratamiento por excelencia.

Consta de la administración de penicilina o eritromicina; aunque con el advenimiento de la aparición de la resistencia a fármacos (penicilina), los tratamientos han tenido que cambiar hasta llegar a utilizar antibióticos de tercera generación como la ceftriaxona y en casos más graves vancomicina [13].

1.6.2.- Resistencia.

A partir de 1967 se han aislado cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina alrededor del mundo. En México en el año 1981, fueron notificadas las primeras cepas resistentes *in vitro*, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de entre 1.25 y 2 µg/ml, las cuales fueron aisladas de niños sanos. Se ha podido evaluar un número representativo de cepas, de niños enfermos hospitalizados observándose el 16% de los aislamientos a partir de líquido pleural y aspirado bronquial tuvieron alta resistencia (MIC mayor a 2 µg/ml de penicilina) y un 20% resistencia intermedia [57]. Para el año 2012 la Organización Panamericana de la Salud, por medio de su programa SIREVA II, reportó en México una alta resistencia a penicilina y otros

antibióticos, de las cepas de *S. pneumoniae* para enfermedades no meningéas (Tablas 4 y 5):

Tabla 4: Resistencia de *S. pneumoniae* en enfermedades no meningéas en el año 2012.

Antibiótico	No. de muestras donde se aisló <i>S. pneumoniae</i> .	Sensibles (<2.0 µg/ml)	Intermedias (4.0µg/ml)	Resistentes (>8.0 µg/ml)
Penicilina Sensible ≤ 2,0 µg/ml. Intermedia = 4,0 µg/ml. Resistente ≥ 8 µg/ml.	188	118	32	38
Ceftriaxona Sensible ≤ 1,0 µg/ml. Intermedia = 2,0 µg/ml. Resistente ≥ 4 µg/ml.	188	113	44	31
Eritromicina	219	125	4	90
Cloranfenicol	219	184	-	35
Trimetoprim-Sulfametoxazol	219	29	38	152
Vancomicina	219	219		

Tomado de: Informe Regional de SIREVA II, 2012

Tabla 5: Resistencia de *S. pneumoniae* en enfermedades meningéas en el año 2012.

Antibiótico	No. de muestras donde se aisló <i>S. pneumoniae</i> .	Sensibles	Intermedio	Resistentes
Penicilina Sensible ≤ 0,06 µg/ml. Resistente ≥ 0,12 µg/ml.	31	15	-	16
Ceftriaxona Sensible ≤ 0,5 µg/ml. Intermedia = 1,0 µg/ml. Resistente ≥ 2 µg/ml.	31	19	2	10

Tomado de: Informe Regional de SIREVA II, 2012

La resistencia se ha incrementado por varios factores, siendo el principal el uso indiscriminado de antibióticos, especialmente cefalosporinas de tercera generación.

Los cambios más asociados a esta resistencia creciente en *S. pneumoniae*, se dan en proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), en especial la proteína PBP 2b. La resistencia incrementada a cefalosporinas, involucra PBP 1a y PBP 2X [4]. Otro mecanismo es la metilación del sitio diana en el ribosoma (genes *erm*(B) y *mef*(A)) y mutaciones espontáneas en genes *gyrA* y *parC* que codifican la proteínas girasas que no son afines a los antibióticos, figura 4. La resistencia se ha extendido a otros antibióticos como cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima e imipenem [14].

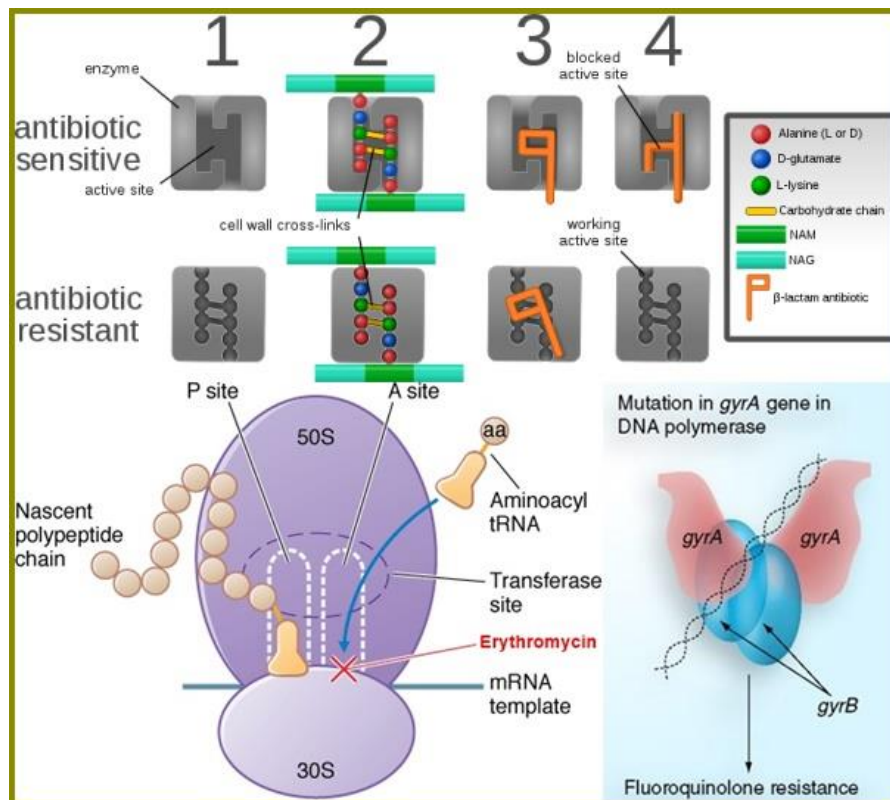


Figura 4. Esquemas de los distintos tipos de resistencia de *S. pneumoniae*. A) Comparación del mecanismo de resistencia a la penicilina con un mecanismo que no presenta dicha resistencia. B) Se muestra el sitio activo de la eritromicina en la subunidad 50S del ribosoma que cuanto está metilada impide la unión de dicho fármaco. C) Resistencia a las fluoroquinolonas la cual se da en la síntesis de grasas diferentes, lo cual hace al antibiótico menos afín.

II.- ESTADO DEL ARTE.

2.- Nanotecnología.

En vista del incremento de la resistencia de las bacterias a los tratamientos actuales, se han buscado nuevas alternativas terapéuticas, una de ellas es el uso de nanotecnología para generar tratamientos alternativos. La nanotecnología se ha aplicado para la conservación de alimentos, productos sanitarios, cosméticos, vendajes para quemaduras, tratamiento de agua y suelos, entre otras.

2.1.- Nanotecnología y su uso terapéutico.

Se define nanotecnología como la elaboración y uso de materiales, aparatos y máquinas en la escala de nanómetros (atómico/molecular), haciendo uso de las propiedades únicas que se producen para las estructuras en las pequeñas dimensiones.

La nanotecnología ofrece materiales (nanopartículas, nanotubos, etc.) que presentan características en una dimensión en el rango nano (1-100 nm) Figura 5.

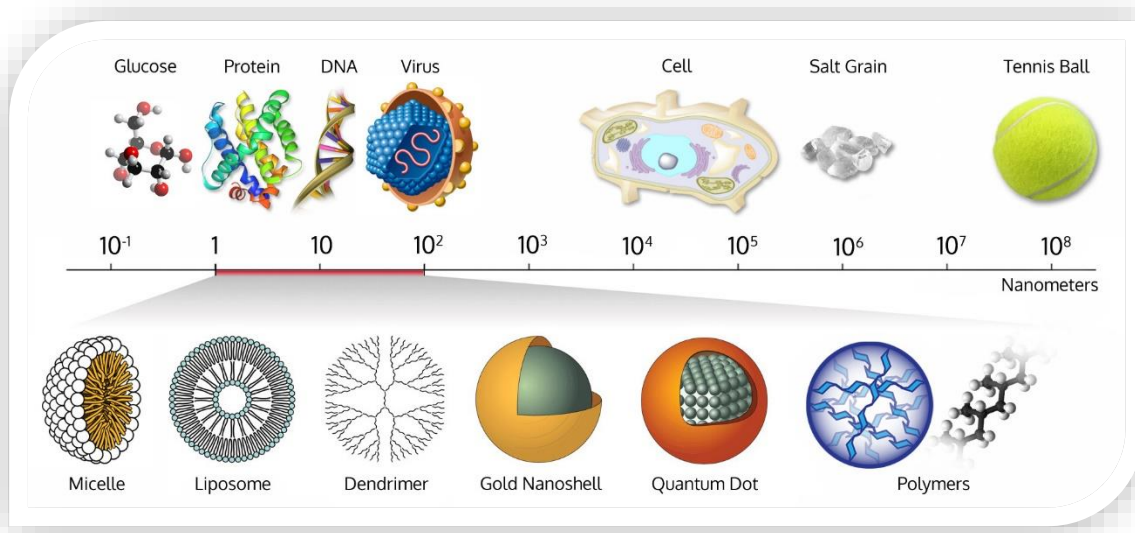


Figura 5. Comparación de tamaños de las nanopartículas. Se muestra la relación de tamaños de los distintos tipos de nanopartículas comparadas con biomoléculas como el DNA, virus, células hasta llegar a una pelota de baseball. Tomado de WichLab, Dr. Peter R. Wich.

La nanotecnología está muy íntimamente relacionada con algunas ciencias, entre las que se encuentran la química, física, informática, medicina, etc. Los nanomateriales más usados en aplicaciones biomédicas son las nanopartículas (NPs), para la administración sostenida de medicación con antibióticos. Las

nanopartículas se pueden presentar en diferentes formas: esferas, plaquetas, nanovarillas, discos hexagonales en forma de P o U, nanoflores y nanobares [33, 34, 35].

Las nanopartículas poliméricas sólidas (NPs) son partículas de menos de 1 μm de diámetro que se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. La síntesis de nanopartículas a base de metales de óxido de plata, oro, cobre, óxido de zinc y magnetita, se han aplicado también en la medicina, odontología, farmacia (antibacterianos, Tabla 6) y biología [36]. Como antibacterianos, las más aplicadas son las de oro y plata, pero suelen ser tóxicas, por lo que la nanomedicina está en la búsqueda de nuevos materiales, que no sean nocivos o sean menos nocivos, para el humano, de los cuales algunos ya se utilizan; usando como ejemplo el hierro se ha descrito nula toxicidad para algunas bacterias dada por nanopartículas de Fe [23] y deseamos mejorarlas para tener una actividad más específica [36, 37].

Las ventajas del uso de nanopartículas para la administración de fármacos están dadas principalmente por su tamaño, que les permite atravesar a los sitios de inflamación del endotelio, el epitelio, tumores o microcapilares. Son más adecuadas para la administración intravenosa, su diámetro es mucho menor que el de los capilares lo que evita la formación de agregados, émbolos o trombos [52].

Actualmente el problema con el uso de nanopartículas como tratamiento (Ag y Au) para infecciones bacterianas, es el hecho de que se matarían a todas las bacterias en general (patógenas y no patógenas). Se ha demostrado que las nanopartículas de oro y plata son bactericidas *per se* para las cepas control de *E. coli* y *S. aureus* por lo que se está intentando hacer que las nanopartículas sean nanodirigidas con aptámeros y funcionalizadas con antibióticos, así como biodegradables y/o expulsables del humano sin causar daño colateral [20].

Para esta labor se ha sugerido el uso de nanopartículas menos tóxicas como las de óxido de hierro (Fe_3O_4), que al incluirle un aptámero de la bacteria a erradicar es posible dirigirla específicamente, aunado a esto, se están buscando nuevas posibilidades para mejorar la unión a la bacteria, incluyendo cubiertas como el polietilén-glicol (PEG) o Triton X100 que permiten una mayor adsorción de fármacos que puedan ser dirigidos a un blanco específico y que favorecen la fusión de la nanopartícula con las paredes celulares de las bacterias pero que permiten reducir la citotoxicidad de las mismas [21, 22]. Se ha observado que las nanopartículas de Fe_3O_4 cubiertas con Tween 80 y PEG pueden atravesar muy bien la barrera hematoencefálica [53] y ninguna de ellas afectan a la cascada de coagulación al administrarse por vía intravenosa [48]. Estas cubiertas prolongan la circulación de nanopartículas *in vivo*, ya que son polímeros o surfactantes hidrofílicos, o

copolímeros biodegradables con características hidrofílicas [51]; además, dichas cubiertas permiten a las nanopartículas ser estables en buffers fisiológicos [58].

Otro punto importante a considerar es el tamaño de la nanopartícula, pues si esta es muy grande puede despertar el sistema inmune y ser eliminada del cuerpo sin llevar a cabo su función, otra razón para esto es debido a que *S. pneumoniae* causa meningitis, siendo una infección que traspasa la barrera hematoencefálica solo las nanopartículas de un tamaño adecuado lo harán [13, 16, 21].

La liberación de fármacos puede verse afectada por el tamaño de las partículas y moléculas, las nanopartículas pequeñas tienen una mayor relación área superficial-volumen, favoreciendo una mayor asociación del fármaco con las moléculas del órgano diana (al estar más expuesto) y una liberación más rápida del fármaco. Las partículas de mayor tamaño tienen grandes núcleos, lo que permite una mayor cantidad de fármaco encapsulado por las partículas y hacen que la liberación sea más lenta [54].

Al llevar un fármaco a la escala nano aumenta su velocidad de disolución, lo cual permitiría, con una velocidad de aclaramiento baja, en la que se alcance el límite de saturación más rápidamente, llevando esto a una mejor biodisponibilidad, una rápida instalación del efecto terapéutico en la administración oral y a la disminución de la variabilidad en la respuesta obtenida entre los estados de ayuno y no-ayuno [51, 54].

Tabla 6. Probables funciones bactericidas de diferentes nanopartículas.

Material de nanopartícula	Probable mecanismo de acción
Plata	- Se observó que en <i>S. aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> las nanopartículas penetran en la pared celular bacteriana y forman conglomerados en la pared celular [38]. Así mismo se presenta la oxidación parcial de plata la cual se libera lentamente interactuando con la membrana bacteriana [39]. En las mismas bacterias se induce la disfunción mitocondrial, aberraciones cromosómicas e interrupción de la replicación del ADN bacteriano [40]; se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen a la peroxidación de lípidos de membrana [41].
Hidróxido de magnesio	- Estas nanopartículas penetran directamente en la pared celular conduciendo a daños en la membrana lo cual se debe a la adsorción de agua en la superficie de las nanopartículas formando una delgada capa de agua alrededor de las nanopartículas de pH alto que en contacto con las bacterias dañan la membrana debido a la alta concentración de iones de hidróxido y lo cual conduce a la muerte celular en las bacterias <i>E. coli</i> y <i>Burkholderia phytofirmans</i> [42].
Oro	- En <i>E. coli</i> se logra colapsar las actividades potenciales de membrana, inhibiendo la ATPasa para disminuir el nivel de ATP e inhiben la subunidad de unión a ribosoma del ARNt [43].

2.1.2.- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄).

Existen distintos métodos para la síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro, entre las cuales las más comunes son: la co-precipitación, la descomposición térmica y la microemulsión:

- El método más convencional la co-precipitación: este método consiste en la mezcla de iones férricos y ferrosos en una relación molar 1: 2 en soluciones altamente básicas a temperatura ambiente o a temperatura elevada. El tamaño y forma de las nanopartículas depende del tipo de sal utilizado (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la relación de los iones férricos y ferrosos, la temperatura de reacción, el valor de pH, la velocidad de agitación.
- Descomposición térmica: la descomposición comienza en una fase orgánica y la descomposición de Fe (cup)₃ (cup= N-nitrosufenilhidroxilamina), Fe(acac)₃ (acac = acetilacetato), o Fe(CO)₅ seguido por una oxidación conducen a la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro monodispersadas de alta calidad, este método por lo general requiere altas temperaturas, tiene un rango de tamaños muy homogéneo y las nanopartículas resultantes sólo son dispersables en solventes polares.
- Microemulsión: Como en los sistemas binarios (agua / tensioactivo o de aceite / tensioactivo), se forman estructuras autoensambladas de diferentes tipos, por ejemplo, micelas esféricas y cilíndricas a fases laminares y microemulsiones bicontinuas, que pueden coexistir con predominantemente aceite o fases acuosas. El sistema con mejores resultados en agua en aceite (ácido oleico), las cuales muestran una estrecha distribución de tamaños y requieren de tensioactivos para su estabilización, sin embargo, para evitar la agregación de las nanopartículas producidas necesita varios procesos de lavado y otros tratamientos de estabilización.

Con lo anterior se pudo decidir en el método a utilizar para la síntesis de las nanopartículas a utilizar en el proyecto, las cuales se sintetizaron por co-precipitación química.

Las nanopartículas de óxido de hierro independientemente de su tipo de síntesis son ampliamente en la actualidad en la nanomedicina, figura 6.

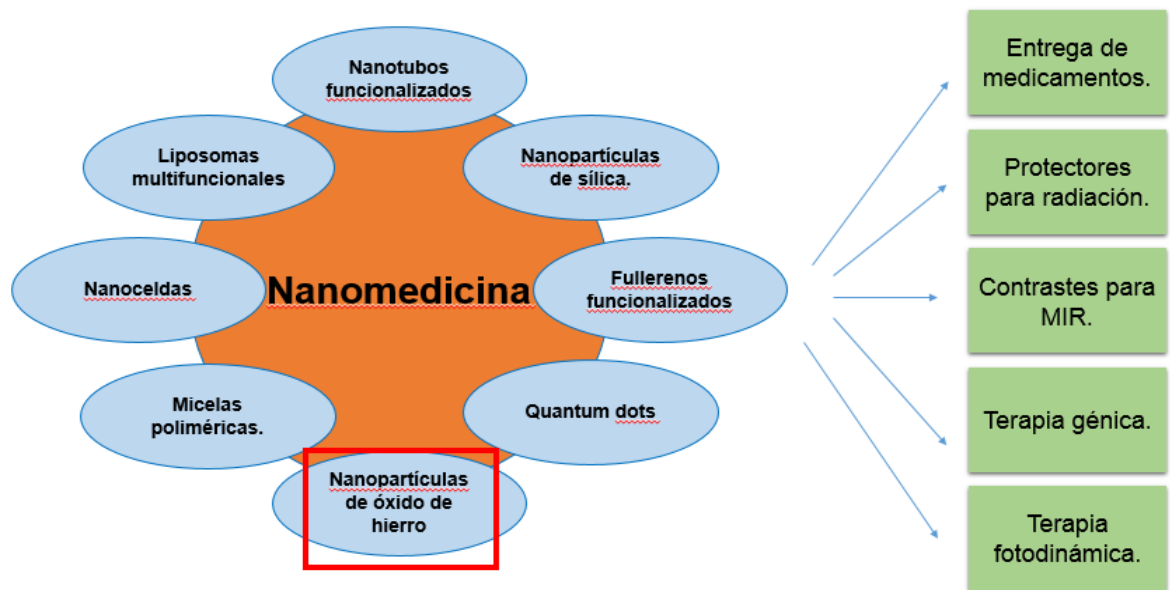


Figura 6. Uso de nanomateriales en la nanomedicina. Se muestran los distintos tipos de nanopartículas que actualmente son usadas en la nanomedicina, resaltado en rojo las nanopartículas de óxido de hierro. Tomada de Biomedical MRI Nanomedicine agents applications fullerenes functionalized nanoparticles p rotection radiation.

III- ANTECEDENTES PARTICULARES.

Varias son las perspectivas del uso de las nanotecnologías para generar fármacos. Se perfilan muy prometedoramente en el tratamiento de enfermedades, ya que permiten proteger el agente terapéutico y permite su liberación controlada, haciendo la entrega de fármacos eficiente a los sitios específicos. Los avances en la administración de fármacos han facilitado la elección de tejidos específicos y las nanotecnologías están convirtiendo esto en organelo específico dentro de células individuales [51].

