



COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

MAESTÍA EN CIENCIAS GENOMICAS

**“Análisis del efecto de las nanopartículas de oro
en *Streptococcus pneumoniae*”**

T E S I S

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

P R E S E N T A

Biol. Exp. Edgar Augusto Ortiz Benítez

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 27 de enero del 2015, en la ciudad de México D.F. para optar el grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Biólogo Experimental Edgar Augusto Ortiz Benítez.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. Norma Velázquez Guadarrama

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Dr. Marco Antonio Gonzáles López

DEDICATORIA

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy, con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento. Gracias mamá **Sandra**, tíos **Mónica** y **Marco**, primas **Lupe** y **Celia**.

De todo corazón aquella mujer muy especial, **Mariana**, que es mi amiga, mi compañera, mi consejera, mi apoyo, mi guía, mi fuerza en los días difíciles, la que siempre me animo para seguir adelante y no bajar los brazos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante 2 años.

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por darme un espacio y otorgarme el apoyo académico necesario para realizar el Doctorado en Ciencias Genómicas, por lo cual le agradezco profundamente.

A la planta académica del Posgrado en Ciencias Genómicas por ayudarme con sus recomendaciones y orientarme para que mi proyecto llegara a término.

A mi asesor, amigo y guía **Marco**, quien siempre tuvo la paciencia para enseñarme como conducirme en el laboratorio y como se lucha para lograr tus metas.

A mi tutor **Pepe**, que más que un jefe es un amigo, por creer en mí y permitirme sentir el laboratorio como un espacio donde la ciencia se puede desarrollar.

A la **Dra. Norma** y **Juan Carlos**, que me dieron las bases para mi trabajo, tuvieron paciencia y buenos consejos para llevarlo a término.

A mi compañeros de generación, **Cecy, Naye, Lucia, Hugo, Richard, Kenji**, en especial a **Monchis**, quien me ha mostrado que tan grande es la fuerza del corazón.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	6 6
6	
RESUMEN.....	6
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Descubrimiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
2. Bacteriología.....	2
3. Microbiología y estructura del neumococo.....	3
4. Componentes de la superficie de <i>S. pneumoniae</i> y antigenicidad.....	6
4.1. Polisacárido capsular.....	7
4.2. Pared celular.....	7
4.3. Membrana plasmática.....	8
5. Factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i>	8
5.1. Cápsula polisacárida.....	9
5.2. Pared celular.....	9
5.3. Neumolisina.....	10
5.4. Neuraminidasa.....	10
5.5. Hialuronidasa.....	11
5.6. Producción de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	11
6. Epidemiología de las enfermedades causadas por <i>S. pneumoniae</i>	11
7. Tratamiento contra las infecciones de <i>S. pneumoniae</i>	13

8. Estado del arte.....	15
	Pág.
8.1. Historia de la Nanotecnología.....	15
8.2. ¿Qué es la Nanotecnología?.....	16
8.3. Nanomateriales.....	17
8.3.1. Basados en carbono.....	17
8.3.2. Dendrímeros.....	18
8.3.3. Basados en metales.....	18
8.4. Nanopartículas.....	18
9. ANTECEDENTES PARTICULARES.....	20
9.1. Nanopartículas de oro.....	20
9.2. Propiedades bactericidas de las nanopartículas.....	21
II. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO.....	24
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVO.....	25
1. Objetivo general.....	25
2. Objetivos particulares.....	25
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
1. Cepa bacteriana de <i>S. pneumoniae</i>	27
2. Crioconservación de las cepas bacterianas de <i>S. pneumoniae</i>	27
3. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>S. pneumoniae</i>	28
3.1. Tinción Gram.....	28

3.1.	Determinación de la actividad de la catalasa.....	28
		Pág.
3.2.	Determinación de la actividad de la optoquina.....	28
4.	Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP's).....	29
5.	Determinación de la concentración de AuNP's.....	30
6.	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	30
7.	Determinación del tamaño de las AuNP's.....	31
8.	Determinación de la concentración bactericida de las AuNP's.....	32
9.	Obtención de proteínas.....	32
9.1.	Proteínas secretadas.....	32
9.2.	Proteínas de membrana.....	33
10.	Determinación de la concentración de proteínas secretadas y membrana....	34
11.	Preparación de muestras para electroforesis SDS-PAGE.....	34
12.	Geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	35
13.	Tinción de geles con azul de Coomassie G250.....	36
14.	Determinación del pH del medio de cultivo Todd Hewitt con crecimiento bacteriano y tratado con AuNP's.....	37
15.	Análisis de la generación de radicales libres (ROS) del medio de cultivo Todd Hewitt con crecimiento bacteriano y tratado con AuNP's.....	37
VII.	RESULTADOS.....	38
1.	Identificación microscópica de <i>S. pneumoniae</i> mediante tinción de Gram.....	38
2.	Pruebas bioquímicas.....	39
2.1.	Catalasa y optoquina.....	39

3. Síntesis y caracterización de las AuNP's.....	40
4. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	41
5. Determinación del rendimiento de las AuNP's sintetizadas.....	42
6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las AuNP's en <i>S. pneumoniae</i>	44
7. Ensayo de viabilidad de <i>S. pneumoniae</i> con tratamiento de AuNP's.....	46
8. Efecto de las AuNP's en el pH del medio de cultivo Todd Hewitt con crecimiento bacteriano.....	48
9. Producción de ROS en la cepas <i>S. pneumoniae</i> tratadas con AuNP's.....	50
10. Proteínas de membrana de las bacterias tratadas con AuNP's.....	52
11. Proteínas secretadas de las bacterias tratadas con AuNP's.....	56
12. Visualización de las interacciones de las AuNP's en <i>S. pneumoniae</i>	60
VIII. DISCUSIÓN.....	64
IX. CONCLUSIÓN.....	71
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
XI. Apéndices.....	81
1. Publicaciones.....	81
2. Congresos.....	83

ABREVIATURAS

ATCC	Colección de Cultivo Tipo de America
ATP	Adenosina Tri Fosfato
ATPasa	Enzima que hidrolisa el ATP
col.	Colaboradores
D.O.	Densidad Óptica
DNA	Acido dexosirribonucleico
RNA	Acido ribonucleico
DTT	Dietiotreitol
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetraacético
gx	Gravedades
h	Hora
kDa	Kilodaltones
L	Litro
M	Molar
°C	Grados centrígrados.
AuNP's	Nanopartículas de oro
NP's	Nanopartículas
TEM	Microscopia electronica de transmisión
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>
IgA	Inmunoglobulina A
µm	micrómetros
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
min	Minutos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
PS	Polisacárido capsular

<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
Tris-HCL	Tris (Hidroxximetil)-amino-metano Acido
UFC	unidades formadoras de colonia
mg	Miligramo
nM	Nanomolar
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
pH	Potencial de hidrogeno
TEMED	N,N,N',N', tetrametilen-diamina
Tris	Tris (Hidroxximetil)-amino-metano
µg	Microgramo

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Microscopia electrónica de Barrido mostrando la morfología de *S. pneumoniae*.

Figura 2. Estructura los componentes de superficie de *S. pneumoniae*.

Figura 3. Estructura de la pared de *S. Pneumoniae*.

Figura 4. Monitoreo del crecimiento de *S. pneumoniae*.

Figura 5. Prueba de la catalasa en *S. pneumoniae*.

Figura 5. Representación visual de la síntesis de las AuNP's.

Figura 7 Espectro de absorción UV-Visible de la síntesis de AuNP's

Figura 8. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) de las AuNP's sintetizadas.

Figura 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las AuNP's en las cepas de *S. pneumoniae*.

Figura 10. Determinación de la viabilidad.

Figura 11. Efecto de las AuNP's en el pH.

Figura 12. Cuantificación de la producción de ROS en las cepas de *S. pneumoniae* tratadas con AuNP's.

Figura 13. Análisis de la expresión de las proteínas de membrana de la cepa R6 de *S. pneumoniae*.

Figura 14. Análisis de la expresión de las proteínas de membrana de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*.

Figura 15. Análisis de la expresión de las proteínas secretadas de la cepa R6 de *S. pneumoniae*.

Figura 16. Análisis de la expresión de las proteínas secretadas de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*.

Figura 17. TEM de las interacciones de los cuerpos de inclusión con *S. pneumoniae*.

Figura 18. TEM de las interacciones de los cuerpos de inclusión con *S. pneumoniae*.

Figura 19. Modelo propuesto de interacción de las AuNP's con las bacterias.

Figura 20. Modelo propuesto para la formación de un posible poro.

Figura 21. Formación de los cuerpos de inclusión de nanopartículas.

Tabla 1. Mezcla de reactivos para preparar un gel concentrador al 12%.

Tabla 2. Mezcla de reactivos para preparar un gel separador al 12%.

Tabla 3. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas de membrana de *S. pneumoniae* R6.

Tabla 4. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas de membrana de *S. pneumoniae* TIGR4

Tabla 5. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas secretadas de *S. pneumoniae* R6.

Tabla 6. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas secretadas de *S. pneumoniae* TIGR4.

Tabla 7. Promedio de los cuerpos de inclusión presentes en las bacterias.

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es una bacteria Gram positiva en forma de cocos. Este patógeno es causal de otitis media, sinusitis o infecciones más graves como la neumonía, meningitis o incluso septicemia, lo que resulta letal en muchas ocasiones para los niños y ancianos. El principal tratamiento se basa en antibióticos como betalactámicos, trimetoprim-sulfametoxazol, o inclusive en algunos casos es necesario dar antibióticos de tercera generación como vancomicina. Con el uso excesivo de antibióticos para su tratamiento, se ha generado resistencia a estos, y aún peor multi-resistencia, por lo que es imperativo desarrollar nuevas alternativas del tratamiento. Uno de ellos podría ser el uso de nanopartículas de oro (AuNP's).

Las AuNP's se han probado en cepas de laboratorio no patógenas, y han mostrado ser una buena alternativa si se utiliza como un agente antibacteriano. En el caso de *S. pneumoniae*, una bacteria encapsulada, no ha sido probado el efecto de las AuNP's. En este trabajo, el efecto antibacteriano de AuNP's se demostró en dos cepas de *S. pneumoniae*: TIGR 4 (de tipo salvaje) y R6 (un mutante, sin cápsula). Hemos observado que las AuNP's inhiben el crecimiento bacteriano y la viabilidad en ambas cepas. Una hipótesis propuesta para explicar el efecto antibacteriano de las AuNP's, es por la modificaciones en el pH o la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS). En el caso de las cepas de *S. pneumoniae*, la presencia de AuNP's en el medio de cultivo Todd Hewitt se acidificó por alrededor de una unidad de pH. Curiosamente, la producción de ROS no mostro un incremento. Finalmente, se intentó explicar el mecanismo molecular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), donde se observó que las AuNP's entraron en ambas cepas con o sin cápsula, donde se agruparon en un lugar particular de la bacteria y formando lo que denominamos “cuerpo de inclusión”. Probablemente los cuerpos de inclusión, es el principal promotor de la lisis bacteriana. Nuestros resultados generales muestran el primer enfoque con el fin de explicar el mecanismo por el cual el AuNP's generan la lisis bacteriana y es una nueva alternativa en las infecciones causadas por *S. pneumoniae*.