Se tienen planteados distintos objetivos para el uso en la medicina de las nanopartículas, las principales son:

- Empleo como soportes o plantillas mediante la funcionalización o encapsulación de fármacos para su posterior entrega en las células blanco. Con el empleo de las nanoformulaciones, un gran número de fármacos podrán mejorar su función terapéutica, aunque ya se pueden citar ejemplos como el Doxil, el Abraxane, el Endorem entre otros, que ya se encuentran en el mercado o han logrado pasar a fases superiores en su estudio [51].
- Fármacos para la detección de enfermedades con nanopartículas, para esto se requiere de la unión de nanopartículas a proteínas, esta unión se da por cuatro mecanismos: adsorción electrostática, unión del ligando a la superficie de la nanopartícula, conjugación usando afinidad específica de la proteína por un cofactor y mediante una reacción directa con átomos de la superficie de la nanopartícula. La conjugación de proteínas específicas con nanopartículas es un gran avance en la biología molecular y celular presentando una mejora en la entrega de genes *in vivo*, el diagnóstico clínico, médico dirigido a los receptores blanco. El mecanismo principalmente utilizado es la bioconjugación por unión covalente [56].
- Las nanopartículas unidas a proteínas y fármacos: son un mecanismo que al administrarse no produce dolor (Vía intravenosa) y no se degrada en el tracto intestinal (Vía oral) como la hacen la mayoría de proteínas y polipeptidos, representando una buena alternativa para la salud [56].

Son muchos los intentos por hacer las nanopartículas específicas usando distintos tipos de aptámeros. En 2012 *Farokhzad et al.* presentan el uso de Bind-014 en pacientes con cáncer. Bind-014 es una nanopartícula optimizada con un anticuerpo específico de las células cancerígenas para la entrega del fármaco docetaxel de una manera controlada, llevando a administrar una dosis mayor de fármaco y más sostenida del mismo directamente en los tumores, logrando que la entrega de dicho medicamento sea hasta 10 veces más eficiente que la entrega normal, mucha más

especificidad reduciendo la toxicidad del fármaco fuera del tumor y aumentando su eficacia.

Numerosas investigaciones han demostrado que nanopartículas transportadoras pueden mejorar la estabilidad de agentes terapéuticos, contra la degradación enzimática, logrando resultados y llegando directamente a los objetivos (tejidos o células específicos); sin embargo, aún con el avance que hasta ahora se tiene, no se ha podido generar una tecnología completamente eficiente.

IV.- IMPORTANCIA.

S. pneumoniae causa una gama de infecciones, principalmente en la población infantil menor a cinco años y adultos mayores a 65. En México se aísla en aproximadamente el 50% de las neumonías bacterianas, con la observación de que poco a poco *S. pneumoniae* ha ido aumentando en la incidencia y mortalidad a nivel mundial (neumonía y meningitis) [14]; en conjunto con su resistencia creciente a una gama variable de antibióticos, consideramos que es necesario seguir el estudio de este microorganismo, que actualmente se considera una pandemia, para poder hacer una aportación científica que permita ayudar en la búsqueda de una nueva alternativa terapéutica.

V.- OBJETIVOS.

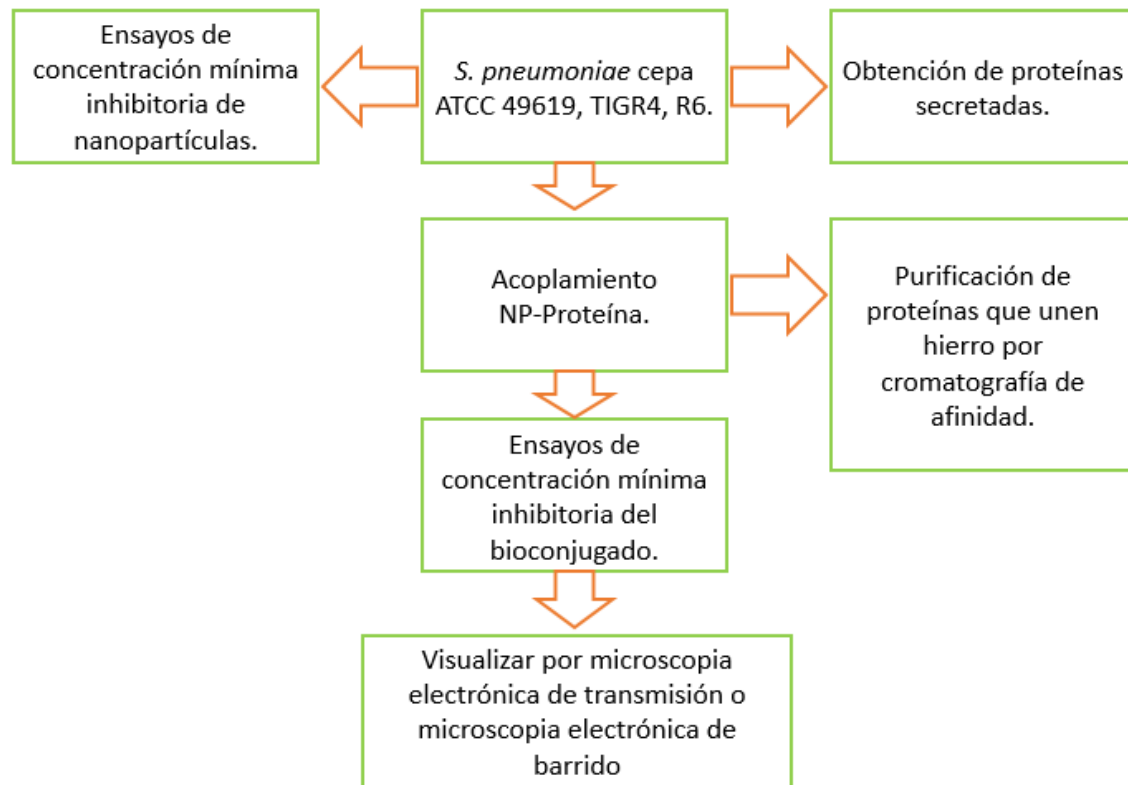
5.1.- Objetivo General.

Generar el acoplamiento de una proteína, secretada por *S. pneumoniae* para la unión de hierro extracelular, a una nanopartícula de Fe (desnuda y/o recubierta con PEG), resultando un bioconjugado proteína-nanopartícula.

5.2.- Objetivos Particulares.

- Evaluar la susceptibilidad del *Streptococcus pneumoniae* a las nanopartículas de hierro.
- Purificar proteínas secretadas por *Streptococcus pneumoniae* con afinidad al grupo hemo.
- Acoplar una de las proteínas secretadas por *Streptococcus pneumoniae* a una nanopartícula de hierro, creando un conjugado nanopartícula-proteína.
- Evaluar la susceptibilidad del *Streptococcus pneumoniae* al bioconjugado.
- Observar la interacción del bioconjugado sobre la estructura bacteriana de *Streptococcus pneumoniae*.

VI.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



VII.- METODOLOGÍA.

7.1.- Cultivo bacteriano de *S. pneumoniae*.

Las cepas elegidas para los experimentos fueron *S. pneumoniae* R6 (carece de cápsula), *S. pneumoniae* TIGR4 (cápsulada) y como control *S. pneumoniae* ATCC 49619.

7.1.1.- Cultivo de *S. pneumoniae* en medio sólido.

El cultivo de *S. pneumoniae* se realizó en agar sangre de carnero al 5% esterilizado, con un estriado masivo e incubado a 37°C durante 18 horas, en una atmósfera regulada al 10% de CO₂ (SANYO, CO₂-Incubator).

7.1.2.- Cultivo de *S. pneumoniae* en medio líquido.

Después del crecimiento de *S. pneumoniae* en un medio sólido, las bacterias son recuperadas del medio y sembradas en un medio líquido Todd Hewitt enriquecido con extracto de levadura al 0.5% estéril. El medio inoculado se incubó a 37°C durante 18 horas en una atmósfera regulada al 10% de CO₂.

7.1.3.- Conservación bacteriana de *S. pneumoniae* en el laboratorio.

Las bacterias se conservaron para tener una biomasa almacenada para su uso posterior en los diferentes experimentos. Para esto, las bacterias se cosecharon del medio sólido y se colocaron en criotubos Eppendorf estériles de 1.5 ml, al cual se le agregaron 0.750 µl de caldo Todd Hewitt estéril y 0.250 µl de glicerol estéril al 30% y se mantienen en congelación a -80°C.

7.2.- Pruebas de identificación bioquímica de *S. pneumoniae*.

7.2.1.- Tinción Gram.

Se colocó una gota de solución salina inyectable en un portaobjetos, se tomó una asada, tomada de un cultivo en medio sólido, la cual se dispersó en 200 µl de solución salina y se deja secar. Se fijó 3 veces en el mechero, se colocó 1 ml de cristal violeta, suficiente para cubrir la muestra, durante un minuto, se lavó con agua destilada; se agregó 1ml de lugol durante un minuto y se lavó con agua destilada; seguido de 1 ml de alcohol:acetona (1:1) por 10 segundos y se retiró el exceso con agua destilada; finalmente se agregó 1 ml de safranina durante un minuto y se lavó con agua destilada. Se dejó secar a temperatura ambiente. Las preparaciones fueron observadas en el microscopio a 10X y colocando una gota de aceite de inmersión a 100X.

7.2.2- Determinación de la actividad de la catalasa.

Se colocaron 200 µl de peróxido de hidrógeno en un porta objetos, se tomó la muestra de las cepas de *S. pneumoniae* y el control positivo *S. aureus*, de un cultivo en agar sólido, con un palillo de madera y se agregó al peróxido, se observó la reacción; la actividad de la catalasa se evidencia con la presencia de un burbujeo al contacto con el peróxido de hidrógeno, el *S. pneumoniae* no presenta el burbujeo por la ausencia de la catalasa.

7.2.3.- Sensibilidad a optoquina de *S. pneumoniae*.

Se hizo un estriado cerrado en una placa de agar sangre, en el cual se colocó un sensidisco con 5 µg optoquina. Se puso a incubar a 37°C en una atmósfera regulada al 10% de CO₂ durante 18 horas, tras este tiempo se observó el crecimiento alrededor del disco; si se trata de un *S. pneumoniae* se observa un área de inhibición de crecimiento llamado halo de inhibición.

7.3.- Curvas de crecimiento de *S. pneumoniae*.

Las curvas estándar de crecimiento en medio líquido se realizaron durante 24 horas, haciendo lecturas de la densidad óptica (DO) cada h., partiendo de una concentración conocida de bacterias (0.5 en la escala de McFarlan, DO: 0.08 - 0.1). Se inocularon 20 ml de medio líquido Todd Hewitt (TH) y se incubaron durante 16 - 18 hrs, transcurrido este tiempo se centrifugaron los tubos a 6000 g por 10 min y se agregó medio líquido TH estéril al botón para resuspenderlo, se adicionó el volumen de medio necesario (aproximadamente 30 ml) para llegar a la DO deseada (0.08 a 0.1 de absorbancia), llegado a este punto se dejaron incubar las bacterias durante 24 horas, haciendo una lectura de la DO a cada hora, tomando 500 µl de muestra que se colocan en la cubeta para hacer la lectura. Finalmente para el análisis de los datos se ocupa el programa GraphPad Prisma 6.

7.4.- Purificación de proteínas de *S. pneumoniae*.

7.4.1.- Obtención y purificación de proteínas secretadas de *S. pneumoniae*.

La muestra (medio de cultivo Todd Hewitt, con bacterias tras 18 hrs de incubación) a tratar se centrifugó a 4°C/3709 g/10 min (Centrífuga Allegra X-22R, Beckman Coulter), el sobrenadante se filtró en unidades de filtración (Millex GS, 0.22µm) para eliminar las bacterias o celular rotas, después, la muestra se colocó en Amicones (Millipore 50ml, 10000 MWCO), se centrifugó a 4°C/5000 g/15 min, hasta tener un volumen de 500µL para concentrar las proteínas secretadas, que se almacenaron en refrigeración a -20°C para su uso posterior.

7.4.2.- Cromatografía de afinidad.

Este es un proceso selectivo en el cual por medio de lavados y un ligando puede ser purificada específicamente una proteína. Este proceso está compuesto de dos fases, sólida y líquida.

- Fase sólida: perlas de agarosa que conforman la base de contacto la cual cuenta con un ligando (grupo hemo) y a este se unirá la proteína específicamente. De la cual se pusieron a interaccionar 0.5 ml de la hemin-Agarosa, Bovine type I de Sigma, que tiene el grupo hemo como ligando y 1 ml de proteínas secretadas previamente obtenidas (Ver 7.4.1) durante 12 horas, posteriormente se centrifugó a 1000 g por 5 min, en el sobrenadante se tienen las proteínas que no presenten ningún tipo de interacción con el grupo hemo.
- Fase líquida: por medio de 4 lavados astringentes con 700 µl de Tris-HCL 50 mM y cloruro de sodio 100 mM (solución de lavado), se eliminan las uniones inespecíficas y del quinto al octavo lavado se hicieron con 200 µl de clorhidrato de guanidina 6M para eluir completamente las proteínas de unión específica, se recuperó la proteína buscada, ya que es la que fue la que demostró tener una mayor afinidad por el ligando.

Teniendo las proteínas eluidas se precipitaron con la solución stock de ácido tricloroacético (TCA, apéndice) en una proporción 1:4, se incubaron a -20°C por 12 horas, transcurrido el tiempo se lavaron 4 veces con 400 µl de acetona fría que se mantiene a -20°C, finalmente las proteínas obtenidas se resuspendieron en 40 µl de Tris-HCL 20 mM, las cuales se conservaron a -20°C. Para visualizar las proteínas se corrieron geles SDS PAGE con las proteínas y las eluciones anteriores para corroborar la elución, finalmente el gel se tiñó con azul de Coomassie (ver 7.6.1.).

7.4.3.- Purificación de la proteína de 38 KDa a partir de geles preparativos de poliacrilamida.

Para obtener una mayor cantidad de la proteína de 38 KDa, las muestras de proteína que se obtuvieron de la cromatografía se corrieron en geles SDS-PAGE al 12% de un solo pozo (Ver 7.5.1) con buffer de corrida 1X, en las mismas condiciones de corrimiento. Cada banda obtenida se cortó lo más delgada posible, se lavó con agua destilada 3 veces, en este paso puede almacenarse a -20°C al retirarle el agua y/o continuar con el procedimiento; se realizan 3 lavados de 5 minutos con 3 ml de buffer de lavado 1 (EDTA 250mM- Tris-HCL 250mM, pH 7.4), se lavó 3 veces con 3 ml de agua destilada durante 5 minutos, se maceró, se le añadió 1 ml de buffer 2 (Tris-HCL 250mM- SDS 1%, pH 7.4) en este buffer finalmente se sonicó durante 12 minutos con pulsos 30/30 a una amplitud de 60%, en baño de hielo. Se centrifugó la muestra 5 min a 1000 g; el sobrenadante se pasó por la columna de intercambio la cual se centrifuga a 1000 g por 1 min, el filtrado contiene la proteína, la cual se

colocó en un amicon para hacer la concentración de la misma en menor volumen. Finalmente la proteína purificada se almacenó a -20°C.

7.4.4.- Preparación de la columna de intercambio.

La columna se centrifugó a 1000 g por 1 min, se le colocan 400 µl del buffer 2 (Tris-HCl 250mM- SDS 1%, pH 7.4), se centrifuga a 1000 g por 1 min, con la finalidad de agregarle la muestra que contiene la proteína para eliminarle las sales.

7.5.- Preparación de geles SDS-PAGE.

7.5.1.- SDS-PAGE al 12%.

Los geles se preparon mezclando los reactivos de la tabla 7 para el primer gel (gel separador), el cual es vertido entre los cristales que sirvieron como soporte. Posteriormente se mezclan los reactivos de la tabla 8 para la segunda fase (gel concentrador), inmediatamente después se colocó el peine con el número de pozos requeridos (1, 10), se esperó a que el gel polimerizara, después el gel se colocó en la cámara de electrofesis, la cual se llena con el buffer de corrida (Tris-HCL 100mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol, DTT 1M, azul de bromofenol, agua) necesario y posteriormente las muestras se cargaron en los pozos.

Tabla 7: volúmenes necesarios para la preparación de la fase separadora en un gel de poliacrilamida de aproximadamente 10 cm x 7.4 cm.

Reactivo	Volúmen (ml)
Agua destilada	1.5
Acrilamida mix 30%	2
Buffer Tris-HCl 1.5M (pH 8.8)	1.3
SDS 10%	.05
Persulfato de amonio 10%	.05
TEMED	.002

Tabla 8: volúmenes necesarios para la preparación de la fase concentradora en un gel de poliacrilamida de aproximadamente 10 cm x 7.4 cm.

Reactivo	Volúmen (ml)
Agua destilada	1.4
Acrilamida mix 30%	.33
Buffer Tris-HCl 1M (pH 6.8)	.25
SDS 10%	.02
Persulfato de amonio 10%	.02
TEMED	.002

Preparación de las muestras:

Las muestras se mezclaron con el buffer de carga 6X (SDS10%, glicerol, Tris-HCL 0.5M pH 6.8, DTT 1M y agua) y después se incubaron en agua hirviendo durante 6 min. Las proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE al 12% y se les aplicaron 100 Volts durante 2 horas; finalmente los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie G-250.

7.6.- Tinción de geles SDS-PAGE.

7.6.1.- Tinción con azul de Coomassie G-250.

El gel obtenido se colocó en un recipiente para poner en contacto por 1 hora con la solución de azul de Coomassie (apéndice), se destiñó con solución destiñidora (apéndice) hasta ver claramente la aparición de las bandas.

7.7.- Acoplamiento de proteínas a nanopartículas de óxido de hierro (NPs).

Para esta metodología se contaba en el laboratorio con una síntesis de nanopartículas de óxido de hierro desnudas, las cuales fueron sintetizadas por el método de co-precipitación química y purgadas con nitrógeno gaseoso. Las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con PEG fueron adquiridas (Iron oxide (II, III), magnetic nanoparticles solution, Sigma Aldrich), las cuales están caracterizadas y cuentan con un tamaño promedio de 20 nm.

Teniendo NPs de hierro y la proteína purificada, se hace el acoplamiento poniendo en contacto la proteína de 38 KDa purificada y las nanopartículas en sonicación constante durante 2.5 hrs en baño de hielo con una amplitud de 60%. Se centrifugó a 1000 g por 5 min a 4°C. El pellet de dicha centrifugación se resuspendió en agua milli Q (H₂Oq) y se le hicieron 3 lavados. Las nanopartículas recubiertas finalmente se resuspendieron en agua milli Q y se almacenaron a 4°C.

7.8.- Cuantificación de proteínas.

La cuantificación proteica se realizó por el método de Bradford usando como estándar una proteína de concentración conocida, ver tabla 9.

Tabla 9: volúmenes y concentraciones necesarias para la preparación de la curva estándar.

Concentración (µg/ml)	Proteína (µl)	Reactivo de Bradford (µl)	Agua (µl)
Blanco	-	125	125
1	12.5	125	112.5
45	12.5	125	112.5
90	12.5	125	112.5
180	12.5	125	112.5
360	12.5	125	112.5
720	12.5	125	112.5
Muestra	12.5	125	112.5

La concentración inicial de la proteína fue 1440 µg/ml excepto para la concentración de 1 µg/ml, la cual partió de la concentración de 45 µg/ml.

La curva y la lectura de las muestras se realizaron en una placa para ELISA de 96 pozos, colocando en cada pozo un volumen final de 200 µl, la cual se agitó y se dejó interaccionar por 10 min, posteriormente se leyó en el espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH) a una longitud de onda de 595 nm.

7.9.- Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Se ensayó la toxicidad de las nanopartículas de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, como las desnudas y las que se acoplaron a la proteína, ante los cultivos bacterianos (*S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* TIGR4 y *S. pneumoniae* ATCC 49619) evaluando la muerte celular por cuenta viable de las unidades formadoras de colonias (UFC). Se colocaron concentraciones desde 128 µg/ml hasta 0.007 µg/ml de las nanopartículas de hierro con PEG, con proteína y desnudas, a una concentración conocida de bacterias (0.5 McFarlan), tras un periodo de incubación de 18 horas, se evaló por cuenta viable si existe una disminución en la concentración bacteriana o en el crecimiento, figura 4.

7.9.1.- Preparación de inóculos para los ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC).

7.9.1.1.- Preparación de la concentración 0.5 de McFarlan.

En 2 ml de medio líquido TH se inocularon asadas de la cepa de *S. pneumoniae* hasta alcanzar la turbidez, midiendo la DO a 600 nm, la cual debe estar entre 0.08 y 0.1.

7.9.1.2.-Preparación del inóculo para el MIC.

Se tomaron 50 µl del inóculo ajustado al 0.5 de McFarlan, 500 µl de sangre de carnero desfibrinada y 4450 µl medio líquido Mueller Hinton (MH).

7.9.2.- Preparación de diluciones.

7.9.2.1.- Preparación de las distintas concentraciones de nanopartículas para los ensayos de MIC.

Partiendo de una solución de nanopartículas (recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína) de 5 mg/ml, se tomaron 51.2 µl de la solución, los cuales se completaron a 1000 µl con agua destilada estéril, de dicha dilución se tomaron 500 µl y se pasaron a 500 µl de MH y se hicieron un total de 15 diluciones seriadas, desde 128 µg/ml hasta 0.007 µg/ml.

7.9.3.- Montaje en placa de ELISA de 96 pozos para los ensayos de MIC.

Se colocaron 100 µl del inóculo (Ver 7.10.) y 100 µl de la dilución correspondiente de NPs desnudas, recubiertas con PEG, recubiertas con proteína y el antibiótico a usar. Se incubaron las placas a 37°C en una atmósfera regulada al 10% de CO₂ por 24 horas.

7.10.- Ensayos de viabilidad de *S. pneumoniae* en presencia de nanopartículas de óxido de hierro.

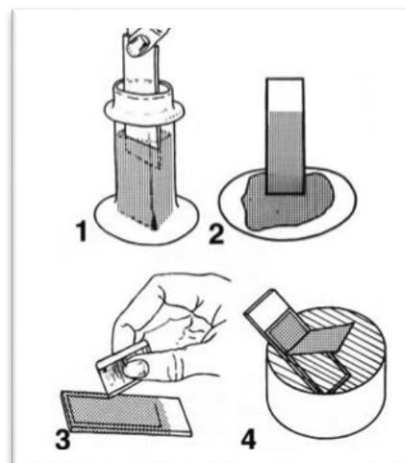
De las placas de ELISA ya incubadas, se tomaron 100 µl de los pozos a evaluar, los cuales se colocaron en 900 µl de TH haciendo diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000...), de cada dilución se tomaron 10 µl que se sembraron con asa codada en medio sólido agar sangre, se incubaron a 37°C con una atmósfera regulada al 10% de CO₂, durante 18 horas.

7.11.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

7.11.1.- Preparación de la rejilla de cobre con una malla nominal de 200 con formvar.

Cada rejilla debe tener un recubrimiento con formvar o polivinilo formal por uno de los dos costados, actuando como soporte en la rejilla. El formvar se preparó en una solución al 0.25% en cloroformo, dicha solución se mantuvo a 4 °C en un envase de cristal cerrado. Se limpiaron los porta objetos de cristal, se sumergieron en la solución de formvar, se sacaron y se dejaron secar a temperatura ambiente; ya que se encontraban secos, se rasparon finamente las 4 orillas del portaobjetos con un bisturí dejando un rectángulo en el mismo. Se sumergió el portaobjetos en un vaso

de agua lentamente quedando así el rectángulo del formvar flotando sobre el agua, (figura 7). Sobre el formvar se colocaron de manera ordenada las rejillas y con un trozo de parafilm se retiró del agua la película de formvar con las rejillas. Finalmente con pinzas finas se despegó la rejilla y se le dió la vuelta para colocar la muestra.



Figuras obtenidas de M.S. Hayat y S. E. Miller (1990) Negative Staining McGraw-Hill Publishing Co. N.Y. p. 253

Figura 7: Pasos a seguir para la preparación de formvar. 1) Inmersión del porta objetos en la solución de formvar. 2) Se debe dejar secar a temperatura ambiente. 3) Se deben raspar las orillas de una de las caras del porta objetos. 4) El porta se sumerge en agua para recuperar el formvar en el agua.

7.11.2.- Preparación de la rejilla de cobre-formvar con muestra.

La muestra se fijó durante 1.30 hrs con la solución fijadora (glutaraldehído al 2.5% y formaldehído al 4% amortiguado en una solución de fosfatos con pH de 7.2-7.4 0.2 M). Se colocaron 10 µl de muestra fijada, se dejó sedimentar durante 30 min. Se retiró el exceso líquido con papel filtro, se contrastó la muestra durante 10 segundos con ácido fosfatungstico, se lavó inmediatamente 3 veces con agua estéril y se le retiró el exceso de líquido con papel filtro.

7.11.3.- Visualización de las muestras en el microscopio electrónico de transmisión.

Las muestras fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión que se encuentra en el laboratorio de microscopia, del área de Patología del Hospital Infantil “Federico Gómez” de la Ciudad de México, bajo la tutela de la Bióloga Alejandra Stephany Rodríguez Leviz.

7. 12.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

7.12.1.- Preparación de muestras.

Se hicieron crecer las bacterias sobre cubre objetos redondos de cristal con una cobertura de Poli-L-Lisina, en placas de cultivo de 24 pozos, se incubaron y posteriormente se les retiró el exceso de muestra, se fijaron, lavaron y deshidrataron. Finalmente las muestras se polvean con oro y se observan en el microscopio electrónico de barrido.

VIII.- RESULTADOS.

8.1.- Determinación de la susceptibilidad del *Streptococcus pneumoniae* a las nanopartículas de hierro.

Las cepas a trabajar fueron donadas por el Hospital Infantil de la Ciudad de México “Federico Gómez”, por lo que para saber si las cepas puras obtenidas eran de *S. pneumoniae* lo primero que se hizo fue la identificación de las cepas por las siguientes pruebas bioquímicas:

Tinción Gram: observamos cocos morado azulados, esféricos, individuales, en pares (diplococos) o cadenas cortas en las tres cepas, como se aprecia en la figura 8.

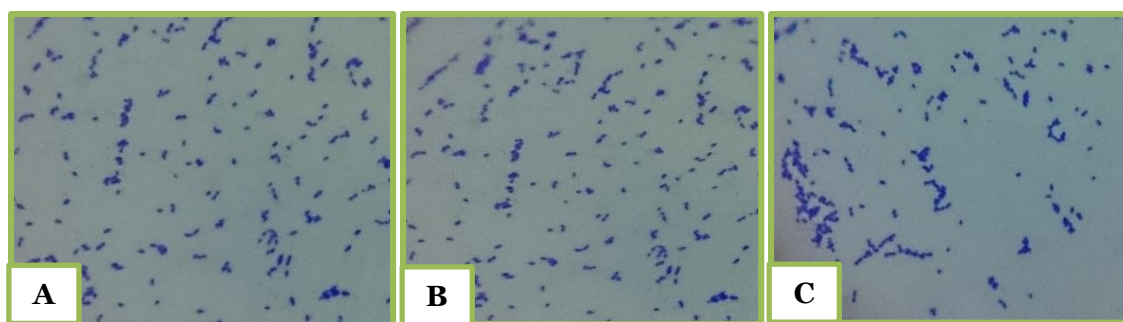


Figura 8: Tinción Gram de tres cepas de *S. pneumoniae*. Se observan cocos gram positivos (morados- azules), acomodados en pares o cadenas cortas en las cepas A) R6, B) TIGR4 y C) ATCC 49619.

Determinación de la sensibilidad a optoquina: para esta determinación, se realizó en una placa de agar sangre a la que se inoculó con las cepas a trabajar, a la se le colocó un sensidisco impregnado con 5 μ g de optoquina, la cual se incubó por 18 horas y se midió el halo de inhibición en las tres cepas, figura 9.



Figura 9: Determinación de la sensibilidad a optoquina en *S. pneumoniae*. Se observó un halo de inhibición debido a la sensibilidad de las cepas a la optoquina; A) *S.pneumoniae* ATCC 49619, B) *S. pneumoniae* TIGR4.

La determinación de la actividad de la catalasa nos permitió diferenciar entre nuestro *S. pneumoniae* y un *S. aureus*, que pudiésemos tener como contaminante en las muestras, figura 10.



Figura 10: Comparación de la reacción de catalasa. A) Se muestra la reacción, en forma de burbujeo, frente al peróxido de hidrógeno que produce el *S. aureus*. B) Se muestra la reacción negativa al peróxido de hidrógeno por la falta de la catalasa en *S. pneumoniae*.

Con las pruebas de identificación finalizadas obtuvimos la certeza de que las cepas que teníamos para trabajar se encuentran purificadas y pertenecen a las cepas de *S. pneumoniae* de interés, resultando en cultivos con crecimientos puros, ausencia de actividad de la catalasa, morfología correspondiente a la descrita para nuestros microorganismos y sensibilidad a la optoquina positiva.

8.1.2.- Elección de nanopartículas.

De igual forma para trabajar con las nanopartículas era necesario caracterizar en tamaño y forma de las nanopartículas con las cuales se trabajó, las que no estaban recubiertas y las que si contaban con dicha cubierta, figura 11.

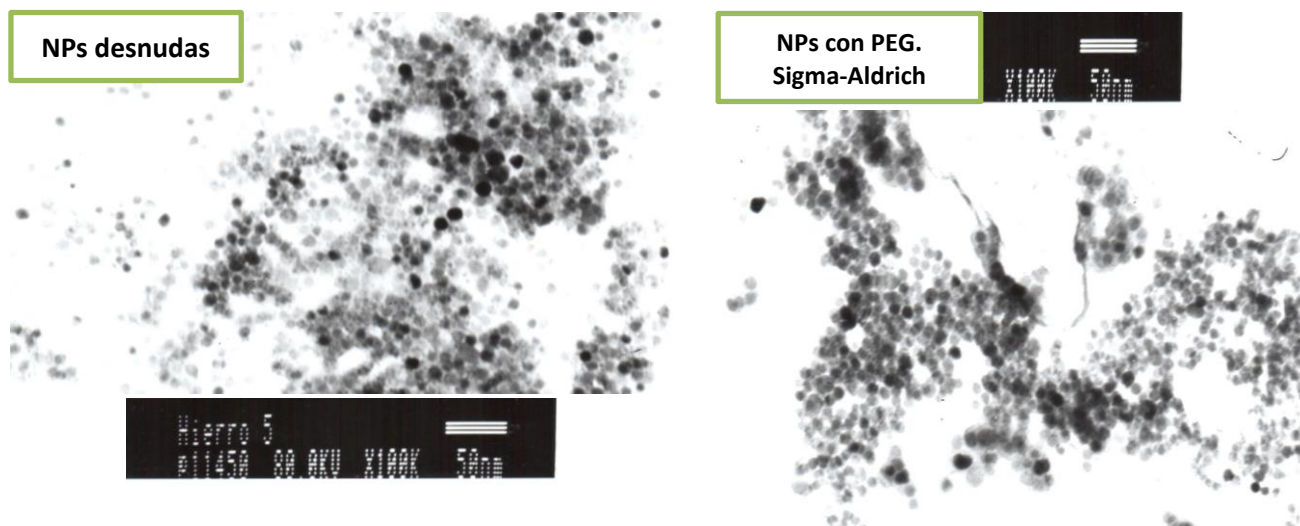


Figura 11: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las nanopartículas de óxido de hierro. A) Imagen de las nanopartículas de óxido de hierro desnudas con un

promedio en tamaño de 20 nm. B) Nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con PEG (adquiridas, Sigma), con tamaño promedio de 20 nm.

Con el análisis de las imágenes supimos que las nanopartículas tienen un tamaño promedio de entre 20 ± 2 nm y corroboramos que las nanopartículas que fueron compradas, las cuales ya tienen el recubrimiento de PEG, son en promedio de 20 ± 2 nm.

8.1.3.- Crecimiento bacteriano de *S. pneumoniae* en medio líquido.

Para conocer el comportamiento del crecimiento bacteriano, se realizó una curva de crecimiento en medio líquido para las tres cepas de *S. pneumoniae* a trabajar (figura 12), haciendo el seguimiento del crecimiento celular, midiendo la densidad óptica (DO) durante 24 horas, con una lectura cada hora.

En el gráfico se pueden observar las fases clásicas del crecimiento bacteriano en las tres cepas del *S. pneumoniae*; en las primeras tres hrs la fase lag, de la h 4 a la 8 la fase de crecimiento exponencial, en las hrs 9 a 18 la fase estacionaria y de la 19 a la 20 la fase de decaimiento o muerte celular. Así mismo se observa un crecimiento menor a través del tiempo, de la cepa TIGR4, en comparación con las cepas ATCC49619 y la cepa R6.

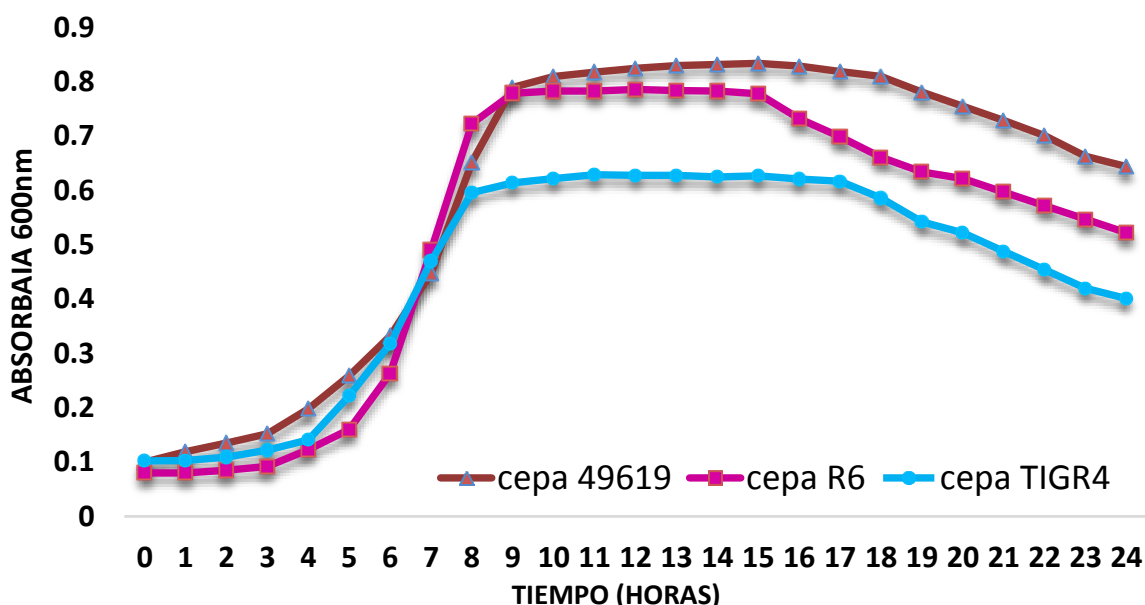


Figura 12. Curva de crecimiento normal de tres cepas de *S. pneumoniae*. La curva se realizó en medio líquido TH durante 24 horas, midiendo la D.O. cada hora. Se observa el crecimiento típico del *S. pneumoniae*, las 4 fases: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y la fase de decaimiento, así como una variación en cuanto al crecimiento de la cepa TIGR4 en comparación con las otras dos.

8.1.4.- Ensayos de concentración mínima inhibitoria.

Para conocer la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las nanopartículas de hierro se realizaron ensayos MIC (Figuras 13, 14 y 15) a las tres cepas, para las nanopartículas tanto desnudas como recubiertas con PEG. Lo cual se hizo colocando concentraciones conocidas de bacterias con el tratamiento de las nanopartículas, se dejó incubar por 24 hrs y finalmente se observó la existencia o no de dicha concentración.

La cepa de referencia está marcada por la CLSI, cepa ATCC 49619, la cual se empleó para validar los ensayos. Dicha cepa tiene un valor de corte (concentración a la cual inhibe el antibiótico), para la eritromicina que va de 0.03 a 0.125 µg/ml.

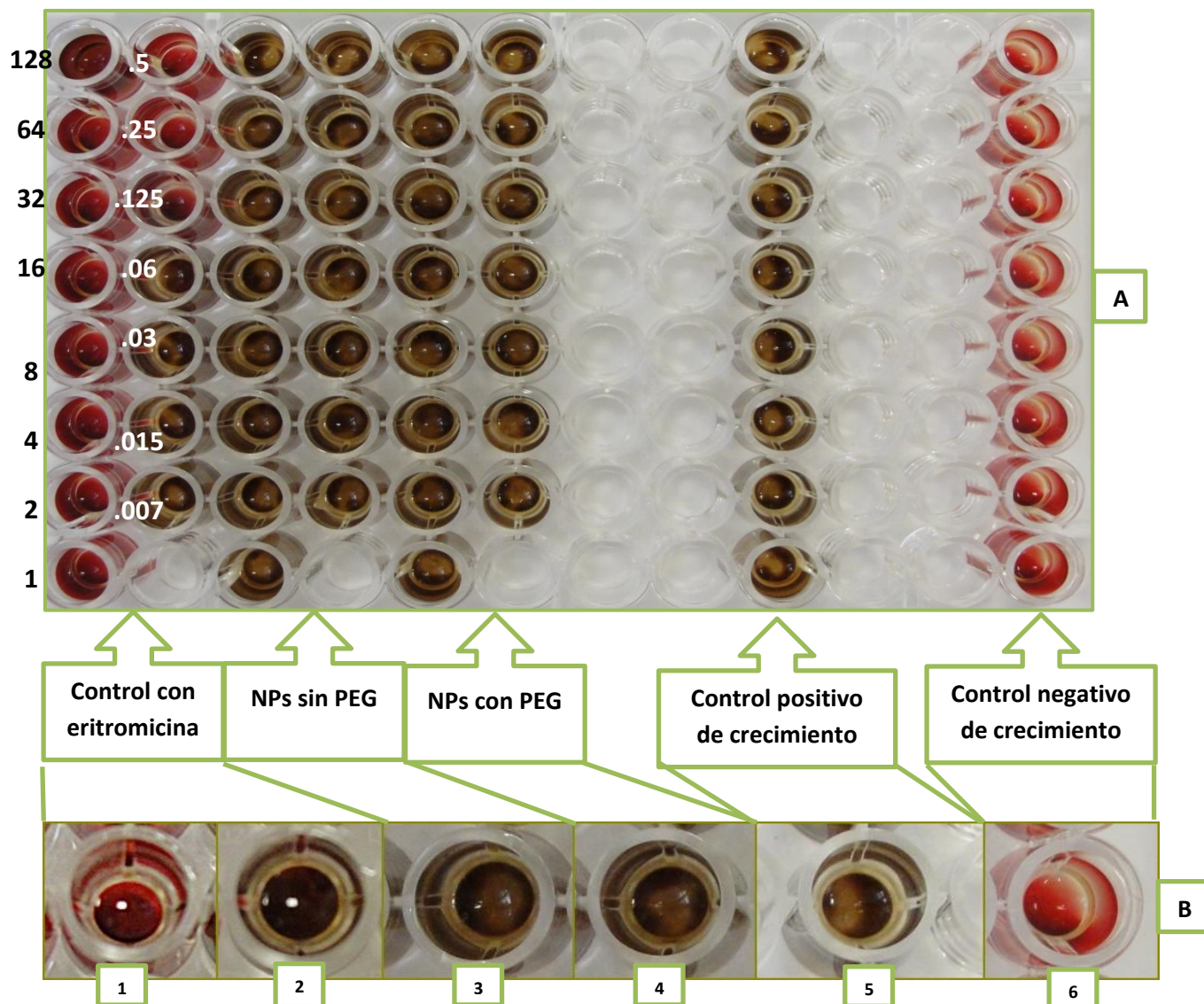


Figura 13: MIC de la cepa ATCC 49619 para evaluar la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG como las que están desnudas, a concentraciones que van desde 128 a 0.007 $\mu\text{g/ml}$. A) Placa de ELISA en que se realizó el MIC para la cepa ATCC 49619. B) Acercamientos a algunos pozos representativos, 1-2) pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y 0.06 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina respectivamente, ambos entran en el punto de corte del antibiótico. 3-4) Pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de NPs desnudas y recubiertas con PEG respectivamente. 5-6) Pozos de los controles: crecimiento normal del *S. pneumoniae* ATCC 49619 y el control del medio estéril respectivamente. Con lo que podemos saber que *S. pneumoniae* no es susceptible a las NPs de óxido de hierro hasta 128 $\mu\text{g/ml}$.