I. Introducción

1. Descubrimiento de *Streptococcus pneumoniae*

En 1880 Pasteur le dio su primer nombre como *Microbe septicémique du salive*, Sternberg en 1881 lo denominó *Micrococcus pasteurii*. Ambos lograron identificar de forma independiente un microorganismo el cual sería denominado *Streptococcus pneumoniae*. En 1882, Fienlander describió la morfología de las colonias, así como la presencia de su capsula. Para 1890, se reconocía al *S. pneumoniae* como la bacteria más frecuente asociada a neumonía y meningitis. Fue en 1974, en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey cuando recibió el nombre de *Streptococcus pneumoniae* debido a la turbidez que presenta en un crecimiento en un medio líquido Todd Hewitt (Pasteur y col.; 1881, Sternberg y col.; 1885, Musher y col.; 1995).

Adicionalmente, *S. pneumoniae* desempeñó un papel en el descubrimiento de la molécula de ADN. Los experimentos de Griffith en 1920, demostraron que al inyectar ratones con neumococos sin cápsula (mutantes) junto con neumococos encapsulados pero muertos, daba lugar a la aparición de nuevos organismos vivos y encapsulados. A este fenómeno lo denominó transformación. Este fenómeno permaneció sin explicación hasta que en los años 40, Avery, MacLeod y McCarty, explicaron que estos mutantes recuperaban la capacidad de producir la cápsula por transferencia de ADN (Avery y col.; 1944).

2. Bacteriología

S. pneumoniae pertenece al género *Streptococcus*, de la familia *Streptococcaceae*. Es una bacteria lanceolada, con crecimiento en diplococos, con tamaño de 1.2-2 μm de diámetro, inmóvil, no esporulada, típicamente Gram positivo y anaerobio facultativo, presenta una cápsula de glicoproteínas que rodea la célula (Figura 1) (Musher; 1995, Hardie; 1986, Deibel; 1974).

Para su óptimo crecimiento, se requiere sembrarlos en placas de agar sangre, con una temperatura de 37 °C y una concentración de CO₂ entre 5 y 10%. En estas condiciones presenta una alfa hemólisis y forma colonias pequeñas, húmedas, translúcidas y granulares con bordes bien definidos (Rotta; 1986).

Para su identificación en el laboratorio se puede ver que es soluble en bilis, resistente a la optoquina y sensible a variaciones de pH con un crecimiento a 7.8 con límites de entre 7.5 - 8.5 (Rotta; 1986).

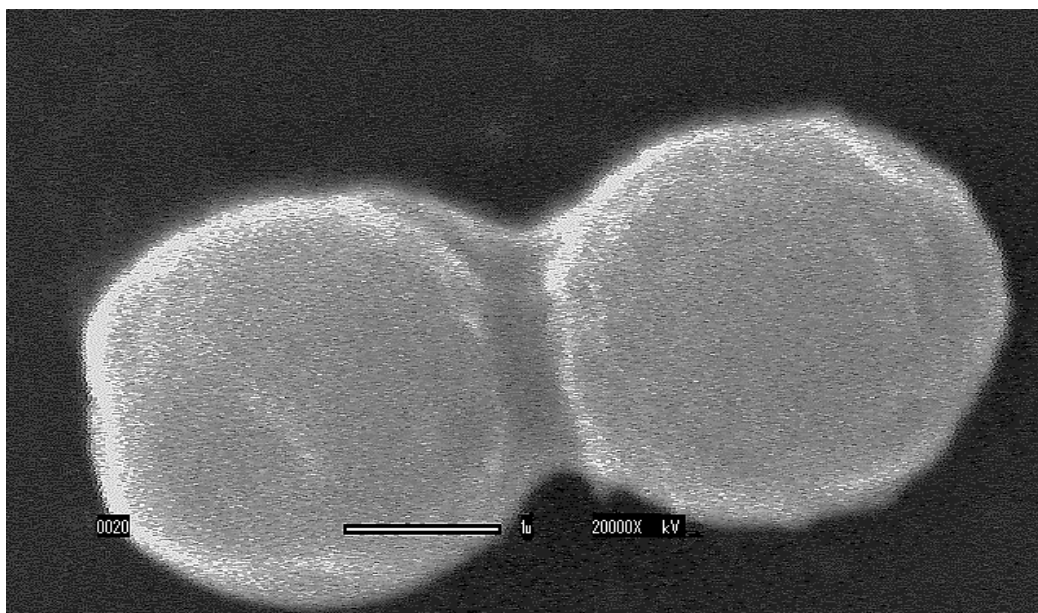


Figura 1. Microscopia electrónica de Barrido mostrando la morfología de *S. pneumoniae*. La microscopia muestra la estructura clásica en diplococos, con un tamaño de 1.8-2 μm de diámetro. Imagen tomada por Carrillo en 2014.

3. Microbiología y estructura del neumococo

S. pneumoniae presenta la estructura clásica de una bacteria Gram positiva, con una membrana plasmática compuesta de La membrana plasmática está compuesta por una doble capa de fosfolípidos, por proteínas unidas no covalentemente a esa bicapa, y glúcidos unidos covalentemente a los lípidos o a las proteínas. Una pared celular formada por peptidoglicanos y una cápsula formada de glicoproteínas.

La membrana plasmática es una bicapa lipídica, compuesta principalmente por fosfatidilglicerol, cardiolipina, y una gran cantidad de glucosildiglicérido y galactosilglucosildiglicérido (Trombe y col., 1979).

La pared de *S. pneumoniae* está compuesta por subunidades de peptidoglicanos constituidas por unidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico que se entrelazan por puentes peptídicos (Figura 2) (Coffey y col., 1998). Un componente abundante de la pared es el ácido teicoico, rico en galactosamina, fosfato y colina; esta última sustancia es exclusiva de *S. pneumoniae* la cual cumple una función reguladora en la hidrólisis de la pared. El ácido teicoico se dispone en dos formas en la pared celular, una expuesta en la superficie, conocido como sustancia C; la cual es la responsable de la activación de la vía del complemento y la fagocitosis de la bacteria, y otra forma unida en forma covalente a los lípidos de la membrana citoplasmática (Figura 2) (Henrichsen y col., 1995; Trombe y col., 1979).

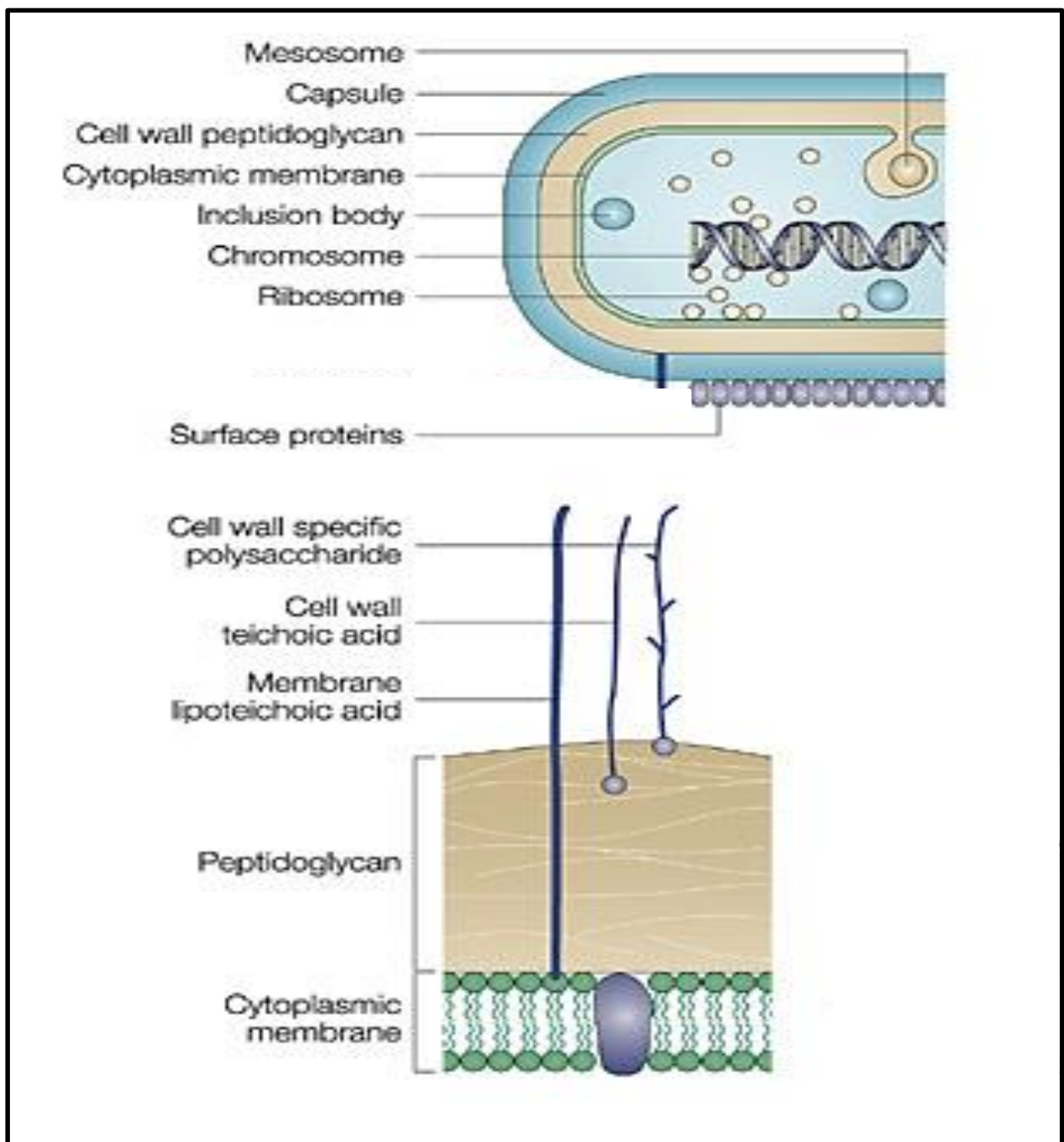


Figura 2. Estructura los componentes de superficie de *S. pneumoniae*. Representación de las estructuras presentes en *S. pneumoniae*, donde se destacan la presencia de membrana, pared y capsula. Imagen tomada de Nature Reviews.

La presencia de cápsula una de las característica más destacadas de esta bacteria, es de naturaleza polisacárida, presentando algunas variaciones en sus secuencias, con las cuales se han identificado 92 serotipos de cápsulas diferentes (Weinberger y col., 2011).

La presencia de los polisacáridos capsulares se ha relacionado con la virulencia de *S. pneumoniae*, las cepas capsuladas o lisas son virulentas para los humanos, mientras que las cepas no capsuladas o rugosas no lo son (Dámaso y col., 1984). Para ayudar a la búsqueda de nuevas terapias, la secuenciación del ADN genómico de algunos de estos serotipos, han ayudado a entender y generar mecanismos de tratamiento más eficientes. Entre las cepas que se han tomado para su estudio en el laboratorio se encuentran las cepas de *S. pneumoniae* R6 y TIGR4.

La cepa de *S. pneumoniae* R6 se obtuvo de un aislado clínico obtenido por Avery y col., para demostrar la función genética de ADN (Avery y col., 1944), y es utilizada en todo el mundo como una cepa de laboratorio, debido a su avirulencia por la ausencia de una capsula polisacarida, la cual la hace una cepa segura con la cual trabajar.

La cepa de *S. pneumoniae* R6, se obtuvo de una muestra clínica tomada por Alexander Tomasz (Instituto Rockefeller, Nueva York, Nueva York), presenta múltiples interrupciones en el locus capsular tipo 2 heredado de la cepa D39 (Iannelli y col., 1999). El aislado de secuenciado de *S. pneumoniae* R6 está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo con el número de referencia ATCC BAA-255.