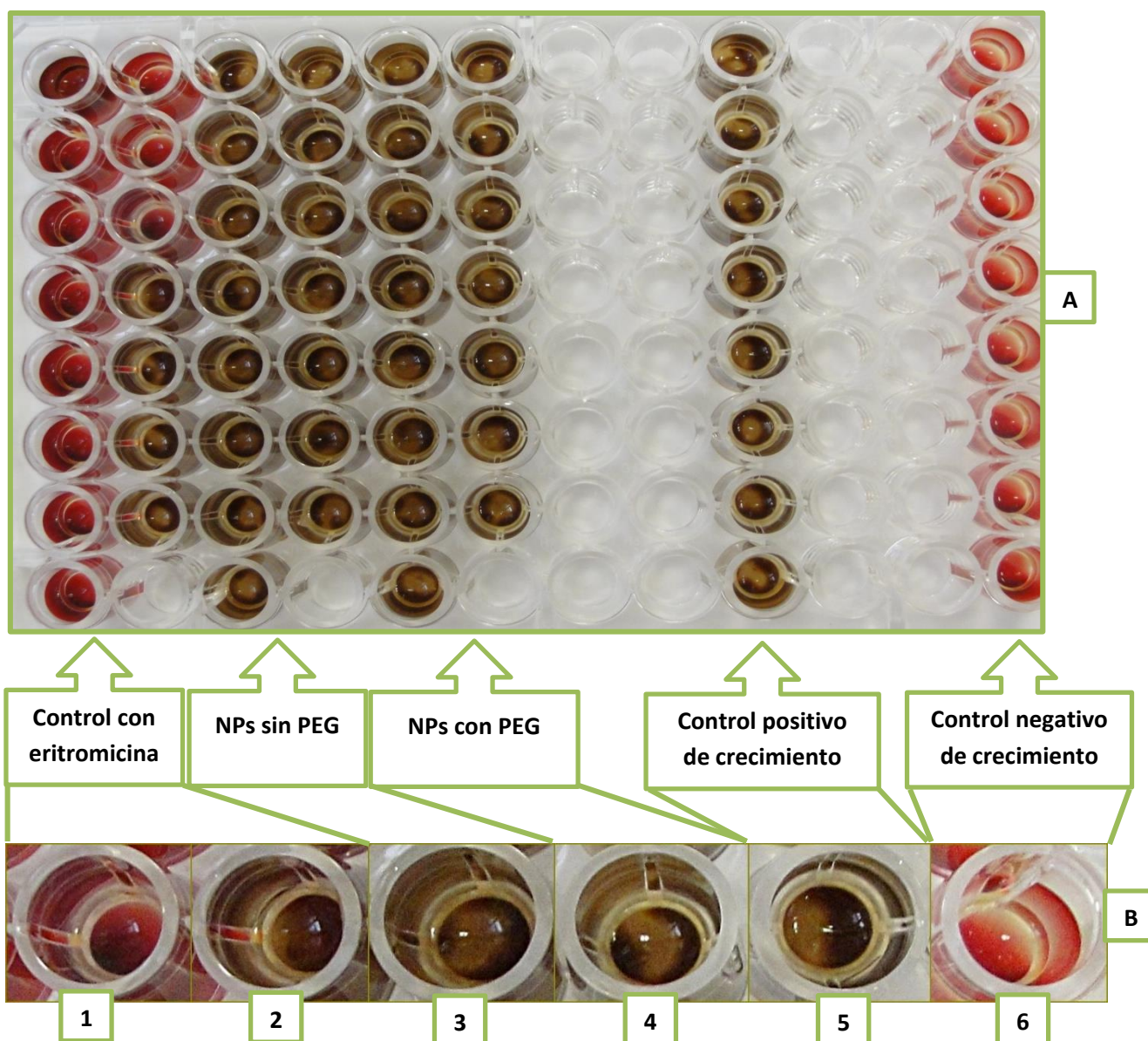


Figura 15: MIC de la cepa R6 para evaluar la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG como las que están desnudas, a concentraciones que van desde 128 a 0.007 $\mu\text{g/ml}$. A) Placa de ELISA en que se realizó el MIC para la cepa ATCC 49619. B) Acercamientos a algunos pozos representativos, 1-2: pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y 0.06 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina respectivamente, ambos entran en el punto de corte del antibiótico. 3-4: pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de NPs desnudas y recubiertas con PEG respectivamente. 5-6) pozos de los controles: crecimiento normal del *S. pneumoniae* R6 y el control del medio estéril respectivamente. Con lo que podemos saber que *S. pneumoniae* R6 no es susceptible a las NPs de óxido de hierro hasta 128 $\mu\text{g/ml}$.

Con los ensayos anteriores se observó que en ninguna de las tres cepas existe una concentración mínima inhibitoria con las nanopartículas de hierro de 20 nm

desnudas o cubiertas hasta 128 µg/ml, siendo que para el antibiótico las tres tienen puntos de corte de entre 0.03 a 0.125 µg/ml.

8.1.5.- Ensayos de viabilidad.

Los ensayos de viabilidad se realizaron para corroborar si existe o no la inhibición del crecimiento de *S. pneumoniae* con el tratamiento de nanopartículas de óxido de hierro de 20 nm desnudas y recubiertas con PEG ya que, el MIC sólo nos indica visualmente si hay o no crecimiento, pero no se contabiliza y la cuenta viable nos permite observar numéricamente si existe una disminución o aumento del crecimiento con respecto al crecimiento normal. Después de las diluciones seriadas correspondientes (1:10, 1:100, 1:1000...), se sembró e incubó. Se eligió la dilución en la cual se contaron entre 30-300 UFC (Figuras 16, 17 y 18). Las concentraciones elegidas fueron las correspondiente a la más alta (128 µg/ml) utilizada, las del punto de corte del antibiótico (0.03, 0.06 y 0.125 µg/ml) y la concentración más pequeña 0.007 µg/ml de NPs.

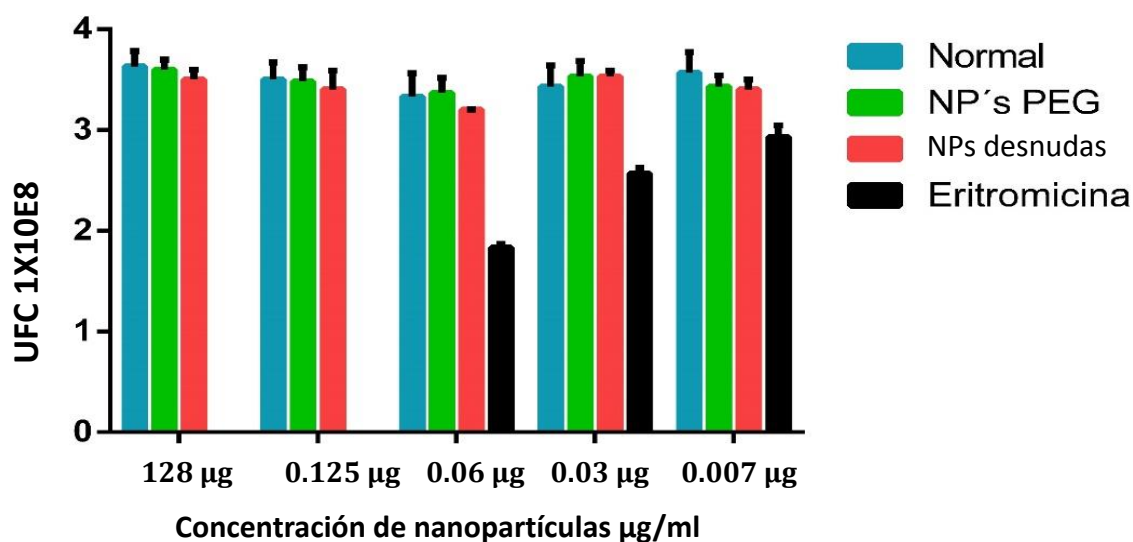


Figura 16: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* ATCC 49619. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* ATCC 49619 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en rosa con el tratamiento de NPs desnudas, en verde con el tratamiento de NPs recubiertas con PEG y en azul el crecimiento normal. No se observa ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa ATCC 49619 tratadas tanto con nanopartículas desnudas como recubiertas con PEG comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

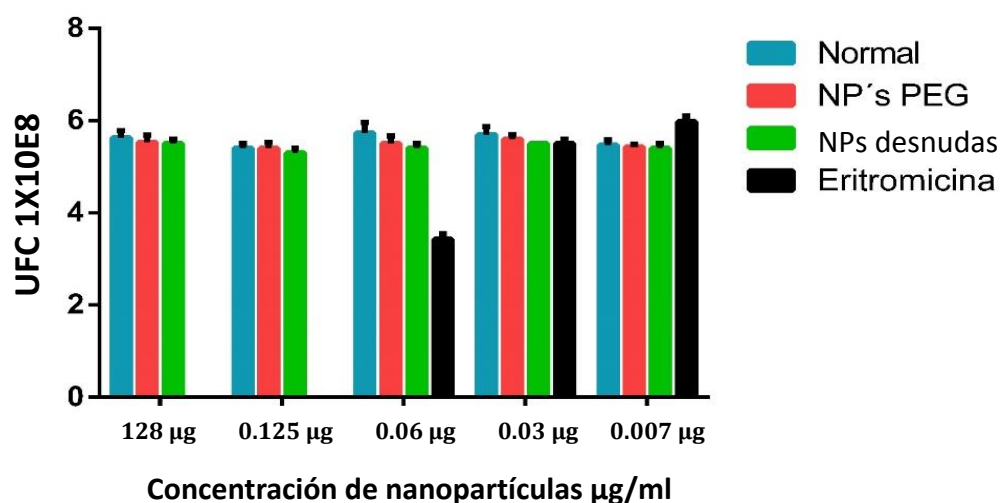


Figura 17: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* R6. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* R6 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en rojo con el tratamiento de NPs desnudas, en verde con el tratamiento de NPs recubiertas con PEG y en azul el crecimiento normal. No se observa ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa R6 tratadas tanto con nanopartículas desnudas como recubiertas con PEG comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

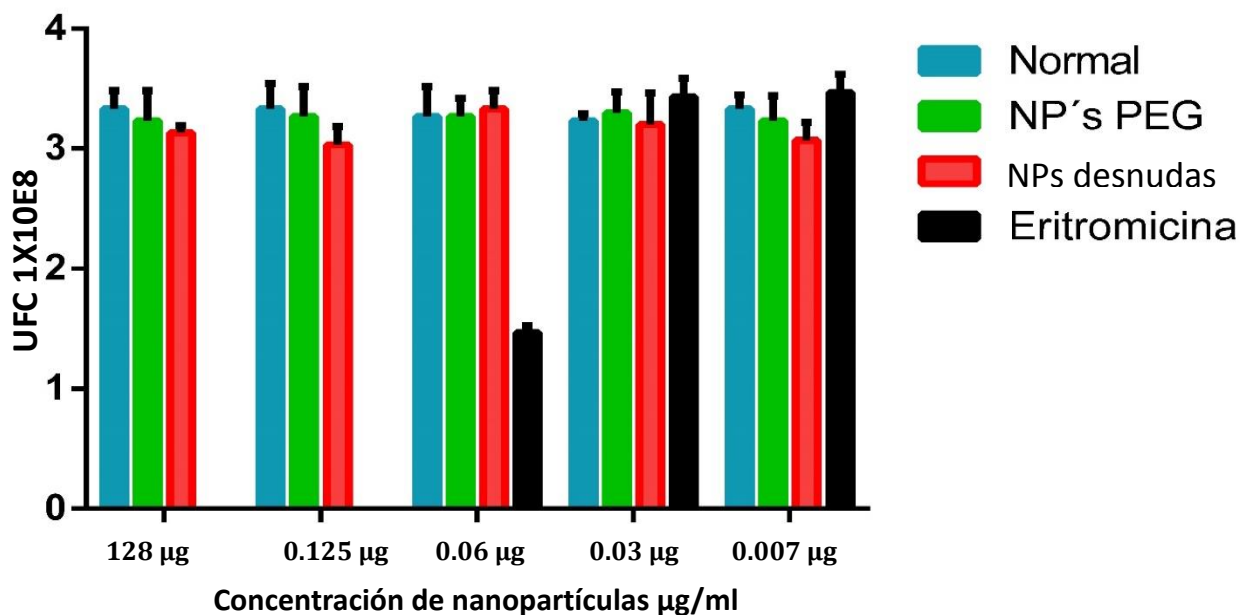


Figura 18: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* TIGR4. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* TIGR4 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en rojo con el tratamiento de NPs desnudas, en verde con el tratamiento de NPs recubiertas con PEG y en azul el crecimiento normal. No se observa

ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa R6 tratadas tanto con nanopartículas desnudas como recubiertas con PEG comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

Después de realizar el análisis estadístico de los resultados anteriores sabemos que las tres cepas *S. pneumoniae* con las que se trabajó no son susceptibles a las nanopartículas de hierro tanto desnudas como cubiertas con PEG, hasta 128 µg/ml, pero tampoco favorecen de forma positiva (mayor crecimiento) a las bacterias ni tampoco se ve afectada la viabilidad de las células.

8.2.- Purificación de proteínas secretadas por *S. pneumoniae* con afinidad a hierro.

8.2.1.- Obtención de la proteína secretada y cromatografía de afinidad.

Se realizaron los cultivos correspondientes para cada cepa, con el fin de lograr una mayor obtención de la proteína. Después se concentraron las proteínas, por medio de centrifugación, con lo que se obtienen las proteínas en el menor volumen posible; por último se puso a interaccionar con fase sólida de la cromatografía de afinidad (agarosa-grupo hemo) y posterior a ello se llevó a cabo el proceso de la fase líquida de la cromatografía (lavados y elución) tomando alícuotas de cada paso, finalmente se realizó la resolución de las proteínas purificadas y el proceso de cromatografía en geles de poliacrilamida, figuras 19 y 20.

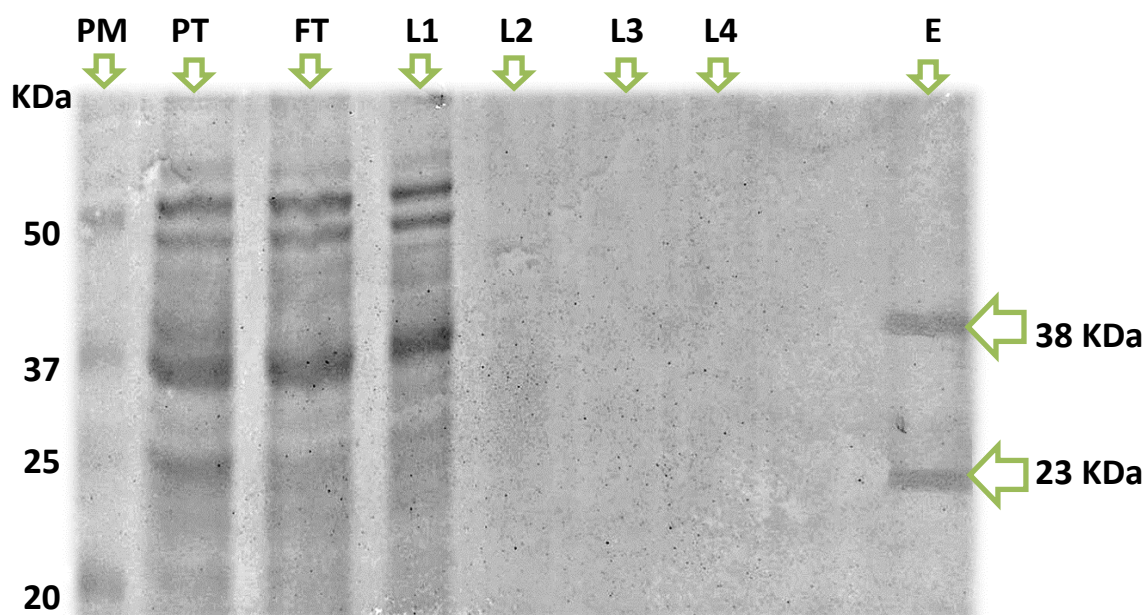


Figura 19: Gel SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a hierro de las proteínas secretadas por la cepa R6 de *S. pneumoniae*. De izquierda a derecha se observan: control PM: marcador de peso molecular; el bandeo correspondiente al total de proteínas secretadas por *S.*

pneumoniae R6, PT: proteínas totales secretadas; bandeo correspondiente a las proteínas secretadas por *S. pneumoniae* que no tiene afinidad por el grupo hemo, FT: Proteínas secretadas sin afinidad al grupo hemo; se observa el bandeo que corresponde a cada lavado, se puede observar como las proteínas con afinidades inespecíficas se retiran conforme se hacen los lavados L1-L4: lavados 1 al 4; se encuentran marcadas las 2 proteínas secretadas por *S. pneumoniae* R6 con afinidad al grupo hemo, E: elución.