Hablando de su genoma, *S. pneumoniae* R6 presenta un cromosoma circular de 2 038 615 pb (40% de contenido de G+C), conteniendo 2043 genes que codifican para proteínas y 73 genes de ARN, que incluyen cuatro operones rRNA. La avirulencia de esta cepa es debido a la delección de 7 genes completos y el extremo 3' de *cps2A* y el extremo 5' de *cps2H*, las cual codifican los genes de la cápsula (Hoskins y col., 2001).

La cepa *S. pneumoniae* TIGR4 se aisló de la sangre de un paciente varón de 30 años de edad en Kongsvinger, Noruega, y es altamente invasiva y virulenta, debido a la presencia de la capsula. La cepa TIGR4 posee un cromosoma circular de 2 160

842 pb (37% de contenido G+C), conteniendo 2,105 genes que codifican proteínas y 70 genes de ARN. Contiene seis operones de ARNr, 58 de ARNt, 3 RNAs estructurales y una ARN ribonucleasa P (Tettelin y col., 2001). Presenta una cápsula de polisacáridos, lo que impide la fagocitosis por el sistema inmune del huésped haciendo de esta cepa hasta 10^5 veces más virulentos que las cepas no encapsuladas tales como R6 (Tettelin y col., 2001).

4. Componentes de la superficie de *S. pneumoniae* y antigenicidad

Los principales componentes de la superficie del *S. pneumoniae* son: la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula (Figura 3). La pared celular consiste de un esqueleto de peptido-glicano, aquí es donde se anclan el polisacárido capsular (PS), el polisacárido C de la pared celular y las proteínas (OPS; 2004).

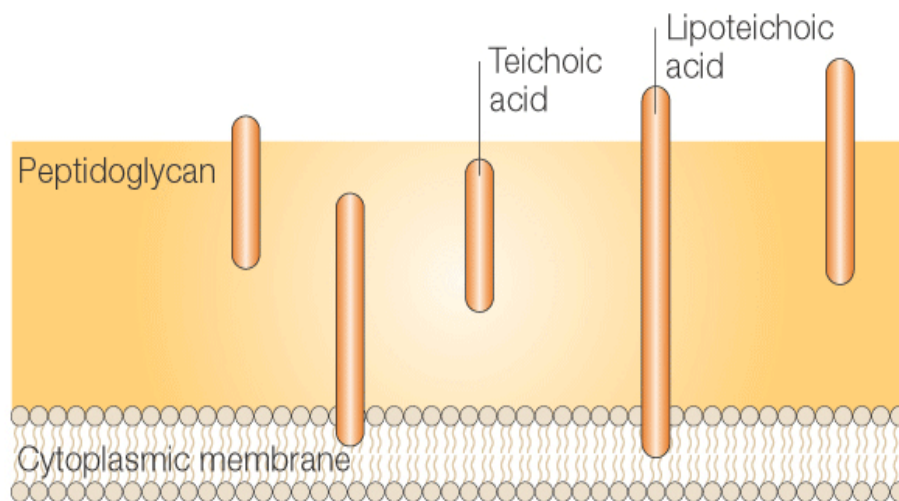


Figura 3. Estructura de la pared de *S. Pneumoniae*. La pared de *S. Pneumoniae* se compone de peptidoglicanos se encuentra en la capa exterior de la membrana citoplasmática. El ácidos teicoico está unido y anclado en los peptidoglicanos de la pared y ácidos lipoteicoicos, extendiéndose hasta la membrana citoplasmática. Imagen tomada de Nature Reviews.

4.1. Polisacárido capsular (PS)

El PS es el principal componente antigénico de *S. pneumoniae* y es el responsable de la evasión del sistema inmune (Gómez-Barreto y col., 1999).

Tiene una carga negativa y presenta componentes ácidos como el D-glucurónico, uniones fosfodiéster con fosforilcolina, piruvatos y grupos con azúcares neutros. El PS consiste en polímeros de alto peso molecular conformados por unidades repetitivas de oligosacáridos, ligados por enlaces covalentes a la pared celular y es considerada el principal factor de virulencia de esta bacteria, debido a su resistencia a la fagocitosis (OPS; 2004).

La estructura de los polisacáridos capsulares, dan origen a los diferentes serotipos del género *Streptococcus*, siendo el serotipo tipo 2 para *S. pneumoniae* R6, el cual está compuesto de D-glucosa (Glc) (3 partes) y L-ramnosa (Rha) (3 partes) y está compuesto de unidades repetidas de hexasacáridos (Henrichsen y col., 2001). Y para *S. pneumoniae* TIGR4, el serotipo tipo 4, presentando D-galactosa (Gal) (1 parte), 2-acetamido-2,6-dideoxigalactosa (FucNAc) (1 parte), 2-acetoamido-2-deoxi-D-galactosa (GalNAc) (1parte), 2-acetamido-2-deoximanosa (ManNAc) (1 parte) y ácido pirúvico (Jansson y col., 2001).

4.2. Pared celular

El polisacárido de la pared, denominado también polisacárido C (C-PS) es un complejo de ácido teicoico y está ligado covalentemente al peptido-

glucano a través de residuos de ácido murámico. El C-PS puede activar el sistema del complemento por la vía alterna (OPS; 2004).

4.3. Membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica donde se localizan distintas proteínas, como son las proteínas de unión a penicilina o PBPs. Estas proteínas son dianas de los antibióticos β -lactámicos, estando implicadas en las etapas finales de la síntesis de peptidoglicano. En *S. pneumoniae*, la membrana plasmática está compuesta principalmente por fosfatidilglicerol, cardiolipina, y una gran cantidad de glucosildiglicérido y galactosilglucosildiglicérido (Trombe y col., 1979).

5. Factores de virulencia

La virulencia de *S. pneumoniae* se atribuye a sus diferentes estructuras, principalmente a las de la superficie. Algunos de los factores de virulencia tales como la cápsula y las proteínas de superficie determinan la resistencia a la fagocitosis por los polimorfonucleares, lo que permite un mecanismo de escape eficiente de las defensas del hospedero (Li y col., 2013).

5.1. Cápsula polisacárida

Es el principal componente de la patogenicidad y la evasión del sistema inmune, bloqueando la actividad opsonizante de la vía alternativa del complemento. Está compuesta principalmente por polisacáridos cargados negativamente que rodean la bacteria y se mantienen unidos a la superficie mediante enlaces covalentes. La virulencia de *S. pneumoniae* varía entre los serotipos, depende de la composición química y de la cantidad de PS producido. Estas diferencias determinan la supervivencia de la bacteria en la circulación y las posibilidades de ocasionar enfermedad, relacionada con la activación del complemento y su depósito en la cápsula, resistencia a la fagocitosis y capacidad para inducir anticuerpos (Bentley y col., 2006; Li y col., 2013).

5.2. Pared celular

La pared celular de *S. pneumoniae* es una estructura rígida que rodea la membrana citoplasmática y está constituida por peptidoglicanos. Asociados a éste se encuentran los ácidos lipoteicoicos que actúan como mediadores de la adherencia a las células epiteliales de la mucosa. En la pared celular también se encuentran los determinantes antigénicos de grupo, el polisacárido C, constituido por ácido teicoico unido covalentemente al peptidoglicano de la pared celular en su parte externa y un antígeno en la parte externa (Preado 2001; Gomez y col., 2001).

5.3. Neumolisina

Se encuentra en el citoplasma y es liberada debido a la acción de la autolisina. Interviene en los mecanismos de patogenicidad evadiendo los sistemas de defensa del huésped. Se liga a la membrana celular del hospedero por medio de receptores de colesterol, donde se polimeriza hasta formar canales transmembranales que anteceden a la lisis a través de la formación de poros.

También inhibe la respuesta proliferativa de los linfocitos y activa el complemento por la vía alternativa, lo cual indica que es parte importante de la capacidad invasiva y de la virulencia del *S. pneumoniae* (Gómez-Barreto y col., 1999; Obaro y col., 1996).

5.4. Neuraminidasa

Está asociada con la pared celular, hidroliza el ácido siálico terminal de las glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos presentes en la superficie de las células y en fluidos corporales del hospedero. Esta separación facilita la adhesión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero.

Esta proteína hidroliza las glucoproteínas y los glicolípidos celulares y por lo tanto tiene un papel importante en la diseminación y multiplicación de *S. pneumoniae* en los tejidos infectados (Obaro y col., 1996; Preado 2001).

5.5. Hialuronidasa

Es una proteína de superficie la cual es esencial para que *S. pneumoniae*, debido a que facilita la diseminación e invasión tisular mediante la degradación del componente ácido hialurónico de la matriz extracelular de las células. Igualmente esta proteína altera la permeabilidad tisular en las heridas infectadas, en la neumonía, en la septicemia, bacteremia y meningitis (Cockeran y col., 2005).

5.6. Producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Estudios recientes realizados en animales, han sugerido que existe acción tóxica oxidante del H₂O₂ producido por las enzimas NADH oxidasa y piruvato oxidasa (SpxB) de *S. pneumoniae* sobre las células epiteliales del hospedero el cual está implicado en la respuesta inflamatoria (Preado; 2001, OPS; 2004).

6. EPIDEMIOLOGIA DE LAS ENFERMEDADES CAUSADAS POR *S. PNEUMONIAE*

El nicho ecológico de *S. pneumoniae* es la nasofaringe, su presencia como colonizador del tracto respiratorio superior, varía entre el 5% y más del 70% de personas sanas (Greenberg; 2009), siendo los niños (menores de 6 años) y personas de la tercera edad (mayores de 65 años), las que presentan un mayor riesgo de infección (Mufson; 1990, Ericibengoa y col., 2012).

En países en vías de desarrollo, es el agente etiológico más frecuente de infecciones respiratorias bajas, y se calcula que cada año se producen aproximadamente 1 200 000 muertes asociadas a infecciones respiratorias bajas neumocócicas y alrededor de 140 000 causadas por meningitis en niños menores de 5 años (Washington y col., 2011).

A su vez, el *S. pneumoniae* es la causa más importante de otitis media aguda (OMA) en todo el mundo (30-50% de los casos).

Las infecciones de las vías respiratorias bajas (neumonía), tracto respiratorio superior (sinusitis), y canal auditivo (otitis media) constituyen la gran mayoría de infecciones causadas por *S. pneumoniae* (Sternberg; 1985).

Aunque la enfermedad neumocócica severa (neumonía necrotizante, meningitis y bacteremia) constituye un pequeño grupo de enfermedades, estas infecciones invasoras son responsables de la mayor mortalidad relacionada con *S. pneumoniae* (Liñares y col., 1989).

La neumonía neumocócica es responsable de 10 a 25% de todas las neumonías, estimándose una tasa de mortalidad mundial de más de 1 millón de decesos anuales en niños menores de 5 años (OMS 2014).

La vía de transmisión del *S. pneumoniae* es aérea, a través de gotitas de saliva de portadores o de enfermos. Es un organismo sensible al calor, al frío y a la desecación, por lo tanto la transmisión requiere de un contacto estrecho de persona a persona.

Los serotipos más frecuentes son 6, 14, 19 y 23, los cuales son los más comunes en la mayoría de los continentes, aunque para los países del cono sur de Latinoamérica se describe una alta proporción del serotipo 5, como también de los serotipos 1 y 18 (OPS; 2014).

7. Tratamiento contra las infecciones de *S. pneumoniae*

De manera natural, el ser humano presenta mecanismos de resistencia y combate a los microorganismos que son capaces de provocar una infección en él, la protección contra infecciones por *S. pneumoniae*, está mediada por fagocitosis opsonina-dependiente, el cual activa la vía clásica del complemento, y se cree que es el principal mecanismo inmune que protege al huésped contra las infecciones neumocócicas. El mecanismo depende de la interacción de anticuerpos específicos (IgA, IgM, IgG), y de los neutrófilos o células fagocíticas de pulmón, hígado y bazo (Bogaert y col., 2004).

El tratamiento de las infecciones por *S. pneumoniae* se complica, debido a que es precedida por la colonización asintomática, que es especialmente alta en los niños y adultos mayores. La vacuna conjugada heptavalente actual, es altamente eficaz contra la enfermedad invasiva causada por los serotipos 4, 9V, 14, 18C, 19F y 23F, sin embargo, sigue teniendo una cobertura muy limitada para los demás serotipos; por lo tanto, la búsqueda de nuevos tratamientos para combatir las infecciones que provoca *S. pneumoniae* es importante (Bogaert y col., 2004).

La penicilina ha sido el principal tratamiento contra infecciones neumocócicas, debido a su actividad bactericida y a las bajas concentraciones mínimas inhibitorias ($MIC \leq 0.01 \mu\text{g/ml}$) que presentan la mayoría de las cepas. Sin embargo, en 1967 se describió en Australia, el primer caso de *S. pneumoniae* con resistencia intermedia o moderada a la penicilina (MIC entre 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$); posteriormente, en Nueva Guinea, se detectan cepas con este tipo de resistencia. Diez años después, se describe en Sudáfrica un brote epidémico causado por cepas con resistencia elevada a la penicilina ($MIC \geq 2 \mu\text{g/ml}$) con una elevada mortalidad entre los pacientes con infecciones neumocócicas. Basándose en estos, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), considera sensibles a la penicilina las cepas con $MIC \leq 0.06 \mu\text{g/ml}$, con resistencia intermedia o moderada

aquellas cuyas MIC están comprendidas entre 0.12 y 1 µg/ml y como resistentes las cepas con MIC $\geq$ 2 µg/ml (Agudelo; 2013).

La resistencia a la penicilina por *S. pneumoniae*, presentan en mayor o menor grado, resistencia cruzada con todos los antibióticos betalactámicos. Sin embargo, la actividad *in vitro* varía de unos compuestos a otros. Las aminopenicilinas, como la amoxicilina, ampicilina y cefuroxima, que son cefalosporinas de segunda generación, presentan una actividad similar o ligeramente inferior a la de la penicilina. La menor actividad corresponde a las cefalosporinas de primera generación, como la cefalotina, y a las cefalosporinas orales de segunda y tercera generación (cefaclor, cefadroxilo, cefprozilo, cefixima, etc.). Las cefalosporinas de cuarta generación, como la cefpiroma y la cefepima, presentan una actividad similar a la cefotaxima o la ceftriaxona, mientras que los carbapenemes como el imipenem y el meropenem suelen tener MIC de 2 a 4 veces más bajas a las de la penicilina (Jorgensen y col., 1994; Pallarés y col., 1995).

El mecanismo de resistencia a la penicilina y al resto de los antibióticos betalactámicos se debe únicamente a alteraciones en las proteínas fijadoras de la penicilina [Penicillin Binding Proteins (PBP)]. Dichas alteraciones condicionan una disminución de la afinidad de las PBP por la penicilina, y por lo tanto una menor actividad de estos antibióticos (Dessen y col., 2001; Hakenbeck y col., 2012).

Debido a la creciente resistencia ante los antibióticos por parte de *S. pneumoniae*, la aplicación de nuevas terapias para controlar la infección es necesaria. Actualmente la nanotecnología, ofrece una herramienta prometedora para combatir la infección causada por *S. pneumoniae*.

8. ESTADO DEL ARTE

8.1. Historia de la Nanotecnología

En 1959 Richard Feynman (premio Nobel de Física en 1965), fue el primero en sugerir la posibilidad de construir materiales y dispositivos a escala atómica y molecular. En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer inventaron el Scanning Tunnel Microscope (STM que permite ver la imagen de los átomos). Este instrumento constituyó un punto de inflexión en la investigación y manipulación de átomos. En 1984, Richard Smalley, Robert Curl y Harold Kroto descubrieron la existencia de un tipo de molécula de carbono hasta entonces desconocida (sólo se conocían tres tipos: diamante, grafito y amorfo). Esta molécula, que llamaron fullereno (buckyball, se compone de 60 átomos de carbón), es esencial para el desarrollo de la nanotecnología al mostrar las propiedades de los fullerenos, como la de ser súper conductivos, altamente estables, capaces de soportar altas temperaturas y presión (Ikezawa; 2001, Sargent; 2014).

Posteriormente, en 1991, Sumio Iijima descubrió los nanotubos de carbono, que consiguió reproducir artificialmente en 1993; y que también presentan propiedades novedosas asociadas a su escala. Al cambiar su diámetro, por ejemplo, cambia su conductividad eléctrica, de manera que pueden comportarse como metal, como semiconductor o como superconductor (Sumio; 1999).

Para finales de 1999 y principios de 2000, los primeros productos hechos para consumo humano que son creados utilizando la nanotecnología comienzan a aparecer en el mercado, como son los parachoques automotrices, pelotas de golf, raquetas de tenis, bates de béisbol con una mejor flexibilidad, calcetines antibacterianos, protectores solares, ropa libre de arrugas y resistente a las manchas, cosméticos, revestimientos

de vidrio resistente a los arañazos, baterías, pantallas para televisores, teléfonos celulares y cámaras digitales, etc. (Invernizzi y col., 2005).

Hoy en día, la nanotecnología es una de las áreas de mayor crecimiento de la ciencia y la tecnología, su crecimiento y aplicaciones siguen aumentando de forma exponencial.

8.2. ¿Qué es la Nanotecnología?

La nanotecnología es la ciencia que se encarga del estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación, aplicación, explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nano escala, es decir, a escala de átomos y moléculas, que es alrededor de 1 a 100 nanómetros. En su sentido original, "nanotecnología" se refiere a la capacidad de construir elementos *de abajo hacia arriba* (<http://crnano.org/whatis.htm>). A esa escala, la materia puede cambiar sus propiedades físicas y químicas, por ejemplo el color, la conductividad eléctrica, la resistencia. La Nanotecnología es una ciencia fuertemente interdisciplinaria, que involucra entre otras, a la física, la química, la biología, la medicina y la ingeniería (Tomalia; 2009, Royal Society; 2004).

Dentro de la medicina, la nanotecnología está siendo utilizada como la base para los nuevos sistemas de liberación de fármacos, más eficaces y se encuentra en fase de desarrollo inicial como andamios en la investigación de la regeneración nerviosa, todo esto gracias a la participación y creación de los nanomateriales (Rieux y col., 2006; Clavijo y col., 2007).

8.3. Nanomateriales

Los nanomateriales son materiales con propiedades morfológicas más pequeñas que un micrómetro en al menos una dimensión. A pesar del hecho de que no hay consenso sobre el tamaño mínimo o máximo de un nanomaterial, algunos autores restringen su tamaño de 1 a 100 nm, una definición lógica situaría la nanoescala entre la microescala (1 micrómetro) y la escala atómica/molecular (alrededor de 0.2 nanómetros) (Nuñez y col., 2012).

Muchas de las propiedades de los materiales dependen de cómo se comporten -sus electrones en su entorno o de cómo estén ordenados los átomos en la materia. En un material nanométrico, el movimiento de los electrones está muy limitado por las dimensiones del propio material. Además la proporción de átomos en la superficie con respecto al interior es con mucho, más alta que en materiales de tamaño más elevado. Por consiguiente, si se reducen las dimensiones de un material, se modifican sus propiedades y en consecuencia se pueden diseñar materiales con propiedades a la carta (Lechuga; 2011).

La Agencia del Medio Ambiente (EPA) de EUA ha clasificado los nanomateriales actuales en cuatro tipos, a saber:

8.3.1. Basados en carbono

Estos nanomateriales están compuestos mayoritariamente por carbono y suelen adoptar formas como esferas huecas, elipsoides o tubos. Los nanomateriales de carbono con forma elipsoidal o esférica se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos reciben el nombre de nanotubos. Estas partículas tienen muchas aplicaciones, incluido el desarrollo de recubrimientos y películas mejoradas,

materiales más ligeros y resistentes y diversas aplicaciones en el campo de la electrónica (Petros y col., 2010).

8.3.2. Dendrímeros

Estos nanomateriales son polímeros de tamaño nanométrico contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie de un dendrímero tiene numerosos extremos de cadena, que se pueden adaptar para desempeñar funciones químicas específicas. Esta propiedad se podría utilizar también para la catálisis. Además, debido a que los dendrímeros tridimensionales contienen cavidades interiores en las que se pueden introducir otras moléculas, pueden ser útiles para la administración de fármacos (Petros y col., 2010).

8.3.3. Basados en metales

Estos nanomateriales incluyen puntos cuánticos, nanopartículas de oro, plata, hierro y óxidos metálicos como el dióxido de titanio (Petros y col., 2010).

8.4. Nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas sólidas (NP's), son partículas de menos de 100 μm de diámetro, las que se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. El desarrollo de NP's se ha convertido en un área de investigación importante, ya que por su tamaño, tienen la capacidad de atravesar a los sitios de infección (Llabot y col., 2008).

La nanotecnología ofrece materiales que presentan características estructurales entre los de los átomos con una dimensión en el rango nano. En el grupo de los nanomateriales, destacan los nanotubos de carbono, nanocristales fluorescentes, sílice nanoporoso, dendrímeros, liposomas, grafenos y las nanopartículas; los cuales ya son aplicados en muchos campos de la vida humana. La aplicación creciente de los nanomateriales en las biociencias, es debido a sus propiedades únicas; y es por estas propiedades que se han planteado como portadores para algunas sustancias activas, como en la administración de fármacos. Las NP's se pueden presentar en diferentes formas, tales como esferas, plaquetas, nanovarillas, discos hexagonales en forma de P, o en forma de U, nanoflores y nanobares (Moritz y col., 2013, Kruszynska y col., 2010; Chen y col., 2010).

Recientemente, la síntesis de NP's a base de metales de óxido, plata, oro, cobre, óxido de cobre, óxido de zinc y magnetita, se han aplicado también en la medicina, odontología, farmacia y biología (Llabot y col., 2008).

Con el aumento de las infecciones bacterianas, se ha planteado la creación de nuevos agentes antibacterianos y de gran alcance, en particular, las NP's. Las cuales ha sido posible aplicarlas en la conservación de alimentos, vendajes para quemaduras, cosméticos, productos sanitarios, tratamiento del agua, entre otros (Kokura y col., 2010; Llabot y col., 2008).

9. ANTECEDENTES PARTICULARES

9.1. Nanopartículas de oro (AuNP's)

Las NP's de metales nobles y, más específicamente, las nanopartículas de oro (NP's Au), tienen excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que destacan especialmente sus peculiares e inesperadas propiedades fototérmicas, por las que al ser activadas en presencia de luz láser, desprenden calor. Las NP's Au pueden ser producidas con distintos tamaños, formas y ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético), por esto, las NP's Au despiertan un gran interés en el campo de la biomedicina (Patra y col., 2010).

Las NP's Au presentan un extraordinario potencial como agentes fototerapéuticos, elaboración de nanoestructuras útiles para el transporte, en la vectorización selectiva de fármacos y macromoléculas terapéuticas y en terapia génica (vehiculización de plásmidos, DNA, RNA). También destaca la utilidad de las NP's Au en la elaboración de sistemas transportadores inteligentes, que permiten controlar en el espacio y en el tiempo la liberación del compuesto terapéutico asociado, ya que ésta es desencadenada por un estímulo biológico interno (por ejemplo una variación en la concentración de glutatión entre el exterior y el interior de la célula) o por activación de un estímulo externo (por ejemplo luz láser) (Patra y col., 2010).