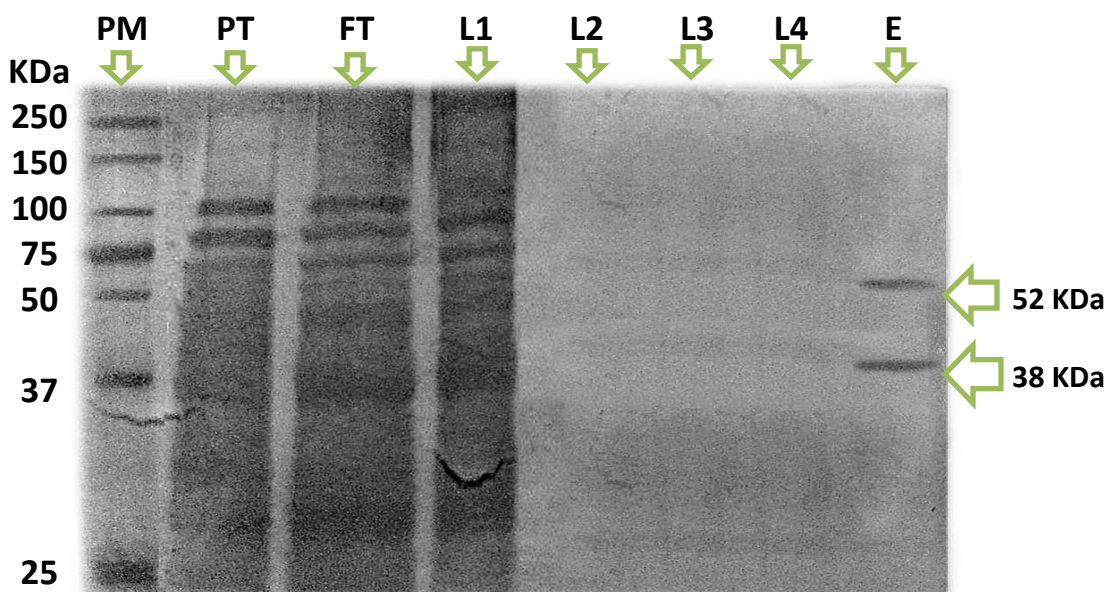


Figura 20: Gel SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a hierro de las proteínas secretadas por la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. De izquierda a derecha se observan: control PM: marcador de peso molecular; el bandeo correspondiente al total de proteínas secretadas por *S. pneumoniae* TIGR4, PT: proteínas totales secretadas; bandeo correspondiente a las proteínas secretadas por *S. pneumoniae* que no tiene afinidad por el grupo hemo, FT: Proteínas secretadas sin afinidad al grupo hemo; se observa el bandeo que corresponde a cada lavado, se puede observar como las proteínas con afinidades inespecíficas se retiran conforme se hacen los lavados L1-L4: lavados 1 al 4; se encuentran marcadas las 2 proteínas secretadas por *S. pneumoniae* TIGR4 con afinidad al grupo hemo, E: elución.

8.2.2.- Elección e identificación de proteína secretada.

En la purificación de las proteínas se observó que a pesar de ser *S. pneumoniae*, al variar la cepa varían las proteínas con afinidad al grupo hemo. Para la cepa R6 se obtienen dos proteínas con pesos moleculares aproximados de 23 y 38 KDa y para la cepa TIGR4 se encontraron igualmente dos pero con pesos moleculares aproximados de 38 y 52 KDa, debido a esto se eligió para trabajar la proteína en común entre las cepas, la proteína de 38 KDa; además esta proteína cumple con algunas de las características de un hemóforo.

Esta proteína corresponde a una reportada e identificada en 2014 por Vázquez y col. por espectrometría de masas, resultando una gliceraldehído 3 fosfato

deshidrogenasa secretada por *S. pneumoniae* que une hemoglobina y el grupo hemo, en la tabla 10 se muestra el resultado de la identificación que corroboramos.

Tabla 10: Identificación por masas de la proteína purificada por cromatografía de afinidad.

Número de Acceso	Nombre de la proteína	Cobertura	Peso molecular (kDa/pI)	Mascot score	Péptidos	Funciones
Q8CWN6	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. GAPDH	28%	38.76/5.38	149	8	Proceso metabólico de la glucosa. Une NAD Y NADP

Utilizando la metodología descrita por *Romero et al*, se pueden purificar eficientemente proteínas secretadas por *S. pneumoniae* con afinidad a hierro, de las cuales la que elegimos para trabajar es la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) descrita y que nosotros pudimos purificar e identificar de igual manera.

8.3.- Acoplar la proteína GAPDH secretada por *Streptococcus pneumoniae* a una nanopartícula de hierro, creando un conjugado nanopartícula-proteína.

8.3.1.- Cuantificación proteica.

Teniendo la proteína purificada, se cuantificó por el método Bradford, para dicho ensayo se realizó en primera instancia una curva estándar, figura 21.

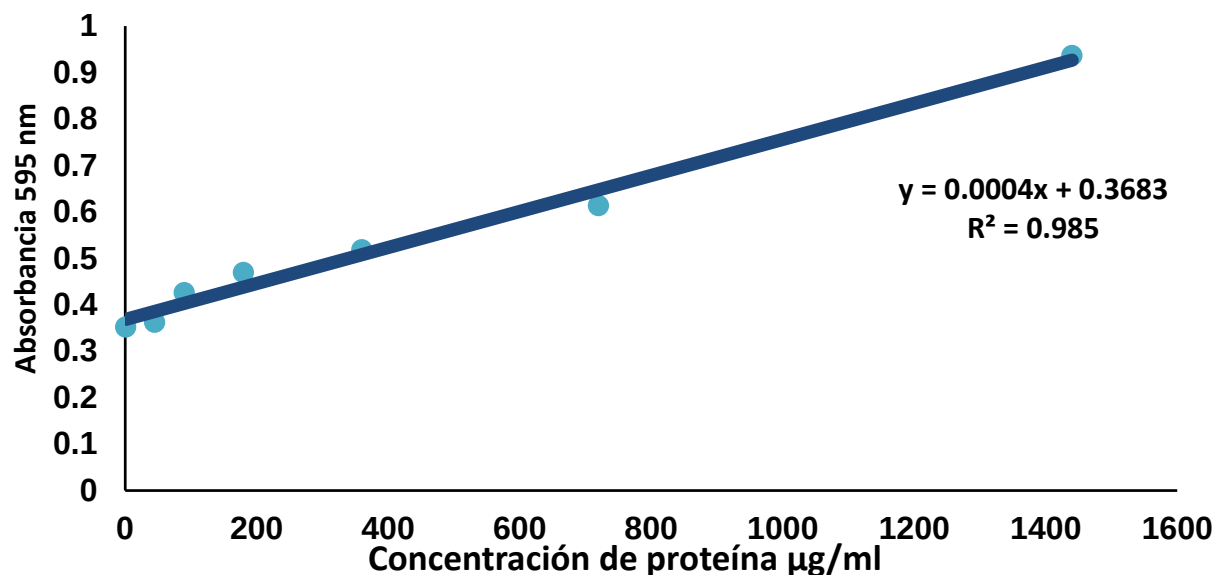


Figura 21: Curva estándar de Bradford. Se obtuvo tras la lectura a 595 nm de las muestras con una concentración de proteína conocida y se logró curva con una $R^2 = 0.985$ para usar como estándar.

Se procedió a realizar el proceso de cuantificación de proteínas extraídas de los geles preparativos para las tres cepas de *S. pneumoniae*. En promedio se obtuvieron 20 µg/ml de proteína por cada gel preparativo, al ser tan poca cantidad se decidió hacer un pool de las proteínas obtenidas de 7 geles, teniendo un promedio final de 140 µg/ml de proteína purificada de 38 KDa.

8.3.2.- Acoplamiento de proteína a nanopartículas de hierro.

Este proceso se llevó a cabo por colocando una concentración conocida de proteínas en sonicación constante, en baño de hielo (60 amplitud/ 4°C/ 2.5 hrs). Finalmente se cuantificó por el método Bradford la proteína que quedaba en el sobrenadante y en los lavados posteriores, teniendo rendimientos aproximados al 50% de proteína acoplada a las nanopartículas, tabla 11.

Tabla 11: Resultados del análisis de Bradford para calcular la cantidad de proteína acoplada a las nanopartículas de hierro.

	Concentración (µg/ml) Cepa TIGR4	(%)	Concentración (µg/ml) Cepa R6	(%)	Concentración (µg/ml) Cepa ATCC 49619	(%)
Proteína total	141.35	100	139.3	100	145.53	100

Sobrenadante	48	33.95	45	32.3	43	29.5
Lavado 1	23	16.24	23.7	17.01	26.5	18.2
Lavado 2	1.75	1.23	1.95	1.4	1.1	0.76
Proteína acoplada	68.25	48.3	71.35	49.29	74.93	51.54

Para describir los cambios observables de estabilidad en agua en las nanopartículas después del acoplamiento de la proteína, se hizo una evaluación visual, figura 22. Como se puede observar, las nanopartículas acopladas a la proteína GAPDH permanecen estables en agua, mientras que las desnudas se precipitan de manera inmediata en agua.



Figura 22. Imagen comparación visual de los cambios en las nanopartículas desnudas y recubiertas con la proteína. Del lado izquierdo se muestran las nanopartículas desnudas, las cuales se precipitan rápidamente en agua; del lado derecho se muestran las nanopartículas acopladas a la proteína de 38 KDa secretada por *S. pneumoniae* R6 y su estabilidad en agua.

Se logró generar una nanopartícula acoplada a una proteína GAPDH secretada por *S. pneumoniae*, consiguiendo así el bioconjugado nanopartícula-proteína.

El acoplamiento es una mejora para las nanopartículas desnudas, que comparadas con las que se encuentran recubiertas por PEG, eran inestables en el agua, puesto que se oxidan y precipitan rápidamente. En cambio las que se encuentran

acopladas a la proteína presentan características similares a las que se encuentran recubiertas con PEG entre ellas la estabilidad en agua.

8.4.- Evaluación la susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae* al bioconjugado.

Para cubrir este objetivo se realizó el mismo proceso que para el objetivo 1, se hicieron ensayos de concentración mínima inhibitoria (figuras 23, 24 y 25) para conocer la susceptibilidad de las tres cepas de *S. pneumoniae* a las nanopartículas acopladas a la proteína GAPDH (bioconjugado). Después se evaluó la viabilidad (figuras 26, 27 y 28) de las cepas tras 18 hrs de tratamiento con el bioconjugado. De igual forma se usó la cepa de referencia ATCC 49619 establecida por la CLSI.

8.4.1.- Ensayo de concentración mínima inhibitoria.

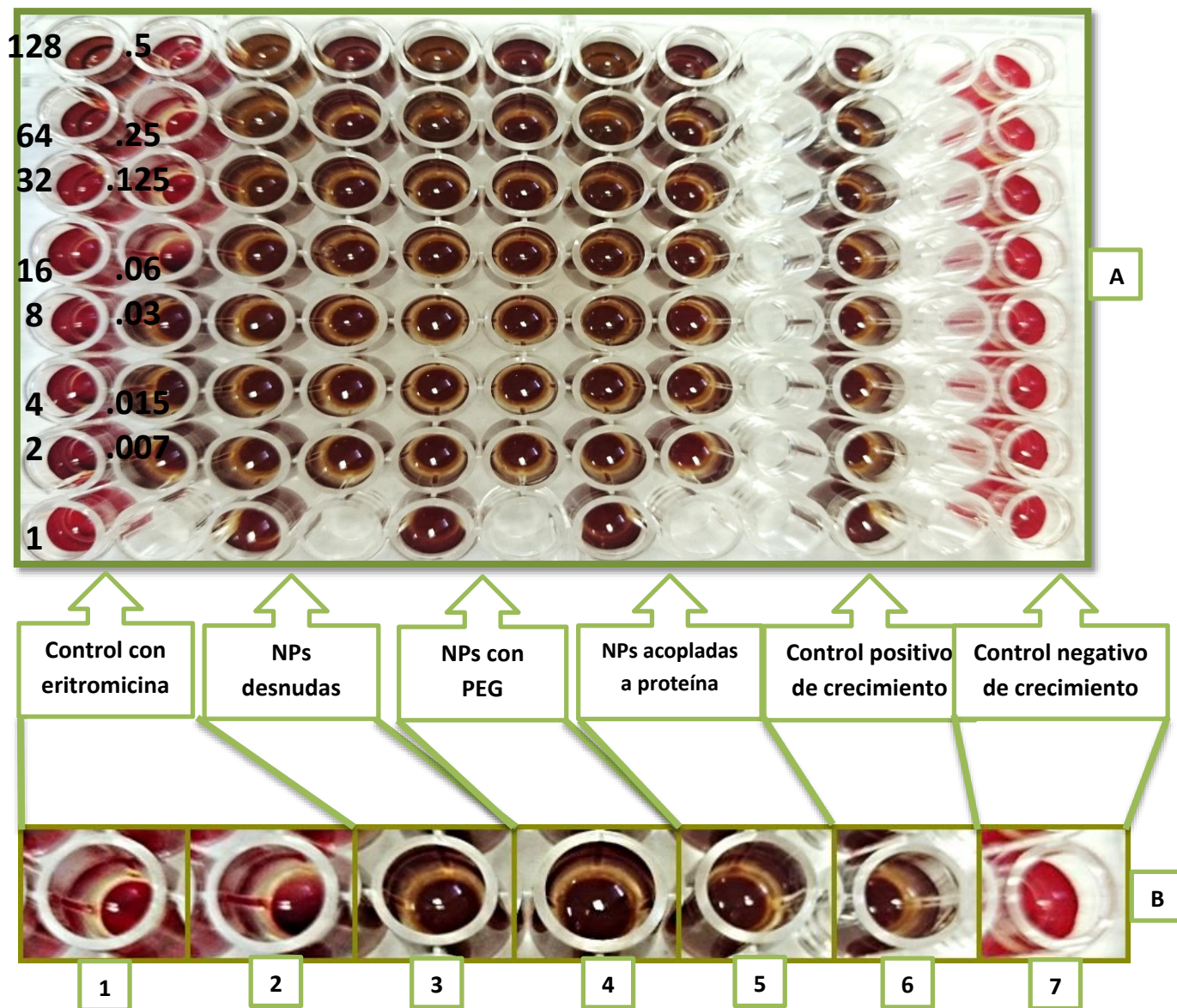


Figura 23: MIC realizado para *S. pneumoniae* ATCC 49619, para evaluar la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína. A) Placa de ELISA donde se muestra el MIC completo que se realizó para la cepa ATCC 49619. B) Acercamientos a pozos representativos. 1-2) Pozos con concentraciones de 0.125 µg/ml y 0.06 µg/ml de eritromicina respectivamente las cuales caen en el punto de corte del antibiótico. 3,4,5) Pozos con concentraciones de 0.125 µg/ml de nanopartículas desnudas, recubiertas con PEG y acopladas a la proteína respectivamente. 6-7) Pozos de los controles de crecimiento normal del *S. pneumoniae* ATCC 49619 y el control del medio estéril respectivamente.

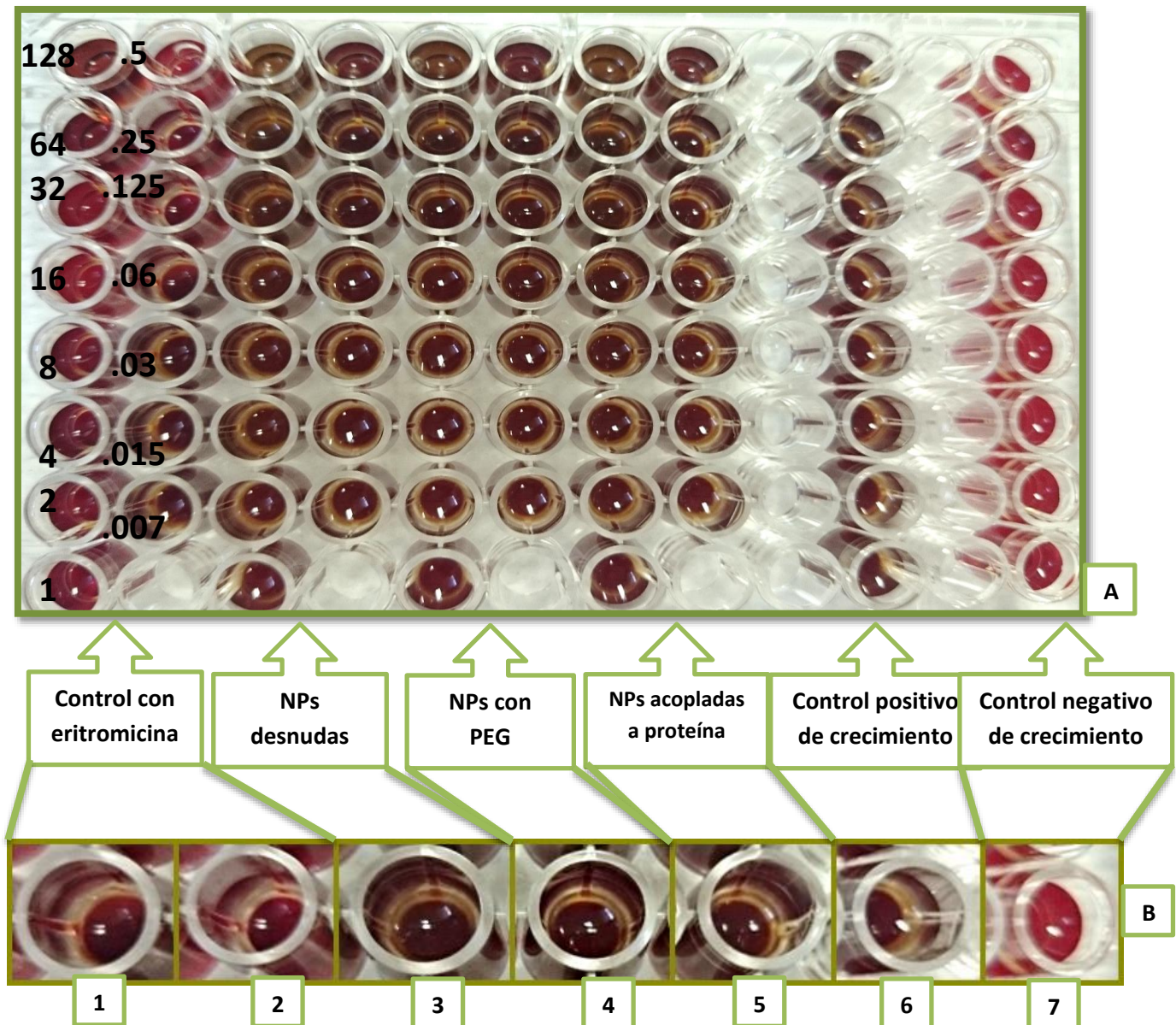


Figura 24: MIC realizado para *S. pneumoniae* TIGR4, para evaluar la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína. A) Placa de ELISA donde se muestra el MIC completo que se realizó para la cepa ATCC 49619. B) Acercamientos a pozos representativos. 1-2) Pozos con concentraciones de 0.125 µg/ml y 0.06 µg/ml de eritromicina respectivamente las cuales caen en el punto de corte del antibiótico. 3,4,5) Pozos con concentraciones de 0.125 µg/ml de nanopartículas desnudas, recubiertas con PEG y acopladas a la proteína respectivamente. 6-7) Pozos de los controles de crecimiento normal del *S. pneumoniae* TIGR4 y el control del medio estéril respectivamente.