Las NP's Au presentan, en principio, una baja toxicidad y unas propiedades peculiares las cuales pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nano-sistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas. Las NP's Au presentan una baja toxicidad y elevada biocompatibilidad, al igual que mostraron que los núcleos de oro de las NP's son inertes y no-tóxicos.

Sin embargo, en la bibliografía reciente existen discrepancias acerca de su citotoxicidad, que podrían guardar relación con los diferentes tamaños y formas de las NP's Au investigadas así como con los distintos agentes empleados para su estabilización y funcionalización, los cuales otorgan a las NP's Au características superficiales distintas (Patra y col., 2010).

En un estudio que tuvo por objeto determinar la citotoxicidad e inmunogenicidad de las NP's Au frente a células macrofágicas RAW264.7, se observó que las NP's Au no son tóxicas y no dan lugar a la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL1- β , siendo además, internalizadas por los cuerpos lisosomales dispuestos en forma perinuclear. Estos resultados subrayan las propiedades no citotóxicas y no inmunogénicas de las NP's Au y su biocompatibilidad, corroborando su excelente potencial en nanoinmunología, nanobiotecnología y nanomedicina (Pan y col., 2007; Patra y col., 2010).

9.2. Propiedades bactericidas de las NP's

Se ha visto que una aplicación de las NP's, son como agente bactericida, esto es debido a las observaciones que se pudieron ver en experimentos en bacterias Gram negativa como *E. coli*, *Vibrio cholera* y *P. aeruginosa*; y Gram positiva como *B. subtilis* y *S. aureus*. Este efecto, depende de su tamaño, forma, distribución, morfología, funcionalización y su estabilidad. Las NP's antibacterianas pueden estar compuestas de metales, óxidos de metal, sales de metales, hidróxidos de metales, nanotransportadores orgánicos cargados con agentes antibacterianos, materiales híbridos y polímeros (Moritz y col., 2013; Jadhav y col., 2011).

Se ha sugerido que la actividad antibacteriana de las NP's, pueden dar lugar a daño en la pared celular bacteriana o de la membrana desestabilizándolas, o ser responsable de los cambios perjudiciales en

los orgánulos bacterianos, como pérdida de su morfología o función. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunos de estos mecanismos son especulativos y la necesidad de un examen más detenido a fondo (Moritz y col., 2013).

Los mecanismos por los cuales las NP's presentan su propiedad antibacteriana, se discuten con frecuencia, pero se han centrado en las AgNP's, las cuales son internalizadas por las células bacterias, ya que son capaces de penetrar en la pared celular bacteriana. Lee y col., (2010), indicó que la eficacia antibacteriana de AgNP's depende del grado de agregación entre las NP's en una solución acuosa; debido a que se pueden transportar más eficientemente a la pared celular de las bacterias al formar conglomerados. Por el contrario, Marius y col., (2011) describe un mayor efecto antibacteriano de las AgNP's afirmando que el principal mecanismo responsable de este efecto, es probablemente la formación de racimos y NP's de anclaje a la superficie de la célula bacteriana.

En los estudios realizados por Gottesman y col. (2011) las propiedades antimicrobianas de las AgNP's, fueron atribuidas a la oxidación parcial de plata y su liberación lenta, la cual interactúa con la membrana de la célula bacteriana. La exposición de las células bacterianas a los iones de plata induce cambios en la membrana celular, que conducen a una mayor permeabilidad y daño a la bacteria. Por otra parte, las AgNP's pueden inducir la disfunción mitocondrial y aberraciones cromosómicas, y la presencia de Ag puede interrumpir la replicación del ADN bacteriano.

Por otra parte, las NP's también pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que inducen a la peroxidación de lípidos de membrana. Este supuesto también se confirmó en 2013 por Liu y col., en el trabajo que describe la aplicación de STEM-EELS, para estimar cuantitativamente la composición elemental de las células bacterianas dañadas después de la exposición a las AgNP's.

Dong y col. (2010) investigaron sobre los posibles mecanismos de citotoxicidad de NP's de hidróxido de magnesio, proponiendo dos posibles mecanismos para su toxicidad. Uno de ellos es debido a la penetración directa de las NP's en la pared celular que conduce a daños en la membrana y la muerte celular. El segundo mecanismo implica la absorción de agua en la superficie de las NP's de la formación de una delgada capa de agua alrededor de las NP's a pH alto. En contacto con las bacterias, su membrana se puede dañar debido a la alta concentración de iones de hidróxido. Referente a la citotoxicidad de las AuNP's no se sabe el mecanismo por el cual cumple esta función, pero se cree, que es parecida al mecanismo de las AgNP's.

Recientemente Cui y col., (2012), han propuesto dos mecanismos por los cuales las AuNP's pueden ejercer su efecto bactericida en *E. coli*, una es para colapsar las actividades potenciales de membrana, inhibiendo la ATPasa, esto para disminuir el nivel de ATP; el otro es para inhibir la subunidad de unión a ribosoma del ARNt. Esto en la fase temprana del crecimiento de *E. coli*. La acción de las AuNP's, no incluye la formación de especies ROS, y se cree que la muerte celular es inducida por antibióticos bactericidas y por los nanomateriales, pero el mecanismo por el cual lo hace, sigue siendo un misterio.

Se ha informado también que el mecanismo detrás de su actividad antibacteriana es por el debilitamiento de la replicación del ADN y la inactivación de proteínas. Por el contrario, el oro tiene baja toxicidad para los sistemas biológicos debido a sus propiedades elementales (Feng y col., 2000; Webster; 2009).

La funcionalización de las NP's con polímeros biodegradables como el polietilenglicol (PEG), ha mostrado tener múltiples ventajas, entre las que destacan una menor toxicidad, aumento de la vida media, mayor afinidad a la membrana celular, mayor distribución en los sistemas biológicos, evasión del sistema inmune, aumenta la eficacia de su

eliminación del sistema, presentan mayor biocompatibilidad; se usa como acarreador de fármacos, oligos, fluorocromos, anticuerpos, etc. Con lo que las NP's funcionalizadas, aumenta sus beneficios y nos permite explotar y aumentar las propiedades de las NP's (Benyettou y col., 2012).

II. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL TEMA

S. pneumoniae es el causal de enfermedades que siguen siendo consideradas como problema de salud pública (neumonía, meningitis y otitis media). El uso de antibióticos, logrado abatir las enfermedades causadas por *S. pneumoniae*, sin embargo, su uso indiscriminado, ha promovido la generación de mecanismos de resistencia a los antibióticos.

En este trabajo mostramos el primer intento por encontrar la concentración bactericida de AuNP's en *S. pneumoniae*. Los resultados encontrados por el tratamiento con AuNP's permitirán contribuir al entendimiento y la formación de un modelo del mecanismo de acción de las AuNP's.

En conjunto estos datos abrirán la puerta para la generación de tratamientos dirigidos y no invasivos para el combate de las enfermedades causadas por *S. pneumoniae*.

III. Hipótesis

Las AuNP's generan su efecto bactericida al estar en contacto con la membrana de *S. pneumoniae* y desestabilizarla.

IV. Objetivo

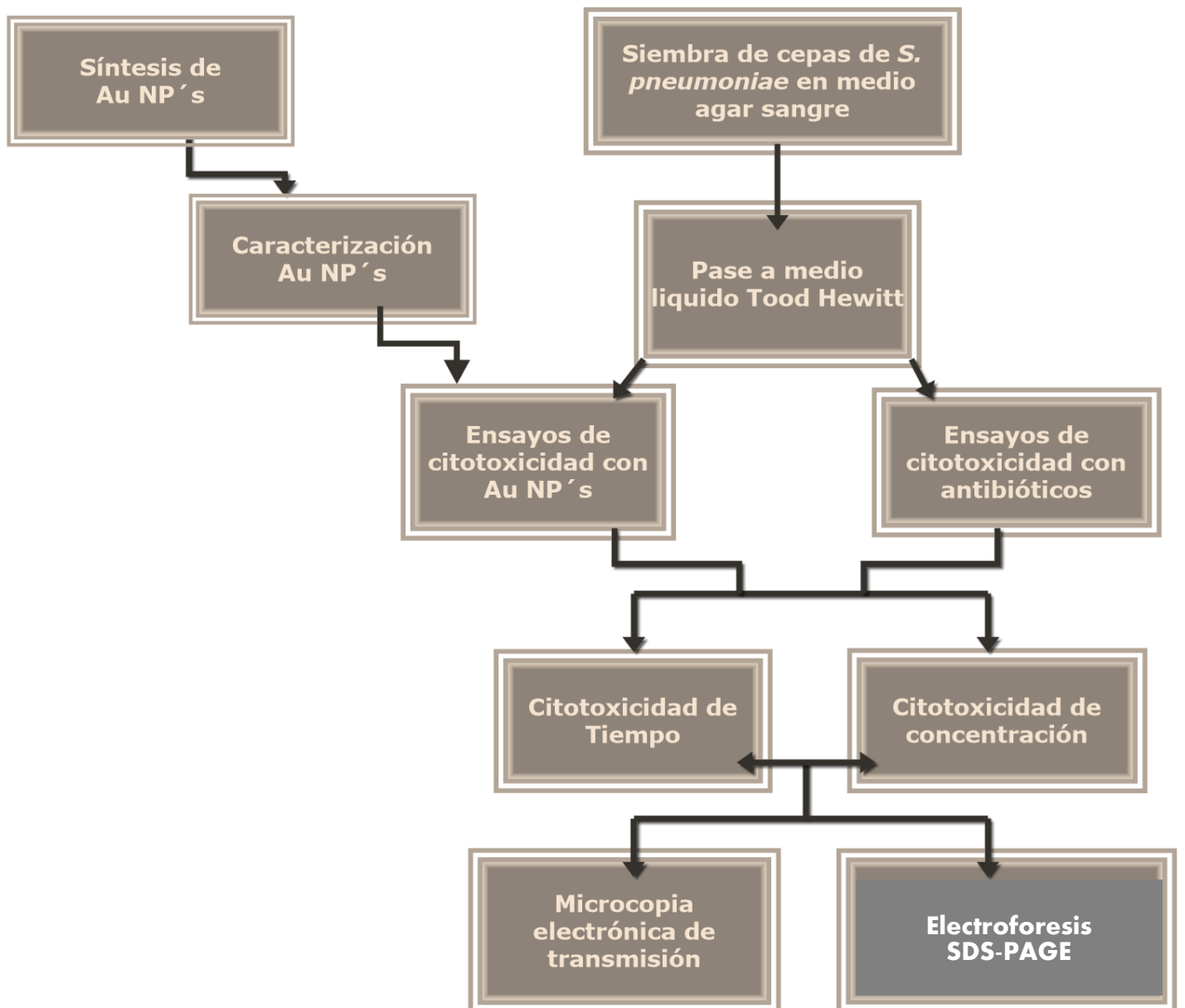
1. Objetivo general

Estudiar los efectos ocasionados por las NP's de Au en la cepa de *S. pneumoniae*.

2. Objetivos particulares

- I.** Sintetizar las nanopartículas de oro.
- II.** Evaluar la concentración bactericida de las nanopartículas de oro sobre *Streptococcus pneumoniae*.
- III.** Evaluar el perfil de las proteínas de *Streptococcus pneumoniae* a diferentes tiempos con la concentración bactericida.
- IV.** Analizar la interacción de las nanopartículas de oro sobre la estructura bacteriana de *Streptococcus pneumoniae*.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. MATERIAL Y MÉTODO

1. Cepas bacterianas de *S. pneumoniae*

Se usaron las cepas tipo de *S. pneumoniae* R6 (ATCC BAA-255) y TIGR4 (ATCC BAA-334), las cuales se dejaron crecer durante 16 hrs. en un medio solido de Agar Sangre (DIBICO) al 5%, a 37 °C y 10% de CO₂. Terminado el tiempo se cosecharon y resembraron en un medio liquido Todd-Hewitt estéril (DIBICO), suplementado con 0.5% de extracto de levadura, dejándola crecer durante 16 hrs. con un 10% de CO₂ y 37°C. Las colonias obtenidas se les realizo tinción Gram para asegurar la pureza de estas.

2. Crioconservación de las cepas bacterianas de *S. pneumoniae*

Se conservaron las cepas para tener una biomasa almacenada para su uso posterior en los experimentos. Para esto, las bacterias se cosecharon del medio sólido de Agar Sangre (DIBICO) y se colocó una asada en tubos Eppendorff estériles de 1.5 ml, al cual se le agrego 0.750 µl de caldo Todd Hewitt estéril y 0.250 µl de glicerol estéril al 30 %, y se mantuvieron en conservación a -80°C.

3. Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. pneumoniae*

3.1. Tinción Gram

Se colocó una gota de solución salina inyectable en un portaobjetos, a la cual se le adiciono una asada de la cepa bacteriana (R6 o TIGR4). La muestra se fijó al mechero y se adiciono 1 mL de cristal violeta (2%) durante un minuto, lugol (2%) durante un minuto, alcohol:cetona (1:1) por 10 segundos y safranina (0.2%) durante un minuto; haciendo un lavado con agua estéril entre cada reactivo. Se observó al microscopio óptico con aumento de 40X y 100X.

3.2. Determinación de la actividad de la catalasa

La catalasa es una enzima que es capaz de descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)². Para esta prueba se tomó una asada de las cepas de *S. pneumoniae* R6 o TIGR4, y se depositó sobre un portaobjeto de vidrio, al que se le agregó una gota de H_2O_2 al 30%. Se consideró una prueba positiva si al contacto con la muestra de bacterias, el H_2O_2 desprendió burbujas o negativa al no ver esta reacción.

3.3. Determinación de la resistencia a optoquina

Se hizo un estriado en una placa de Agar Sangre de las cepas de *S. pneumoniae* R6 o TIGR4, a la que se le colocó un disco de optoquina y se dejó incubar a 37°C y 10% de CO_2 durante 16 hrs. Posteriormente se observó la generación o no de un halo de inhibición.

4. Síntesis de nanopartículas de oro (AuNP's)

El material utilizado para la síntesis de las AuNP's se lavó previamente con agua regia (ácido nítrico + ácido clorhídrico, en proporción 3:1), y enjuago con agua Milli-Q (18 Ω) abundante.

La síntesis de AuNP's se realizó por reacción química, utilizando el método descrito por Turkevich y col. (1963), con algunas modificaciones. Esta técnica consiste en disolver ácido de tricloroáurico (HAuCl_4 , 10 ml a 1 mM, Sigma) en agua Milli-Q (18 Ω , 90 mL); la cual se puso a hervir a 320°C en una parrilla con agitación constante. Cuando la solución (HAuCl_4 y H_2O Milli-Q) empezó a hervir, se adiciono 18 mL de citrato de sodio dihidratado ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a 38.8 mM), y se dejó en ebullición por 15 minutos. Posterior a esto, se retiró de la parrilla y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Las AuNP's sintetizadas fueron lavadas con agua Milli-Q (18 Ω) mediante centrifugaciones de 20 minutos a 23,143 g, esto es para eliminar el citrato de sodio y poder continuar con su funcionalización con PEG.

La funcionalización se hizo con PEG de PM de 3,400; para lo cual se añadió 0.5 mg por mL de AuNP's. Este procedimiento se realizó a temperatura ambiente y con agitación constante en una parrilla por 2 horas. Terminado este tiempo se lavaron con agua Milli-Q (18 Ω) mediante centrifugaciones de 20 minutos a 23,143 g.

5. Determinación de la concentración de AuNP's

La determinación de la concentración se realizó tomando 1 mL de las AuNP's funcionalizadas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se pesaron antes de añadir las AuNP's. Los tubos con AuNP's se centrifugaron a 23,143 g durante 20 min. Terminado este tiempo se retiró el sobrenadante y se dejó secar los tubos a temperatura ambiente durante 48 horas y posteriormente se pesaron.

6. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se empleó para obtener el tamaño de las AuNP's sintetizadas y poder determinar la estructura donde interacciona las AuNP's con las cepas de *S. pneumoniae*.

Para determinar el tamaño se colocó 10 µl de AuNP's en rejillas de cobre (G200-Cu) durante 15 min. Terminando este tiempo se retiró el exceso de líquido con papel filtro para su observación mediante TEM.

La observación de las interacciones se realizó mediante TEM de corte. Se obtuvo un pellet de nuestras muestras bacterianas con y sin tratamiento de AuNP's. Para lo cual se recuperó las bacterias del medio de cultivo líquido Todd Hewitt (DIBICO), por medio de centrifugaciones a 4°C y 11,571 g por 15 minutos,

El pellet se fijó con formol al 2% y PBS 1X (1:1) por 1 hora, y se trató de la siguiente manera para poder observar por TEM a 60 u 80 V. Se lavó con PBS 1X y se fijó durante 1:30 hrs. a 4°C con una mezcla de aldehídos (Glutaraldehído al 2.5% y Formaldehído al 4%, amortiguado en una solución de fosfatos 0.2M a pH 7.4). Terminado esto, se realizaron 3 lavados de PBS 1X de 5 minutos a temperatura ambiente, con centrifugaciones a 4°C y 11,571 xg por 10 minutos entre estos. Posteriormente se realizó el primer contraste por 1:30 hrs. con una mezcla de

Tetraóxido de Osmio al 2% y Acetato de Uranilo al 4% (1:1), esto para asegurar que las proteínas no se desnaturalicen y para evidenciar con el Uranilo los ácidos nucleicos. Seguido de 3 lavados con PBS 1X de 5 minutos a temperatura ambiente, con centrifugaciones a 4°C y 11,571 xg por 10 minutos entre estos para quitar el exceso de contrastante. Las muestras contrastadas se deshidrataron con alcohol etílico en concentraciones graduales (30%, 50%, 70%, 80% y 96%) con un tiempo de recambio de 15 minutos c/u entre estas; seguido de 2 cambios de alcohol etílico absoluto de 30 minutos c/u. Estas muestras se trataron con 2 cambios de 30 min c/u de óxido de propileo, Finalmente, para realizar la microscopia electrónica de corte, se realizó una matriz, esto realizando una preinclusión en óxido de propileno-resina [2:1] por 2 hrs., [1:1] por 5 hrs., [1:2] toda la noche, seguido de inclusión en resina epóxica, en una estufa a 60°C por 24 horas.

Terminado este tratamiento, se realizaron cortes en micrótopo de un grosor de 2 micras y las cuales se observaron en TEM.

7. Determinación del tamaño de las AuNP's

El cálculo del tamaño de las AuNP's se determinó mediante 2 pruebas. La primera consistió en obtener un espectro completo de luz UV-Vis de las AuNP's sin funcionalizar y funcionalizadas entre los rangos de 200-1000 nm. La segunda consistió en medir manualmente el tamaño de las AuNP's en diferentes campos de la rejilla y obtener un promedio del tamaño.

8. Determinación de la concentración bactericida de las AuNP's

Se realizaron pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC). Para realizarlo se añadieron 100 µL de agar Mueller Hinton (DIBICO) y 100 µL de bacterias en este mismo medio al 0.5 en la escala de McFarland; para hacer un volumen final de 200 µL, los cuales se pusieron en placas de Elisa de 96 pozos.

Debido a que no existen reportes referentes a las concentraciones que las AuNP's inducen su efecto toxico, se determinó usar la concentración que *S. pneumoniae* es sensible a la penicilina, la cual esta reportada por la CLSI de entre ≤ 0.06 µg/mL y ≤ 2 µg/mL.

Las placas se incubaron a 37°C y 10% de CO₂ por 24 hrs y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro a 600 nm cada hora para monitorear el crecimiento de las cepas.

9. Obtención de proteínas

11.1 Proteínas secretadas

Las proteínas secretadas se obtuvieron de bacterias sin tratamiento y tratadas con AuNP's. Para lo cual ambas cepas se sembraron durante 16 hrs. en placas de Agar Sangre (DIBICO) al 5%, a 37 °C y 10% de CO₂. Posteriormente se recuperaron y se resembraron en medio líquido Todd Hewitt (DIBICO) durante 16 hrs. Terminado esto, se preparó una muestra 0.5 en la escala de McFarland las cuales se trataron con AuNP's durante diferentes tiempos.

La obtención de las proteínas secretadas se obtuvieron separando el medio líquido Todd Hewitt (DIBICO) de las bacterias mediante centrifugaciones de 15 min a 19,837 g. Se recuperó el sobrenadante el

cual será considerado donde están las proteínas secretadas. Esta fracción se concentró en Amicones con poro de 0.45 μm y centrifugaciones de 5,000 x.

11.2 Proteínas de membrana

Las proteínas de membrana se obtuvieron de las bacterias sin tratamiento y tratadas con AuNP's. Para lo cual ambas cepas se sembraron durante 16 hrs. en placas de Agar Sangre (DIBICO) al 5%, a 37 °C y 10% de CO₂. Posteriormente se recuperaron y se resembraron en medio líquido Todd Hewitt (DIBICO) durante 16 hrs. Terminado esto, se preparó una muestra al 0.5 en la escala de McFarland para ponerlas con tratamiento de AuNP's durante diferentes tiempos.

De las bacterias tratadas con AuNP's se obtuvo un pellet por centrifugaciones a 4°C y 19,837 g. El pellet se sonico por 6 minutos, con una amplitud de 60% y pulsos de 30 segundos, en una solución de Tris-HCl (20 mM) y Sarkosil (1%). El pellet sonicando se lavó 3 veces a 19,837 xg por 20 min en una solución de Tris-HCl (20 mM). Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un buffer Tris-HCl (20 mM) y se ultracentrifugo a 105,000 g por 1 h. Se descartó el sobrenadante y el pellet se consideró como las proteínas de membrana.

10. Determinación de la concentración de proteínas secretadas y de membrana

Las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría empleando el método de Bradford, se generó una curva estándar con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina y se leyó a 595 nm, la concentración de las muestras se determinó por interpolación. En primer lugar se prepararon diluciones de la albumina sérica bovina a 25, 50, 75 y 100 µg/ml. Las muestras se prepararon tomando un volumen igual o menor a 100 µL; completando los 100 µL con la solución de dilución. Posteriormente a cada tubo se agregó 1 ml del reactivo de Bradford, se mezcló y dejó reposar por 2 min. Se midió la absorbancia a 595 nm, y con los datos se realizó una curva de referencia donde se interpolaron las lecturas obtenidas de las muestras.

11. Preparación de muestras para electroforesis en SDS-PAGE

Se colocó 15 µL de proteínas secretadas y de membrana obtenidas de las bacterias tratadas y sin tratar con AuNP's en tubos Eppendorf de 1.5 mL al cual se agregó 7 µL de un amortiguador de carga 5X (250 mM Tris HCl pH 8, 50% de glicerol, 10% de SDS, 0.05% de azul de bromofenol, 2% de DTT, β-mercaptoetanol 1 mM), y 3 µL 3 de agua Milli-Q (18 Ω). Se mezcló por agitación y se hirvió durante 6 minutos, terminado esto se dejó enfriar a temperatura ambiente.