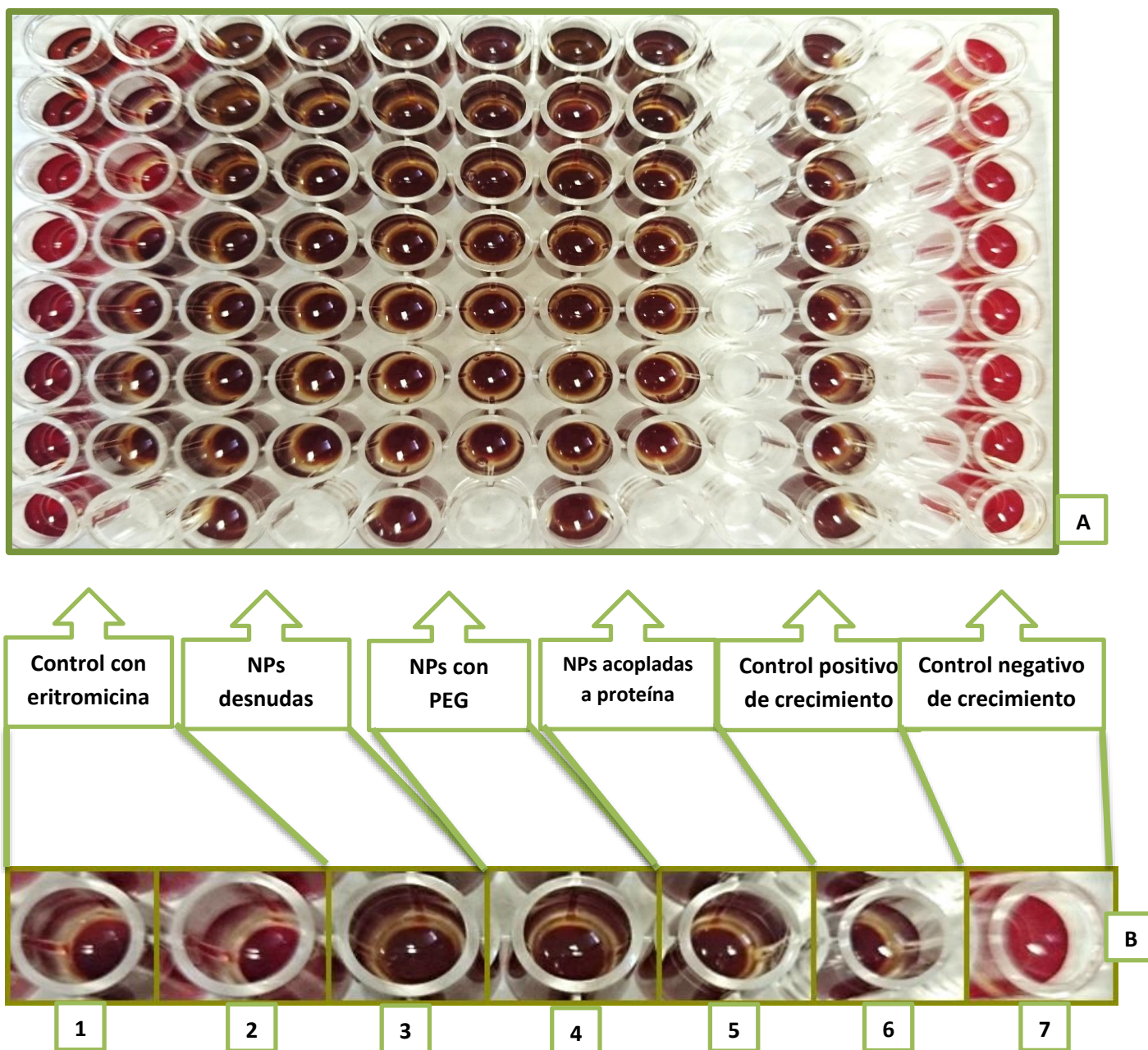


Figura 25: MIC realizado para *S. pneumoniae* R6, para evaluar la susceptibilidad del *S. pneumoniae* a las NPs de hierro de 20 nm, tanto recubiertas con PEG, desnudas y acopladas a la proteína. A) Placa de ELISA donde se muestra el MIC completo que se realizó para la cepa ATCC 49619. B) Acercamientos a pozos representativos. 1-2) Pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ y 0.06 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina respectivamente las cuales caen en el punto de corte del antiótico. 3,4,5) Pozos con concentraciones de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de nanopartículas desnudas, recubiertas con PEG y acopladas a la proteína respectivamente. 6-7) Pozos de los controles de crecimiento normal del *S. pneumoniae* R6 y el control del medio estéril respectivamente.

Se puede observar que las tres cepas no son susceptibles a las nanopartículas acopladas a GAPDH hasta 128 $\mu\text{g/ml}$.

8.4.2.- Ensayos de viabilidad de tres cepas *S. pneumoniae*.

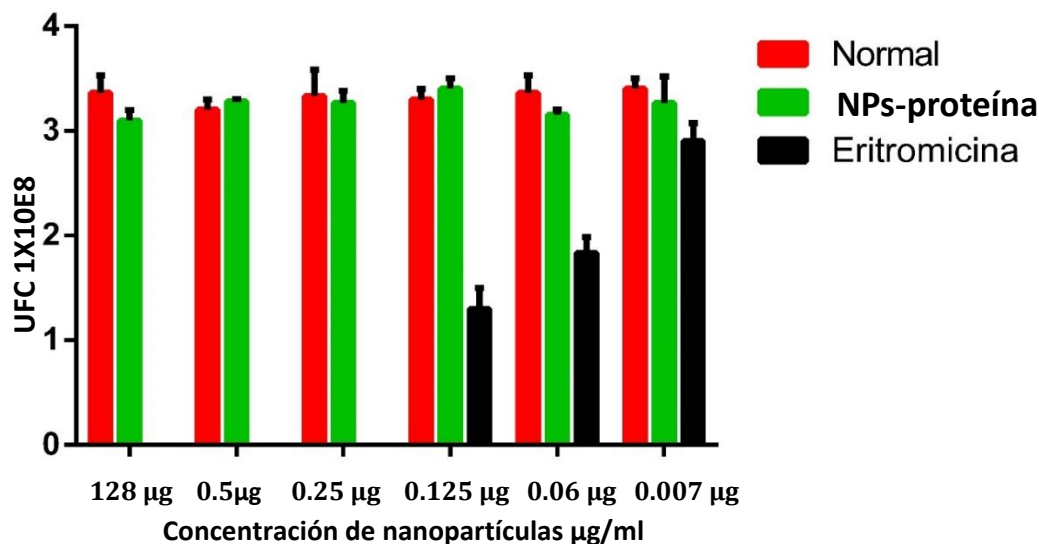


Figura 26: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* ATCC 49619 vs bioconjugado. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* ATCC 49619 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en naranja se muestra el control de crecimiento normal, en verde con el tratamiento con el bioconjugado. No se observa ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa ATCC 49619 tratadas con el bioconjugado comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

Evaluación de Viabilidad de *S. pneumoniae* TIGR4 vs FeNPs-Proteína

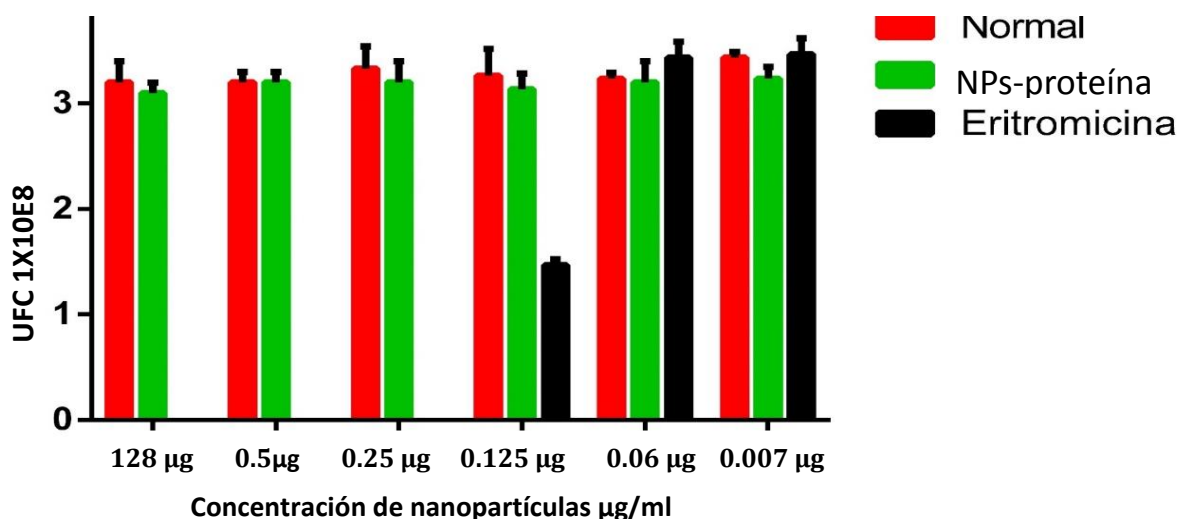


Figura 27: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* TIGR4 vs bioconjugado. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* TIGR4 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en naranja se muestra el control de crecimiento

normal, en verde con el tratamiento con el bioconjugado. No se observa ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa TIGR4 tratadas con el bioconjugado comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

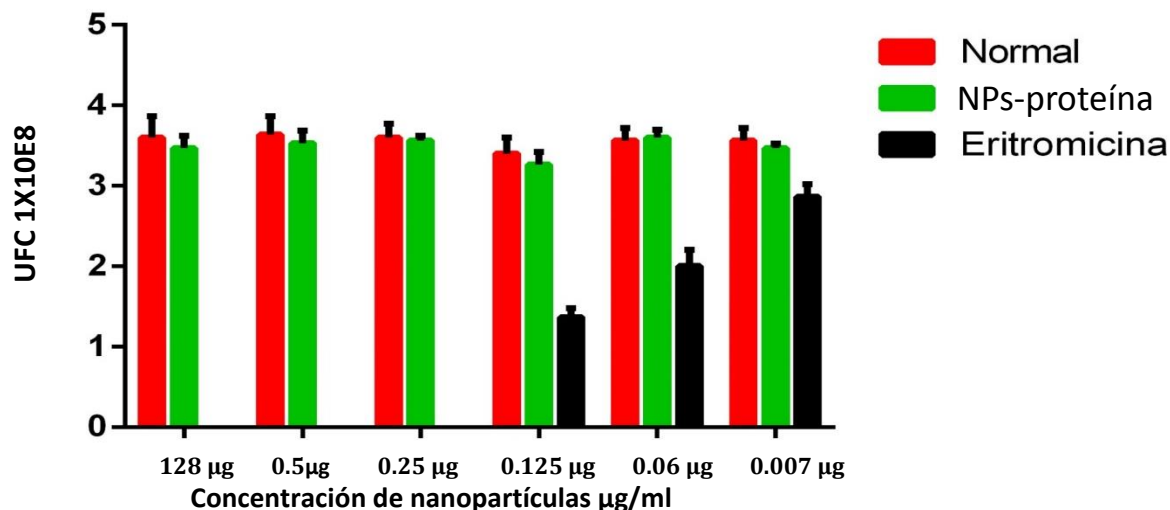


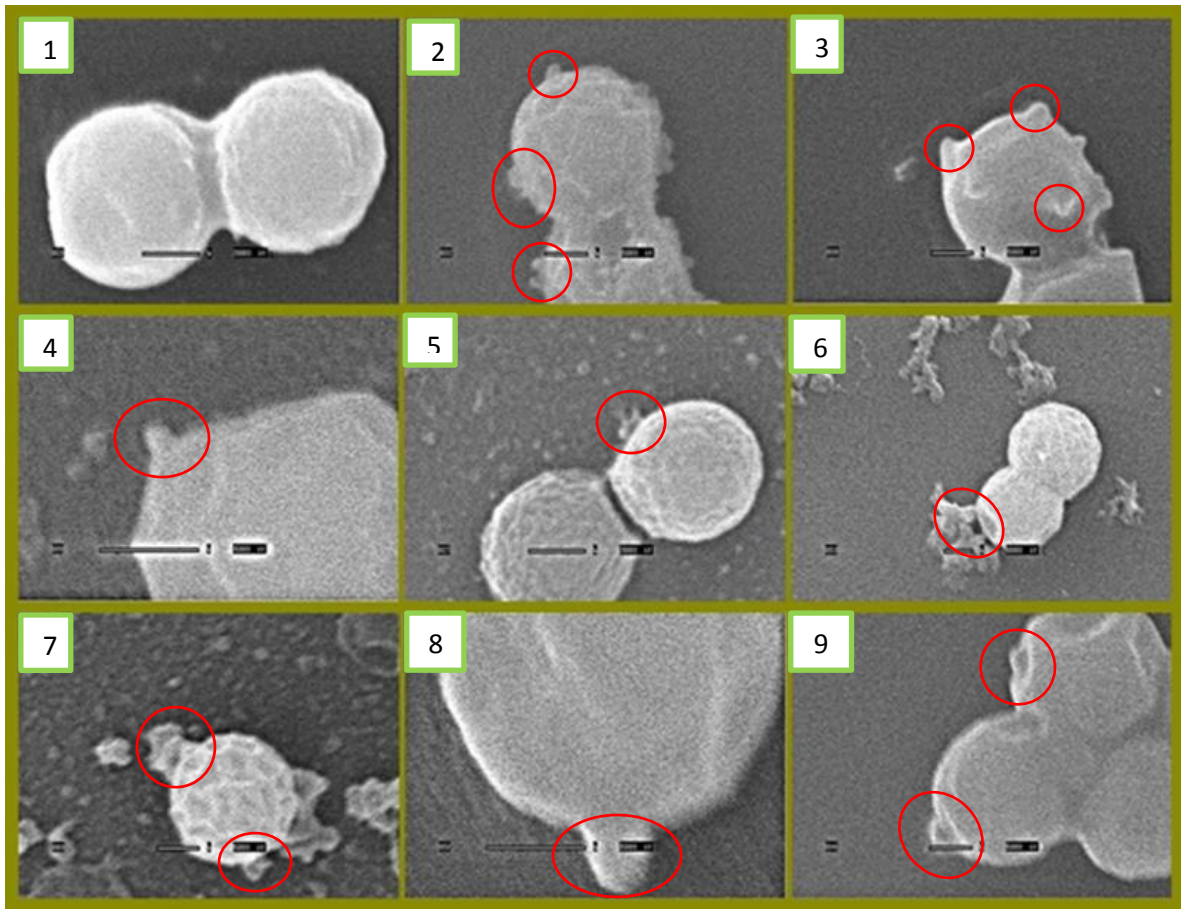
Figura 28: Evaluación de la viabilidad de *S. pneumoniae* R6 vs bioconjugado. En negro se muestran las unidades formadoras de colonias (UFCs) del *S. pneumoniae* R6 tratadas con eritromicina a las distintas concentraciones; en naranja se muestra el control de crecimiento normal, en verde con el tratamiento con el bioconjugado. No se observa ningún cambio significativo en el crecimiento de la cepa R6 tratadas con el bioconjugado comparadas con el crecimiento normal de las mismas.

De igual manera se hizo el análisis de los resultados observando que aún con el bioconjugado las nanopartículas de hierro no son tóxicas, hasta 128 µg/ml, para ninguna de las tres cepas de *S. pneumoniae* con las que se trabajó.

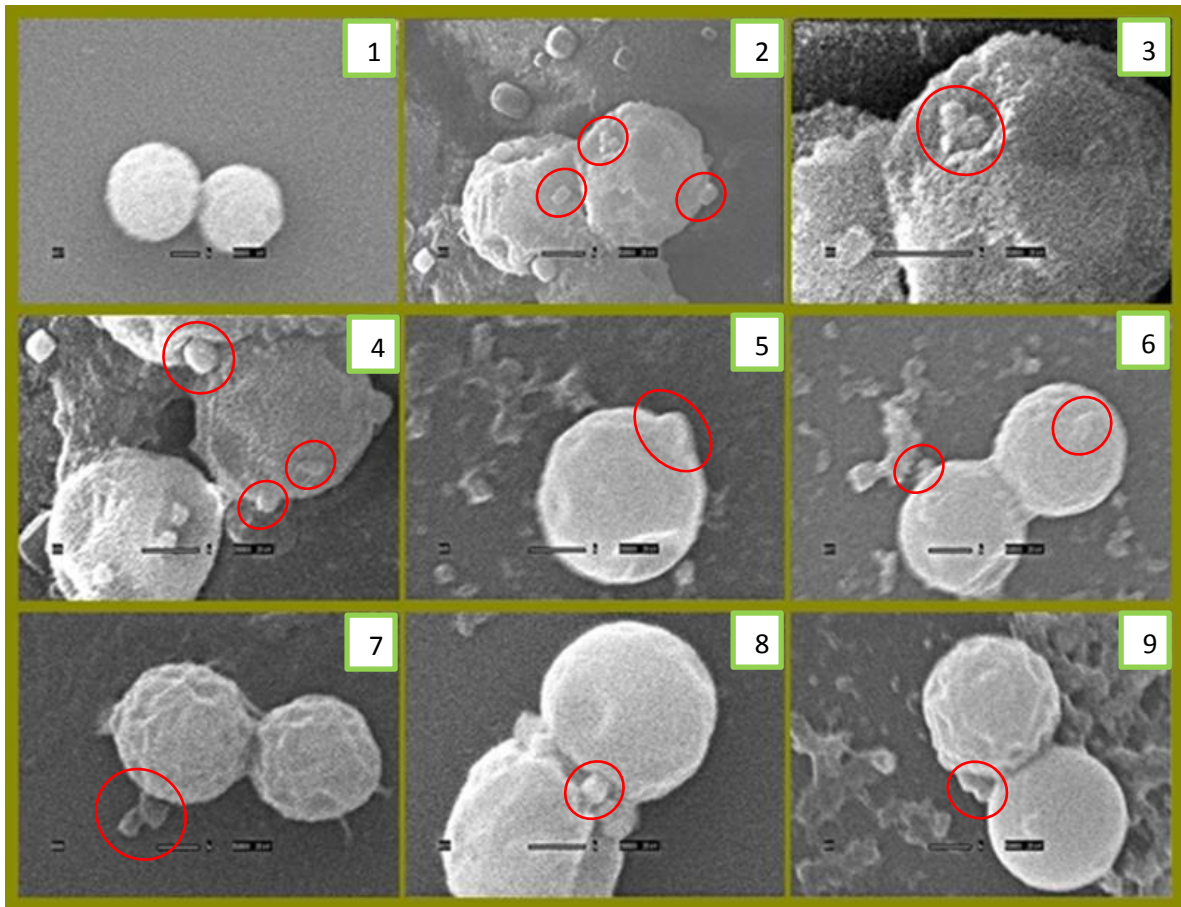
8.5.- Determinación de la interacción del bioconjugado sobre la estructura bacteriana de *Streptococcus pneumoniae*

8.5.1.- Observación en Microscopio Electrónico de Barrido.

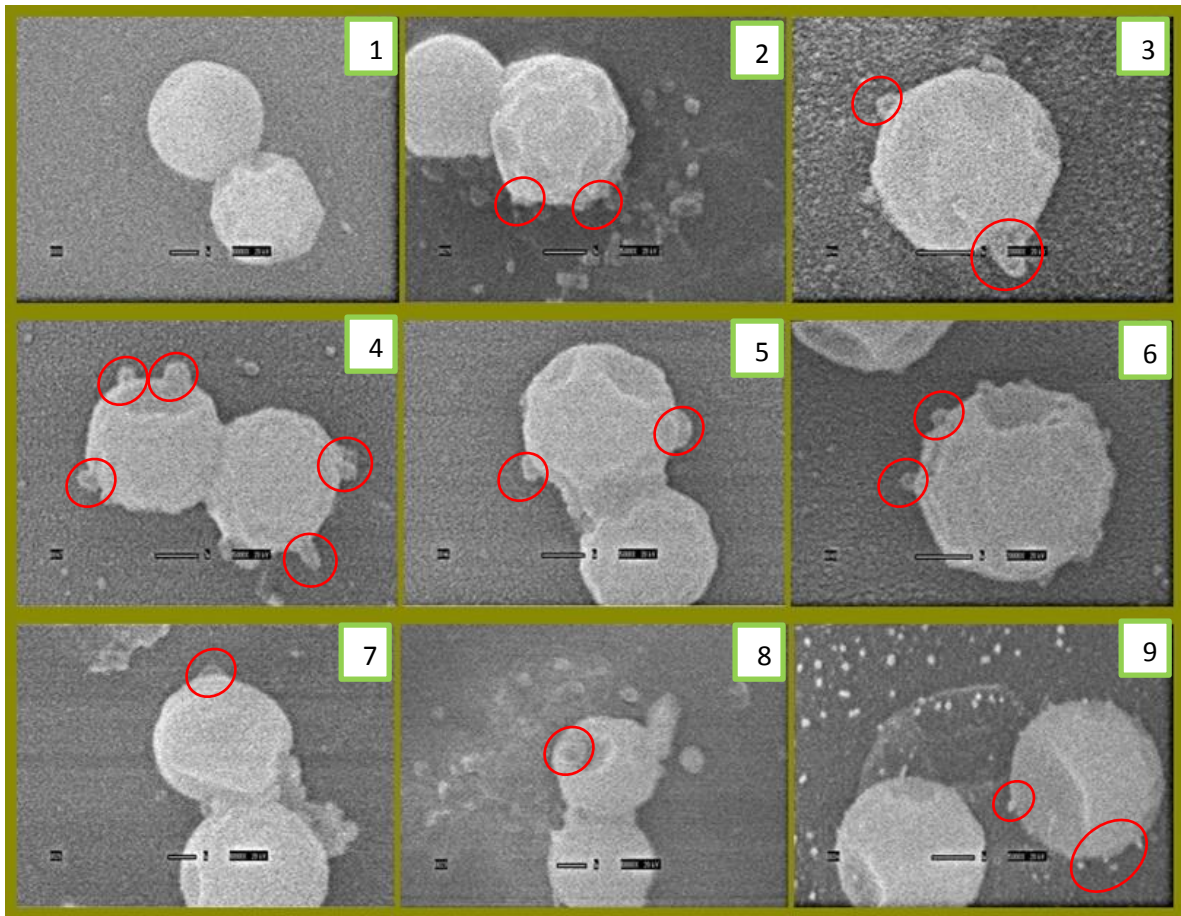
Las muestras se colocan en la columna del microscopio y las imágenes obtenidas se muestran en los paneles; A: *S. pneumoniae* R6, con tratamiento de nanopartículas desnudas. B: *S. pneumoniae* TIGR4 con tratamiento de nanopartículas desnudas. C: *S. pneumoniae* ATCC 49619 con tratamiento de nanopartículas desnudas. D: *S. pneumoniae* R6, tratada con el bioconjugado. E: *S. pneumoniae* TIGR4, tratada con el bioconjugado. F: Control de nanopartículas sin bacterias.