12. Geles de poliacrilamida

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%. Para preparar el gel separador se utilizaron los siguientes reactivos:

Mezcla para el gel concentrador:

Tabla 1. Mezcla de reactivos para preparar un gel concentrador al 12%.

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.6 mL
Mezcla de acrilamida 30%	2.0 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 mL
SDS 10%	0.05 mL
Persulfato de amonio 10%	0.05 mL
TEMED	0.002 mL
Volumen final	5 mL

Mezcla para el gel concentrador:

Tabla 2. Mezcla de reactivos para preparar un gel separador al 12%.

Reactivo	Volumen
Agua destilada	1.4 mL
Mezcla de acrilamida 30% 1M	0.33 mL
Tris (pH 6.8)	0.25 mL
SDS 10%	0.02 mL
Persulfato de amonio 10%	0.02 mL
TEMED	0.002 mL
Volumen final	2 mL

13. Tinción de geles con azul de Coomassie G250

El gel se colocó en solución de fijación (metanol 50% y ácido acético 12%) toda la noche. Posteriormente se preparó la suspensión de Coomassie coloidal G250; mezclando 100 gr de sulfato de amonio y 1 g de azul brillante de Coomassie G250 (Bio-Rad) en 400 mL de diH_2O hasta disolver el sulfato de amonio completamente y se agregó 20 mL de ácido fosfórico en solución y 200 mL de metanol en pequeñas cantidades hasta adicionarlo completamente. Finalmente se aforó a 1 litro con diH_2O . El gel se sumergió en la solución de tinción de Coomassie hasta que el patrón de se pudiera distinguir claramente.

Enseguida se retiró el colorante y se agregó dH_2O para desteñir el gel hasta que se obtuvo el contraste deseado.

14. Determinación del pH

Se realizó la medición del pH cada hora mediante un potenciómetro, a una solución con 5 ml de AuNP's a una concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$ y 5 ml de bacterias al 0.5 de McFarland. Como controles de este experimento se usó bacterias sonicadas durante 6 minutos, con una amplitud de 60% y pulsos de 30 segundos; bacterias sin tratamiento; medio de cultivo Todd Hewitt (DIBICO) con AuNP's y sin bacterias; y medio de cultivo Todd Hewitt (DIBICO) solo.

Todos los tratamientos y controles se colocaron en tubos Falcon estériles de 15 mL, los cuales se incubaron a 37°C y 10 % de CO_2 . Estos tubos fueron sacados cada hora para hacer la medición el pH utilizando el potenciómetro previamente calibrado.

15. Análisis de la generación de radicales libres (ROS)

Se realizó la medición de ROS cada hora mediante el Kit Red Hydrogen Peroxide Assay de ENZO (Cat. No. ENZ-51004). Las muestras cuantificadas estaban compuestas de 5 ml de la AuNP's a una concentración de 512 $\mu\text{g/mL}$ y 5 ml de bacterias al 0.5 de McFarland en medio de cultivo Todd Hewitt (DIBICO).

Las bacterias tratadas y sin tratamiento con AuNP's, se incubaron a 37°C y 10 % de CO_2 . Se tomó 10 μl de la muestra cada hora para hacer la medición de ROS siguiendo el protocolo del Kit.

VII. Resultados

1. Identificación microscópica de *S. pneumoniae* mediante tinción de Gram

Los cultivos de las cepas bacterianas de *S. pneumoniae* TIGR4 y R6 fueron monitoreados mediante tinción de Gram con la finalidad de observar su pureza y morfología, la cual era de diplococos Gram positivos, de esta manera se confirmó la ausencia de bacterias que pudieron contaminar la muestra de proteínas.

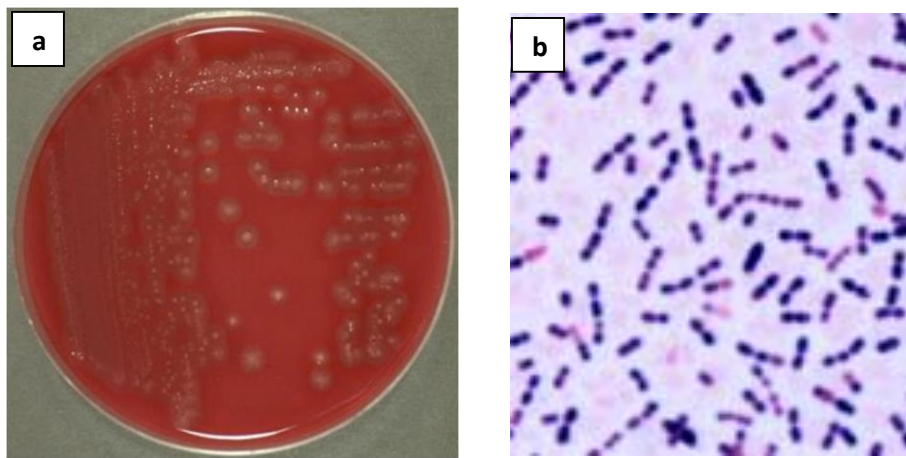


Figura 4. Monitoreo del crecimiento de *S. pneumoniae*. Durante todos los experimentos se realizó tinción de Gram (b) a las bacterias crecidas en Agar Sangre (a), con la finalidad de tener cultivos puros.

2. Pruebas bioquímicas

2.1 Catalasa y optoquina

Al igual que la tinción de Gram, las pruebas de catalasa al 10% y optoquina permitió asegurarse de la pureza de las cepas, ya que *S. pneumoniae* no tiene la enzima catalasa, esta prueba fue negativa en comparación con *E. coli* (Figura 5). Mientras que la prueba de resistencia a la optoquina, mostro sensibilidad ambas cepas.

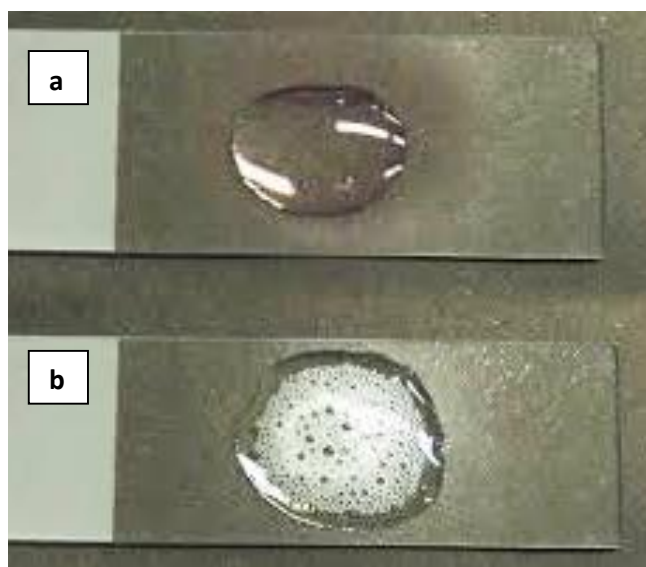


Figura 5. Prueba de la catalasa en *S. pneumoniae*. La prueba de la catalasa se fue negativa para *S. pneumoniae* (a) y positiva para *E. coli* (b), mostrando que teníamos cultivos puros.

3. Síntesis de caracterización de las AuNP's

La obtención de las nanopartículas de oro en suspensión acuosa empleando el citrato de sodio como agente reductor, es corroborada a simple vista a través del cambio de coloración (transparente), de la solución inicial con teniendo los iones de oro, Au^{+3} , a una coloración de un tono rojizo (Figura 6), coloración típica de suspensiones coloidales de nanopartículas de oro y congruentes con los obtenidos por el método descrito por Turkevich y col. (1963).

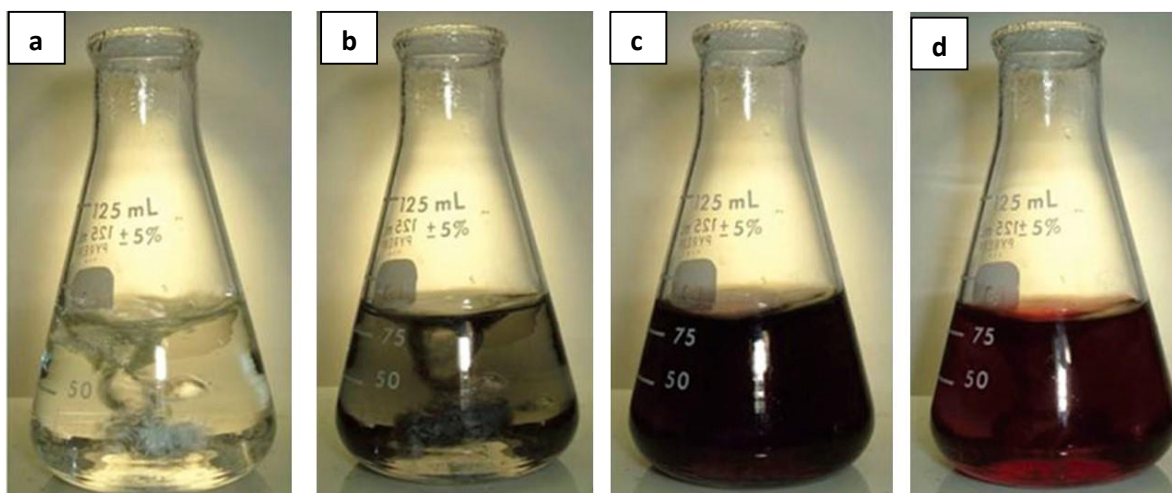


Figura 6. Representación visual de la síntesis de las AuNP's. a) Solución de $\text{H}_2\text{O} + \text{HAuCl}_4$ antes de añadir el citrato de sodio. b) Solución a los 30 segundos después de añadir el citrato de sodio. c) Solución a los 120 segundos después de añadir el citrato de sodio. d) solución a los 160 segundos después añadir el citrato de sodio.

La determinación del tamaño de las AuNP's sintetizadas se realizó mediante un espectro de absorbancia que va de los 50-800 nm. La Figura 7 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la suspensión de AuNP's, el cual muestra una banda de resonancia del plasmón de superficie (SPR) entrada a los 524 nm, característica de suspensiones de oro coloidal. Indicando la presencia de partículas de oro de alrededor de 20nm de diámetro, lo cual se corrobora mediante TEM.