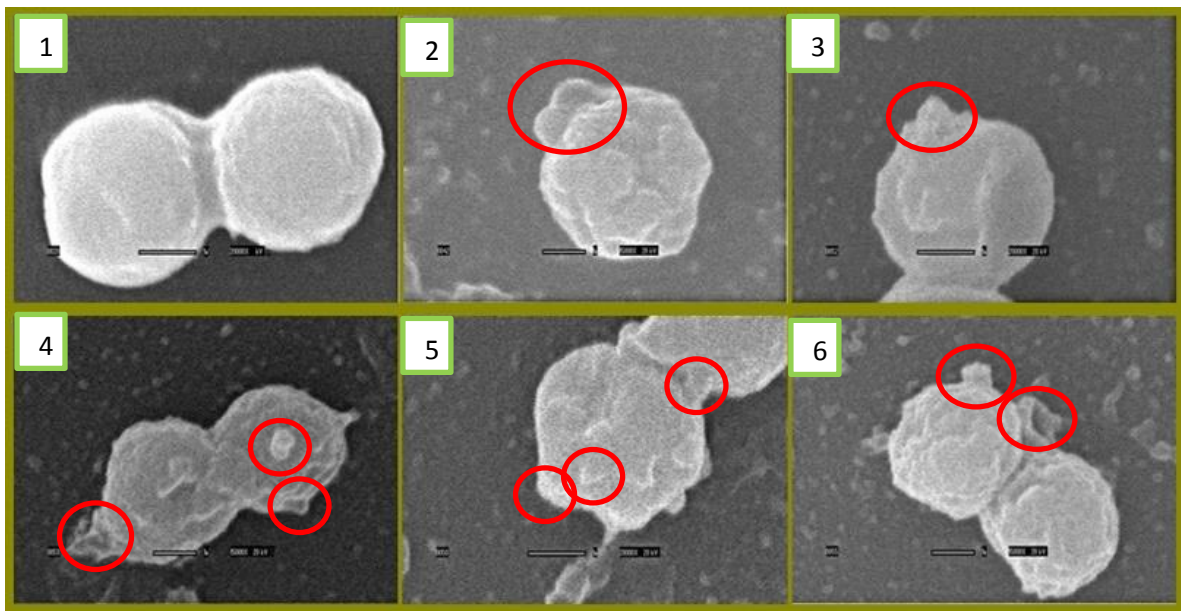
Panel A: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de *S. pneumoniae* R6 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir. Las interacciones que se pueden observar entre las nanopartículas desnudas y las bacterias se resaltan en rojo. 1) Crecimiento normal de la cepa, diplococo 20000X; 2) Concentración 0.125 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 3) Concentración 2 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 4) Concentración 4 $\mu\text{g/ml}$, 35000X; 5) concentración 128 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 6) Concentración 32 $\mu\text{g/ml}$, 10000X; 7) Concentración 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 15000X 8) Concentración 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 35000X; 9) Concentración 1 $\mu\text{g/ml}$, 15000X.



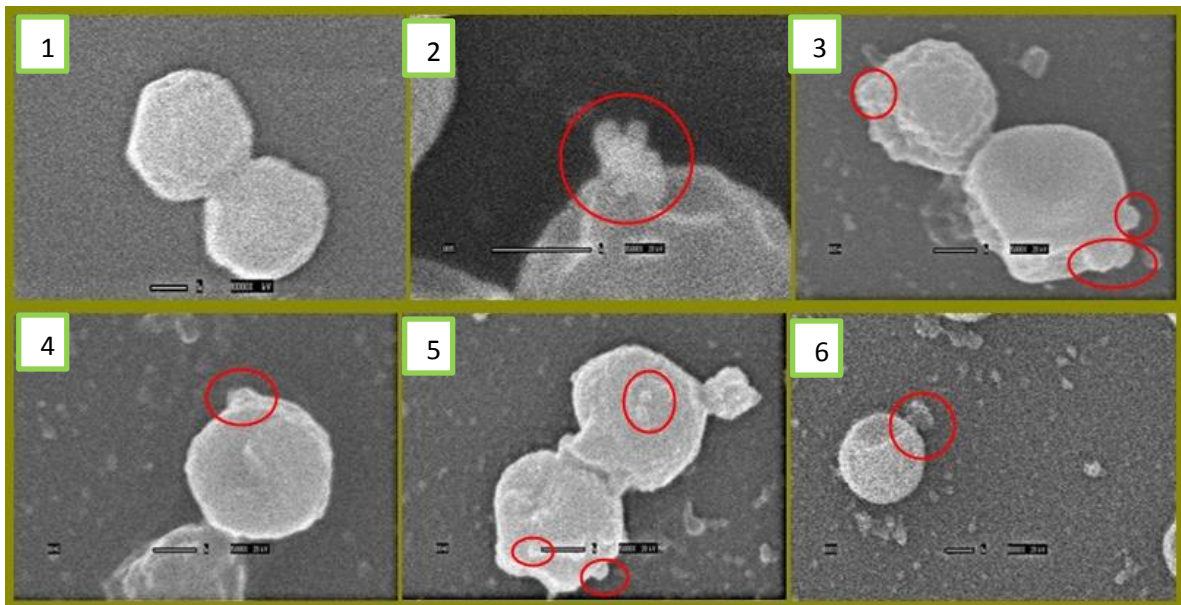
Panel B: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de *S. pneumoniae* TIGR4 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir. Las interacciones que se pueden observar entre las nanopartículas desnudas y las bacterias se resaltan en rojo. 1) Crecimiento normal de la bacteria, 10000X; 2) Concentración 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 3) Concentración 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 35000X, 3) Concentración 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 4) Concentración 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 5) Concentración 2 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 6) Concentración 128 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 7) Concentración 8 $\mu\text{g/ml}$, 20000X 8) Concentración 32 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 9) Concentración 4 $\mu\text{g/ml}$, 15000X.



Panel C: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619 con distintas concentraciones de NPs de hierro sin recubrir. Las interacciones que se pueden observar entre las nanopartículas desnudas y las bacterias se resaltan en rojo. 1) Crecimiento normal de la cepa, 10000X; 2) Concentración 32 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 3) Concentración 8 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 4) Concentración 128 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 5) Concentración 64 $\mu\text{g/ml}$, 15000X; 6) Concentración 0.125 $\mu\text{g/ml}$, 20000X; 7) Concentración 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 10000X; 8) Concentración 1 $\mu\text{g/ml}$, 10000X; 9) Concentración 16 $\mu\text{g/ml}$, 15000X.

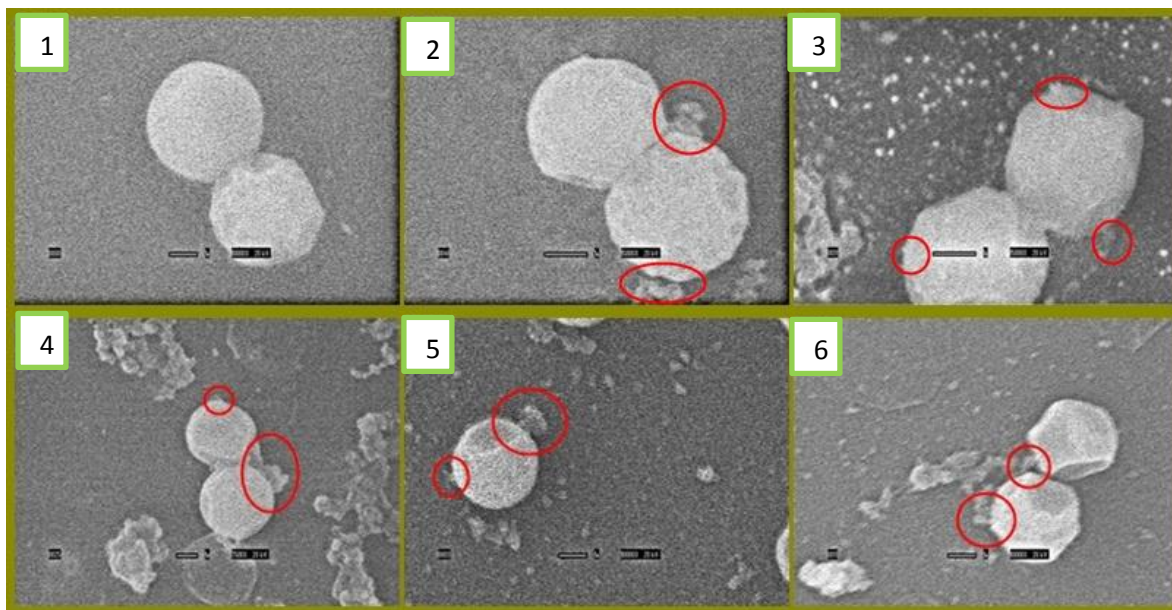


Panel D: Imágenes de MEB de *S. pneumoniae* R6 tatadas con el bioconjugado. Se resaltan en rojo las interacciones evidentes que entre el bioconjugado y la membrana bacteriana. 1) Control de crecimiento normal sin tratamiento, 20000X; 2) tratamiendo de 128 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; tratamiento de 32 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 20000X; 4) tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 5) tratamiento con 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 20000X; 6) tratamiento con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X.

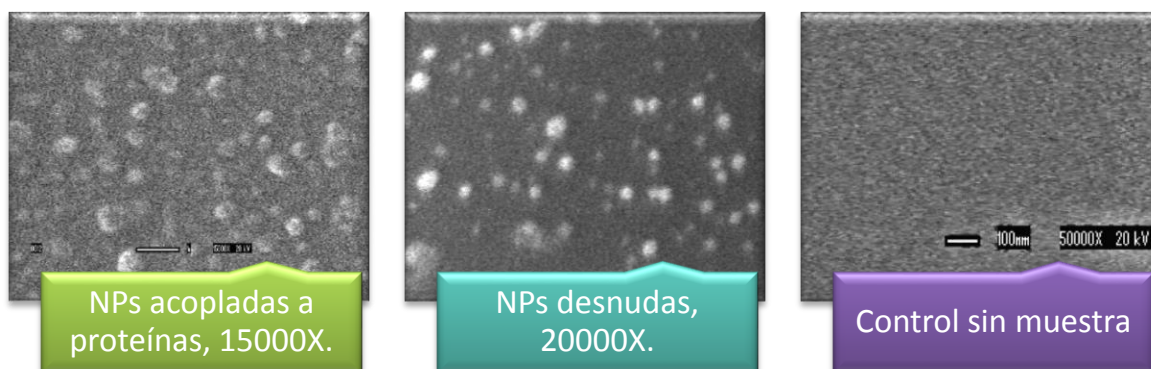


Panel E: Imágenes de MEB de *S. pneumoniae* TIGR4 tatadas con el bioconjugado. Se resaltan en rojo las interacciones evidentes que se dan entre el bioconjugado y la membrana bacteriana. 1) Control de crecimiento normal sin tratamiento, 10000X; 2) tratamiendo de 128 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 35000X; 3) tratamiento de 8 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 4)

tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 5) tratamiento con 1 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 6) tratamiento con 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 7500X.



Panel F: Imágenes de MEB de *S. pneumoniae* ATCC 49619 tratadas con el bioconjugado. Se resaltan en rojo las interacciones evidentes que se dan entre el bioconjugado y la membrana bacteriana. 1) Control de crecimiento normal sin tratamiento, 10000X; 2) tratamiento de 8 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 3) tratamiento de 16 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 15000X; 4) tratamiento con 32 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 7500X; 5) tratamiento con 0.125 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 7500X; 6) tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de bioconjugado, 7500X.



Panel G: Imágenes de MEB de las nanopartículas de óxido de hierro sin bacterias. Imágenes de los controles, de derecha a la izquierda las nanopartículas acopladas a la proteína GAPDH de *S. pneumoniae* ATCC 49619 a 15000X, las nanopartículas desnudas 20000X y el control del medio de cultivo sin nanopartículas ni bacterias.

Las imágenes nos permiten saber que cuando las NPs se encuentran sin acoplar a las proteínas, interactúan directamente con la membrana de las bacterias, pero al acoplar las NPs con la proteína, generando un bioconjugado, dicha interacción es más evidente, se evidencia en por la interacción de pequeñas esferas con la membrana de la bacteria.

Con lo anterior podemos decir que es el primer acercamiento para proponer que el uso de proteínas en el recubrimiento de las nanopartículas puede ayudar para direccionarlas, este mecanismo (antes usado para el tratamiento con cáncer) podría llegar a ser una opción para el tratamiento con NPs vs bacterias

IX.- DISCUSIÓN

Debido al aumento en la resistencia bacteriana [4, 9], a través de los años se han buscado nuevas herramientas que permitan la prevención de la misma, o en su defecto el tratamiento más eficiente de las enfermedades [9, 14].

Desde hace algunos años, las herramientas tecnológicas han ido tomando cada vez más fuerza para su uso en la medicina [17]. La tecnología en distintos niveles a permitido el avance en la búsqueda de mejorar los tratamientos, diagnósticos y la calidad de vida de un paciente.

En particular una ciencia emergente es la nanotecnología, la cual está íntimamente relacionada con muchas otras áreas, entre ellas está la llamada nanomedicina, que es simplemente la aplicación de las ventajas de los materiales a escala nano, a la medicina actual. Salen a relucir principalmente las nanopartículas que cuentan con características que las hace de interés, por destacar algunas: su tamaño y la capacidad microbiana de algunas; anteriormente, diferentes nanopartículas se han aplicado en algunas áreas de la vida diaria y la medicina, entre ellas las de óxido de hierro como contrastes para resonancia magnética, por lo que es de interés el estudio de otros posibles usos [36, 52, 54].

Se conocen algunos beneficios al cambiar o modificar la superficie de las nanopartículas, las cuáles pueden estar dadas por moléculas biológicas (proteínas, DNA, etc), polímeros (PEG, PVP, ETC) y otros materiales [21,22]. Entre las ventajas que se observan con dichas modificaciones *in vitro* e *in vivo* es, principalmente, la disminución del reconocimiento de las nanopartículas por el sistema inmune del hospedero, otra de las mejoras es un posible reconocimiento específico de las NPs por un blanco en particular [51, 58].

Se ha estudiado la toxicidad de las nanopartículas de hierro, principalmente las nanopartículas cero valente, a las cuales se les ha encontrado una actividad bactericida en *E. coli* [64]. Sin embargo estas nanopartículas son difíciles de sintetizar, al igual que son menos estables que otras nanopartículas de hierro. En contraste con esto, las nanopartículas de óxido de hierro tienen métodos de síntesis sencillos y son muy estables bajo ciertas condiciones [61].

Para las nanopartículas de óxido de hierro se ha estudiado su toxicidad tanto en células humanas como en microorganismos. Aunque los estudios no han sido completamente concluyentes para todas las células humanas en las que se han estudiado o en todos los microorganismos probados, se ha comprobado que tienen una menor citotoxicidad que las nanopartículas de hierro cero valente [66].

Entre los microorganismos que destacan en los estudios tóxicos a nivel bacteriano son las bacterias Gram negativas *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, para las bacterias Gram positivas son prácticamente nulos dichos estudios, por lo que fue de nuestro interés conocer dichos efectos en la bacteria *S. pneumoniae* [58, 63].

Los estudios sobre la toxicidad de las NPs de óxido de hierro en las bacterias son variados (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, etc), desafortunadamente no se ha demostrado, hasta ahora, para el *S. pneumoniae* dicha toxicidad [64, 65].

Previo a nuestro análisis, se desconocía por completo la toxicidad de las NPs de óxido de hierro en las cepas de *S. pneumoniae*, ahora podemos decir que las nanopartículas de óxido de hierro no son tóxicas para dichas bacterias hasta 128 µg/ml, ni tampoco presentan un efecto bacteriostático en el medio Todd Hewitt, también sabemos que el tratamiento tampoco favorece de manera positiva el crecimiento de las bacterias.

Por otro lado, comprobamos que existe una interacción de las NPs de óxido de hierro con la membrana de las bacterias, la cual se puede observar por MEB; también es posible acoplar una proteína secretada por *S. pneumoniae* a las NPs de hierro con rendimientos cercanos al 50% con la metodología utilizada. Observamos que el bioconjugado interactúa con mayor facilidad que las NPs de óxido de hierro desnudas con la membrana de las bacterias y esto también se puede observar por MEB, lo que podría servir para el diseño de una NPs más específica.

Esta interacción podría permitir que las nanopartículas puedan ser más específicas y usar el bioconjugado como un sistema modelable al cual se le pudiesen agregar fármacos para su modificación e investigar si este sistema es más eficiente.

Aun cuando el camino para poder llegar al diseño de una nanopartícula específica al 100 % podemos decir que el hecho de llevar una proteína facilitarían este sistema. De llegar a ser lo anterior posible, se contará con un vehículo que pueda llegar a entregar más eficiente y específicamente medicamentos, lo cual podría ayudar a reducir la emergente resistencia bacteriana a los antibióticos y mejorar los tratamientos que tenemos a disposición.

XI.- CONCLUSIONES

Para finalizar, derivado de la fase experimental puedo concluir que *S. pneumoniae* no es susceptible a las nanopartículas de hierro tanto desnudas como recubiertas con PEG, hasta 128 µg/ml, pero que estas concentraciones tampoco favorecen un mayor crecimiento desarrollo de las mismas.

Logré purificar e identificar una proteína de 38.7 kDa que une hierro, en las 3 cepas de *S. pneumoniae*, siendo esta una GAPDH. La cual acoplé a las nanopartículas de hierro desnudas con un rendimiento aproximado del 50%.

Las nanopartículas de óxido de hierro acopladas a la proteína GAPDH secretada por *S. pneumoniae* no causan susceptibilidad en las tres cepas con las que se trabajó hasta 128 µg/ml.

La MET nos permitió saber el tamaño de las nanopartículas con las que se trabajó y la MEB nos permitió observar la interacción NP-bacteria, bioconjugado-bacteria a nivel de membrana bacteriana.

XII.- REFERENCIAS

1. - Prado J. Valeria. *Streptococcus pneumoniae*: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS.
- 2.- García López, Ernesto. Plagas del siglo XXI: el “neumococo”.
- 3.- Instituto Nacional de Salud Colombiana. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*.
4. – Hortal María, Camou Teresa. Molecular Epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*.
5. - Gavin K. Paterson and Tim J. Mitchell. Innate immunity and the pneumococcus.
- 6.- G. Rodríguez. Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*.
- 7.- Departamento de Bacteriología © 2002 Kenneth Todar Universidad de Wisconsin-Madison. Defensa bacteriana contra la respuesta inmune del hospedero.
8. - Aras Kadioglu, Jeffrey N. Weiser, James C. Paton and Peter W. Andrew. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease.
9. - E. AlonsodeVelazco, A. F. M. Verheul, J. Verhoef, And H. Snnippe. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines.
- 10.- Silva García, Ma. Del Carmen. Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Gallego de Salud.volumen II. Editorial MAD, página 120.
- 11.- Romero Caballero Raúl. Microbiología y Paracitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra edición. Editorial Panamericana. Página 699.
12. - R. Vasanthakumari. Textbook of Microbiology. BI Publications Pvt Ltd, 2007; Pág. 197-200.
13. - E.L. Foca-nici Ciurlica, C. Nadejde, D.E. Creanga, A. Carlescua and V. Badescu. Antibiotic Coated Magnetite NanoParticles For Biological Applications.
- 14.- Raul O. Ruvinsky. Epidemiology And Antimicrobial Resistance Of *Streptococcus pneumoniae*: Invasive Disease In Latin America.

- 16.- L. Zhang, D. Pornpattananangkul, C.-M.J. Hu and C.-M. Huang. Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery.
- 17.- Suphiya Parveen, MS, Ranjita Misra, MS, Sanjeeb K. Sahoo. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging.
- 18.- Etgar Levy-Nissenbaum, Aleksandar F. Radovic-Moreno, Andrew Z. Wang, Robert Langer and Omid C. Farokhzad. Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery.
- 19.- A. Mandal, V. Meda, W.J. Zhanga, K.M. Farhan, A. Gnanamani. Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity of PEG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold.
- 20.- M.L. Hans, A.M. Lowman. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting.
- 21.- Jian-Bo Qu, Hui-Hui Shao, Guang-Lun Jing, Fang Huang. PEG-chitosan-coated iron oxide nanoparticles with high saturated magnetization as carriers of 10-hydroxycamptothecin: Preparation, characterization and cytotoxicity studies.
- 22.- Miao Yu, Shaohui Huang, Kevin Jun Yu and Alisa Morss Clyne. Dextran and Polymer Polyethylene Glycol (PEG) Coating Reduce Both 5 and 30 nm Iron Oxide Nanoparticle Cytotoxicity in 2D and 3D Cell Culture.
- 23.- V.M. Ragaseema, S. Unnikrishnan, V. Kalliyana Krishnan, Lissy K. Krishnan. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-protected silver nanoparticle coated surfaces.
- 24.- Da-kang Hu, Dong-guo Wang, Yang Liu, Chi-bo Liu, Lian-hua Yu, Ying Qu, Xin-hua Luo, Jin-hong Yang, Jian Yu, Jin Zhang and Xiang-yang Li. Roles of virulence genes (PsaA and CpsA) on the invasion of Streptococcus pneumoniae into blood system.
- 25.- Sibyl Geelen, Chandrabali Bhattacharyya And Elaine Tuomanen. The Cell Wall Mediates Pneumococcal Attachment to and Cytopathology in Human Endothelial Cells.
- 26.- Douglas P. Fine. Pneumococcal Type-Associated Variability in Alternate Complement Pathway Activation.
- 27.- D. E. Briles, C. Forman, J. C. Horowitz, J. E. Volanakis, W. H. Benjamin, JR. Antipneumococcal Effects of C Reactive Protein and Monoclonal Antibodies to Pneumococcal Cell Wall and Capsular Antigens.

- 28.- John C. Kash, Kathie-Anne Walters, A. Sally Davis, Aline Sandouk, Louis M. Schwartzman, Brett W. Jagger, Daniel S. Chertow, Qi Li, Rolf E. Kuestner, Adrian Ozinsky, and Jeffery K. Taubenberger . Lethal Synergism of 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus and *Streptococcus pneumoniae* Coinfection Is Associated with Loss of Murine Lung Repair Responses.
- 29.- Catherine Hyams, Sophia Opel, William Hanage, Jose Yuste³, Katie Bax, Birgitta Henriques- Normark, Brian G. Spratt⁶, Jeremy S. Brown. Effects of *Streptococcus pneumoniae* Strain Background on Complement Resistance.
- 30.- Daniel M. Weinberger, Krzysztof Trzciniński, Ying-Jie Lu, Debby Bogaert, Aaron Brandes, James Galagan, Porter W. Anderson, Richard Malley, Marc Lipsitch. Pneumococcal Capsular Polysaccharide Structure Predicts Serotype Prevalence.
- 31.- Avery O., MacLeod C., McCarty M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types. J. Exp. Med. 79:137–158.
- 32.- Henriques-Normark B. and Tuomanen E. The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. 2013. Cold Spring Harb Perspect Med;3:a010215.
- 33.- Moritz M. and Geszke-Moritz M. The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. 2013. Chemical Engineering Journal 228; 596–613.
- 34.- Kruszynska M., Borchert H., Parisi J. and Kolny-Olesiak J. Synthesis and shape control of CuInS₂ nanoparticles. 2010. J. Am. Chem. Soc., 132, pp. 15976–15986.
- 35.- Chen C., Tsao T., Li W., Shen W., Cheng C., Tang J., Jen C., Chau L. and Wu W. Novel U-shaped gold nanoparticles-modified optical fiber for localized plasmon resonance chemical sensing. 2010. Microsyst. Technol, 16, pp. 1207–1214.
- 36.- Llabot J., Palma S. y Allemandi D. Nanopartículas poliméricas sólidas. 2008. Farmacotecnia; No 53, 40-49.
- 37.- Kokura S., Handa O., Takagu T., Ishikawa T., Naito Y. and Yoshikawa T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. 2010. Nanomed. Nanotechnol., 6, pp. 570–574.

- 38.- Lee S, Song and Lee B. Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. 2010. Korean J. Chem. Eng., 27, pp. 688–692.
- 39.- Marius S., Lucian H., Marius M., Daniela P., Irina G., Romeo-Iulian O., Simona D. and Viorel M. Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly(amide-hydroxyurethane) media. 2011. J. Mater. Sci. – Mater. Med., 22, pp. 789–796.
- 40.- Gottesman R., Shukla S., Perkas N., Solovyov L., Nitzan Y. and Gedanken A. Sonochemical coating of paper by microbicidal silver nanoparticles. 2011. Langmuir, 27, pp. 720–726.
- 41.- Liu J., Luo Z. and Bashir S. A progressive approach on inactivation of bacteria using silver–titania nanoparticles. 2013. Biomater. Sci., 1, pp. 194–201.
- 42.- Dong C., Cairney J., Sun Q., Maddan O., He G. and Deng Y. Investigation of Mg(OH)₂ nanoparticles as an antibacterial agent. 2010. J. Nanopart. Res., 12, pp. 2101–2109.
- 43.- Cui Y., Zhao Y., Tianb Y., Zhang W., Lü X. and Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli. 2012. Biomaterials 33; 2327e2333.
- 44.- Cope LD, Yogev R, Muller-Eberhard U, Hansen EJ. J. A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:Hemopexine by Haemophilus influenzae type B. Bacteriol 1995, 177:2644- 2653. Pubmed.
- 45.- Cope LD, Thomas S, Latimer J, Slaughter C, Muller-Eberhard U, Hansen E. The 100 kDa haem: Hemopexin-binding protein of Haemophilus influenzae: structure and localization. Mol Microbiol 1994, 13:863-873.
- 46.- Delepelaire P, Wandersman C. The SecB chaperone is involved in the secretion of the Serratia marcescens HasA protein through an ABC transporter. EMBO J 1998, 17:936-944. Pubmed
- 47.- Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C. Protein secretion in gram-negative bacteria: Assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters in ordered and promoted by substrate binding. EMBOJ 1996, 15:5804-5811. Pubmed.
- 48.- Ali LM, Gutiérrez M, Cornudella R, Moreno JA, Piñol R, Gabilondo L, Millán A, Palacio F. Hemostasis disorders caused by polymer coated iron oxide nanoparticles.

- 49.- Panyan J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55:329-347.
- 50.- Ehrenberg MS, Friedman AE, Finkelstein JN, Oberdörster G, McGrath JL. The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomater.* 2009; 30(4):603-610.
- 51.- Bawarski N, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomed Nanotech Biol Med.* 2008; 4:273-282.
- 52.- Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci.* 2007; 18: 241-68.
- 53.- Kreuter J, Ramge P, Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, *et al.* Direct evidence of polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res.* 2003; 20: 409-416.
- 54.- Moddaresi M, Brown MB, Zhao Y, Tamburic S, Jones SA. The role of vehicle nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Intern J Pharmac.* 2010; 400(1-2): 176-182.
- 55.- Reinier Oropesa Nuñez, Ulises J. Jáuregui Haza. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Rev. CENIC.* 2012; Volumen 43: 3.
- 56.- Aubin y Schifferli. Structure and function of nanoparticle protein conjugates. *Biomed Mater.* 2008;3(3):034001.
- 57.- Fortino Solórzano-Santos, M.C., Ma. Guadalupe Miranda-Novales, M.C. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos.
- 58.- Fengqin Hu, Qiaojuan Jia, Yilin Li and Mingyuan Gao. Facile synthesis of ultrasmall PEGylated iron oxide nanoparticles for dual-contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging. 21 April 2011, IOP PUBLISHING NANOTECHNOLY **22** (2011) 245604 (7pp).
- 59.- Herve T, Karen E. Nelson, Ian T. Paulsen, Jonathan A. Eisen *et al.* Complete Genome Sequence of a Virulent Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**, 498 (2001).
- 60.- Joanh Hoskins, William E. Alborn, *et al.* Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Oct. 2001, p. 5709–5717.

- 61.- C. Pascal, J. L. Pascal, F. Favier. Electrochemical Synthesis for the Control of γ -Fe₂O₃ Nanoparticle Size. Morphology, Microstructure, and Magnetic Behavior. *Chem. Mater.*, 1999, 11 (1), pp 141–147.
- 62.- Wei Wu, Quanguo He, Changzhong Jiang. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *NANO REVIEW*, October 2008.
- 63.- Borcharding J, Baltrusaitis J, Chen H, Stebounova L, Wu CM, Rubasinghege G, Mudunkotuwa IA, Caraballo JC, Zabner J, Grassian VH, Comellas AP. Iron oxide nanoparticles induce *Pseudomonas aeruginosa* growth, induce biofilm formation, and inhibit antimicrobial peptide function. *Environ Sci Nano*. 2014 Apr;1(2):123-132.
- 64.-Changha Lee, Jee Yeon Kim, Won Il Lee, Kara L. Nelson, Jeyong Yoon. Bactericidal Effect of Zero-Valent Iron Nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42 (13), pp 4927–4933.
- 65.- Mohammad Esmaeel Kafayati, Jamshid Rahe, Mahmoud Torabi Angazi, Shahrokh Aliza, Hassan Bardania. The effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles on the growth of genetically Manipulated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (PSOX4). *Iran J Biotech*. 2013;11(1): 43-6.
- 66.- Vanessa Valdiglesias, Gozde Kili, Carla Costa, Natalia Fernández-Bertólez, Eduardo Pásaro, Joao Paulo Teixeira, Blanca Laffon. Effects of IronOxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Genotoxicity, Developmental Toxicity, and Neurotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2014.

APÉNDICES

Solución stock de TCA.

Reactivo	Cantidad
Ácido tricloroacético	500 g
Agua destilada	350 ml

Volúmenes necesarios para preparar 100ml de azul de Coomassie.

Reactivo	Volumen necesario para 100 ml
Ácido acético glacial	10ml
Metanol	45 ml
Agua destilada	45 ml
Azul de coomassie G-250	0.3 g

Volúmenes necesarios para preparar 400 ml de solución destiñidora.

Reactivo	Volumen necesario para 400 ml
Ácido acético glacial	40 ml
Metanol	200 ml
Agua destilada	160 ml

Solución stock de Eritromicina.

Pesar en tubo estéril de 1.5 ml, 0.0075 g de eritromicina con una potencia de 850, se disolvieron en 500 µl de etanol absoluto, se completó a 5 ml con agua destilada estéril.

Medio de cultivo líquido TH.

Pesar 40 gramos de medio deshidratado y 5 gramos de extracto de levadura, agregar cuanto baste para completar 1 litro, agitar hasta disolver, esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C por 15 min.

Medio de cultivo agar sangre.

Pesar 30 gramos de medio deshidratado agar sangre, disolver con cuanto baste de agua destilada para un litro, llevar a ebullición con agitación constante hasta disolver completamente. Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C por 15 min.

Tris-HCl 250 mM- EDTA 250 mM.

Agregar 12.5 ml de Tris-HCl 1M, adicionar 25 ml de EDTA 0.5M y 12.5 ml de agua destilada para completar 50 ml.

Tris-HCl 20mM- SDS 0.1%.

Mezclar 1 ml de tris- HCl 1 M, 0.5 ml de SDS 10%, completar con 48.5 ml de agua destilada.

Buffer de corrida (TANK 1X).

Mezclar 890 ml de agua, 10 ml de SDS 10% y 100 ml de TANK 10X.

Acrilamida 3%.

Pesar 29.2 gramos de acrilamida y 0.8 gramos de bisacrilamida, disolverlos en 40 ml de agua destilada, agregar poco a poco agua destilada suficiente para completar 100 ml, filtrar con papel filtro.

Buffer Tris-HCl pH 8.8.

Pesar 18.165 gramos tris- HCl y 0.4 gramos de SDS, disolver en 60 ml de agua destilada y ajustar pH a 8.8, aforar con agua destilada a 100 ml.

Buffer Tris-HCl pH 6.8.

Pesar 6.055 gramos tris- HCl y 0.4 gramos de SDS, disolver en 60 ml de agua destilada y ajustar pH a 6.8, aforar con agua destilada a 100 ml.

Buffer de carga para proteínas 6X.

Pesar 1.2 gramos de SDS, 0.93 gramos de DTT y 0.6 gramos de azul de bromofenol, mezclar con 4.7 ml de glicerol, 1.2 ml de tris- HCl 0.5 M y 2.1 ml de agua destilada, agitar lentamente hasta disolver perfectamente.

CONGRESOS

Durante la el trabajo fue presentado en el XVIII simposium del Departamento de ciencias de la Salud, UAM, agosto 2013 y en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica, SBS, noviembre 2014

Diseño de nanobiopartículas metálicas para el transporte de antibacteriales específicos para *Streptococcus pneumoniae*

Carrillo-Morales Mariana¹, Ortiz-Benitez Edgar¹, Luna-Bárceñas Gabriel², González-López Marco Antonio¹ Romero-Espejel María Elena^{1,3} y Olivares-Trejo José de Jesús ^{1*}

¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México,

²Unidad de Materiales Querétaro, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

³Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN,

*San Lorenzo 290, Col. Del Valle, C.P. 03100, México, D.F., México. e-mail: olivarestrejo@yahoo.com; Tel: 5554886661 exts. 15316, 15309. Proyecto financiado por el CONACyT con número (SALUD-2012-01-181641).

Streptococcus pneumoniae es el segundo agente causal de neumonía bacteriana. A nivel mundial es responsable de tasas altas de mortalidad en infantes. Esta bacteria infecta principalmente niños jóvenes y adultos mayores. El tratamiento de las enfermedades causadas por este patógeno se basa en el uso de antibióticos; sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos en conjunto con las altas dosis aplicadas, destruyen la flora bacteriana normal. Como consecuencia, en la mayoría de los casos de infección bacteriana se favorece el crecimiento de cepas resistentes a uno o varios antibióticos. Este evento es debido a que no se cuenta con una estrategia que tenga un efecto específico. Por ejemplo, si la infección se encuentra a nivel pulmonar, el tratamiento va a destruir flora bacteriana del aparato digestivo. Por lo tanto, la calidad de vida del paciente se ve grandemente disminuida. Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende diseñar una estrategia que permita destruir a las bacterias patógenas sin afectar las bacterias de la flora normal del paciente. Una alternativa atractiva para este el tratamiento es el uso de nanopartículas (NPs) metálicas (estructuras menores a 100 nm). Las NPs pueden usarse como acarreadores de antibióticos, las cuales pueden viajar por el torrente sanguíneo y llegar a un tejido específico donde destruirán solo a las bacterias patógenas. Preliminarmente las NPs de Fe mostraron ser útiles para este objetivo; cuando se probaron NPs de 20 nm, usando concentraciones de 20,000 µg/mL a 0.05µg/mL no se observó inhibición del crecimiento. Un resultado similar fue observado cuando el tamaño de NP fue incrementado hasta cuatro veces más. Estas NPs de un tamaño superior fueron probados en bacterias Gram negativas (un aislamiento clínico de *Serratia mercenscens* y la cepa tipo *Escherichia coli* ATCC 25922) y en bacterias Gram positivas (cepas tipo de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), en ninguno de los casos se observó una inhibición del crecimiento. Nuestros resultados sugieren que las NPs de Fe son inocuas para las bacterias, por lo que pueden ser un buen candidato para transportar antibióticos en cantidades ínfimas dentro del hospedero y dirigirlos hacia sitios específicos donde se pretende concentrar el antibiótico para atacar solo a las bacterias patógenas. De esta forma se evitará el uso indiscriminado de antibióticos disminuyendo la posibilidad de generar resistencia bacteriana, además se evitará la destrucción de la flora normal. Todo esto conducirá a una mejor calidad de vida para el paciente.

Functionalization of iron nanoparticles (FeNP's) with proteins secreted by *Streptococcus pneumonia*, which bind haem and haemoglobin.

Mariana Carrillo Morales, Edgar Augusto Ortiz Benítez, Alejandra Rodríguez Leviz, Norma Velázquez Guadarrama, Jesús Fandiño Armas y José de Jesús Olivares Trejo.

Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas, Delegación Benito Juárez, San Lorenzo 290, Tel 54886661 Ext. 15309, E-mail: olivarestrejo@yahoo.com. This project was supported by Conacyt (grant number: conacyt-salud-2012-01-181641).

Laboratorio de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

The usage of iron nanoparticles (FeNP's) with magnetic properties, which carrying anticancer drugs, has been a prominent strategy, because their magnetism could be useful to direct the NP's towards a specific tissue. Interestingly, FeNP's do not have a toxic effect over the cells. Therefore, FeNP's can be potential candidates to transport drugs in the human body. In this work, we are interested in functionalizing FeNP's with proteins secreted by a bacterium in order to direct them towards its respective receptor located in *Streptococcus pneumoniae* membrane. We purified proteins secreted by *S. pneumoniae* by affinity-chromatography. One of the proteins was identified by Mass spectrometry as glucose-6-phosphate dehydrogenase (GAPDH). This protein was utilized to functionalize the FeNP's by sonication. The functionalization was demonstrated by quantification of the protein (Bradford method) in the supernatant of NP's after of centrifugation. The FeNP's functionalized with GAPDH were tested in bacterial cultures of *S. pneumoniae*. These results showed that the FeNP's were not toxic for *S. pneumoniae*, therefore, could be used to carrying any antibiotics and directed them towards a specific tissue. These results are the first approach in order to develop a new strategy to eliminate bacteria of the human host, which be specific and with less secondary effects for the patient.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 26 de Enero del 2015, en la Ciudad de México, D. F., para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, a la Químico Farmacobiólogo Mariana Carrillo Morales.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dr. Marco Antonio Gonzales López