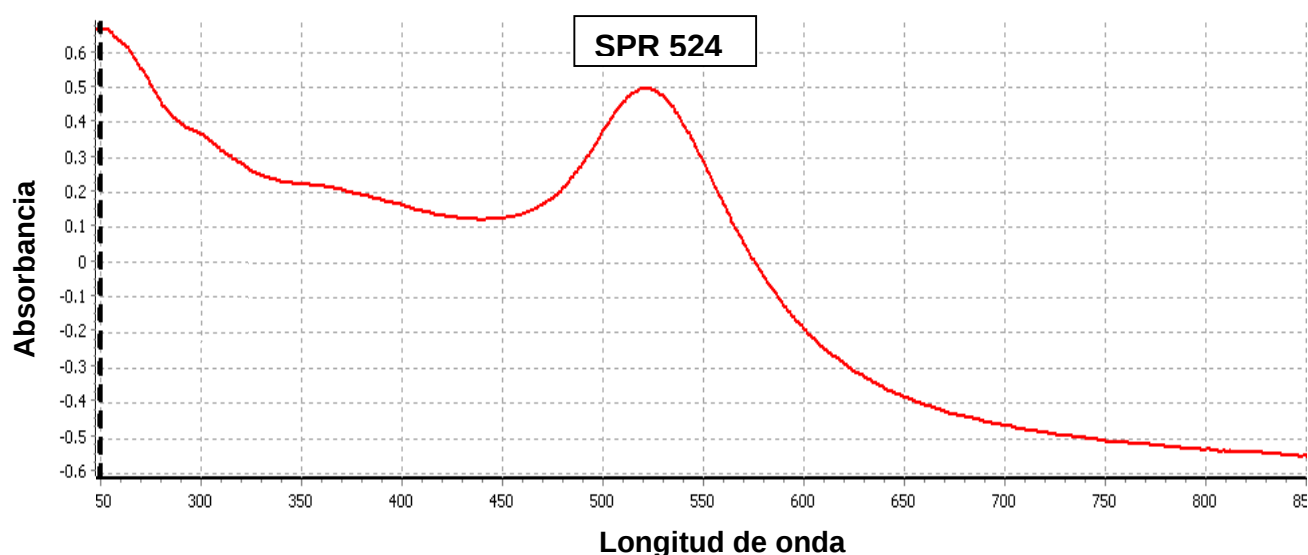


Figura 7. Espectro de absorción UV-Visible de la suspensión de nanopartículas de oro. El espectro de absorción muestra un pico a los 524 nm, longitud característica de las AuNP's de 20 nm.

4. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La imagen de TEM de la suspensión de AuNP's se muestra en la Figura 8 panel a, donde se observa una población de AuNP's de forma esférica con un diámetro promedio de 20 nm con una desviación estándar de ± 0.9 nm cuando estas no están funcionalizadas con PEG.

Las AuNP's muestran una muy buena dispersión, lo que sugiere que el citrato de sodio además de actuar como agente reductor, también está actuando como un agente protector de las AuNP's evitando la precipitación de estas, ya que las nanopartículas de oro "desnudas" tienden a agregarse, fusionarse y precipitarse para formar clusters de mayor tamaño. Lo cual no se observa en las micrografías de TEM.

La funcionalización de las AuNP's con PEG se muestra en la figura 7 panel b, observando un aumento de la población de AuNP's, las cuales conservan su forma esférica aumentando su tamaño a 21 ± 0.5 nm. La funcionalización de las AuNP's permitió aumentar su estabilidad en una suspensión, a los cambios de temperatura y generamos una mayor afinidad por la membrana bacteriana.

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

El rendimiento de AuNP's se obtuvo mediante centrifugaciones y secado a temperatura ambiente. Saber el rendimiento por síntesis es importante para poder agregar concentraciones exactas en los MIC's y poder determinar la concentración bactericida. El rendimiento de AuNP's funcionalizadas con PEG, se obtuvo de 5 síntesis diferentes, de las cuales se obtuvo una media, la cual fue de la cual es de 0.00127 mg/ml.

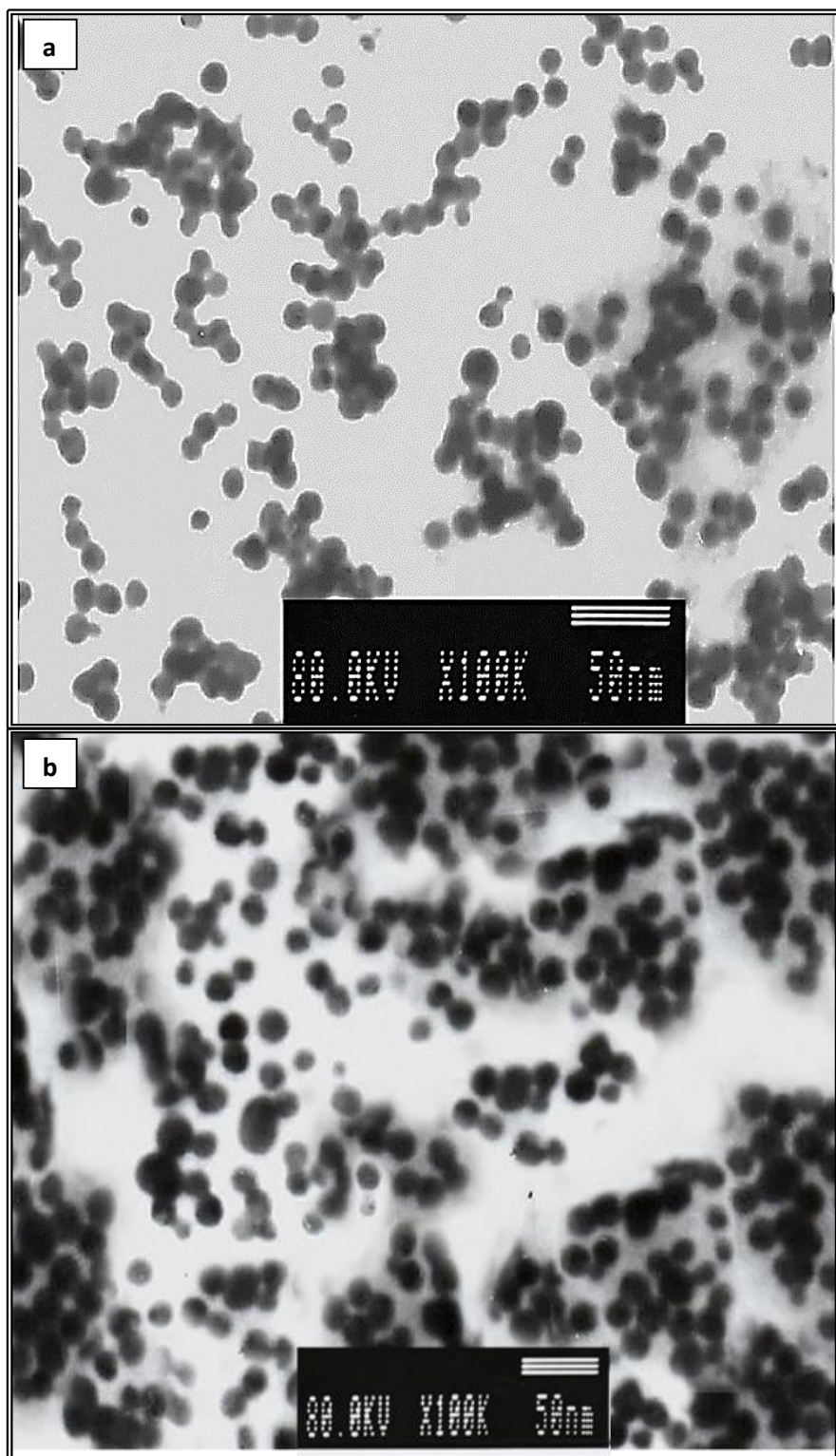


Figura 8. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) de las AuNP's sintetizadas. a) TEM de AuNP's sin funcionalizar con un tamaño de 20 ± 0.9 nm. b) TEM de AuNP's funcionalizadas con PEG con un tamaño de 21 ± 0.5 nm.

6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las AuNP's en *S. pneumoniae*

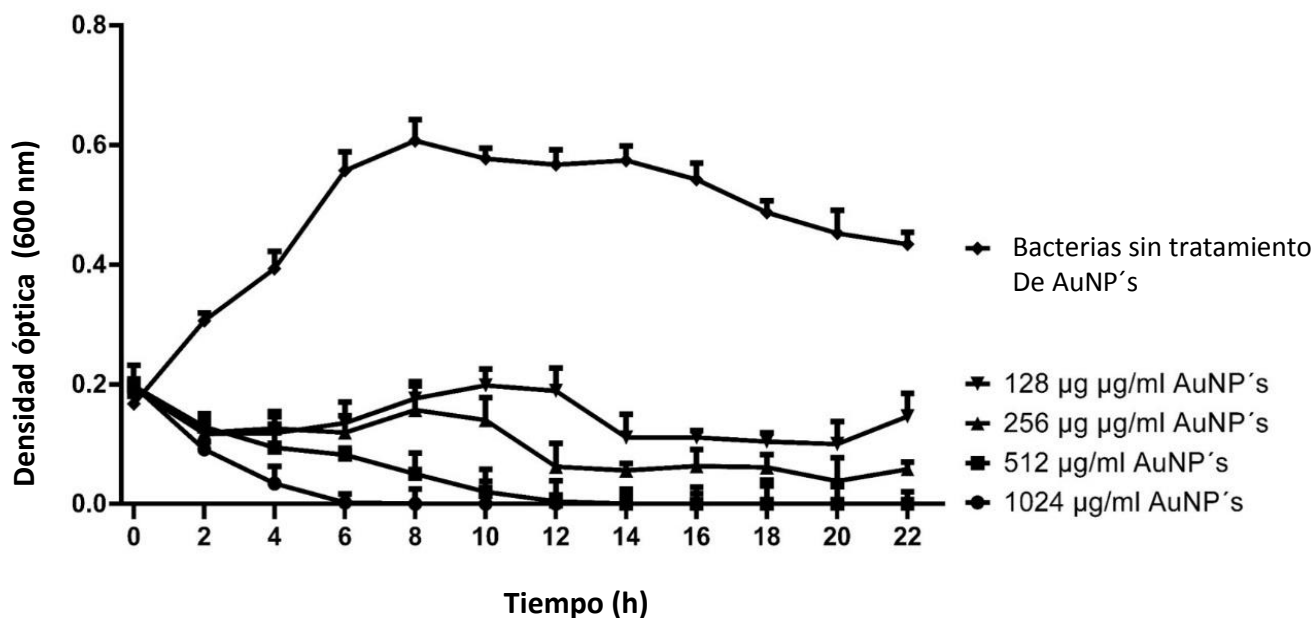
Los ensayos del MIC se realizaron en un espectrofotómetro a 600 nm, y se monitorio la absorbancia cada hora durante 22 horas iniciando con concentraciones de 0.05 a 64 µg/ml (datos no mostrados), los cuales no generaron algún efecto sobre el crecimiento de *S. pneumoniae*, por lo cual se aumentó las concentraciones de AuNP's hasta obtener un efecto inhibitorio en su crecimiento.

Tanto en la cepa R6 (Figura 9a) como en la TIGR 4 (Figura 9b), las AuNP's generan un efecto bacteriostático a concentraciones de 128 y 256 µg/ml. La cepa TIGR4 mostró una pequeña fase exponencial de crecimiento de 4 horas, una fase estacionaria de 2 horas y una fase de muerte adelantada a las 10 horas de tratamiento con AuNP's. La cepa R6 no mostro una fase exponencial de crecimiento, mostro una fase de muerte inmediatamente después de iniciar el tratamiento con AuNP's, a la cual le siguió una fase estacionaria a las 6 horas de tratamiento, la cual se permaneció hasta las 22 horas de tratamiento.

A concentraciones de 512 y 1024 µg/ml de AuNP's el efecto observado es bactericida. Ambas cepas se comportan de manera similar, no mostrando una fase exponencial de crecimiento, seguida de una fase de muerte a las 12 horas a concentraciones de 512 µg/ml de AuNP's y 6 horas a 1024 µg/ml de AuNP's.

Estos resultados arrojan el primer dato de los experimentos, siendo 512 µg/ml de AuNP's la concentración bactericida y por debajo de esta, solo generamos un efecto bacteriostático. Además de esto, logramos ver que el efecto en el crecimiento de *S. pneumoniae*, es dependiente de la concentración de AuNP's que se utilice para el tratamiento.

a



b

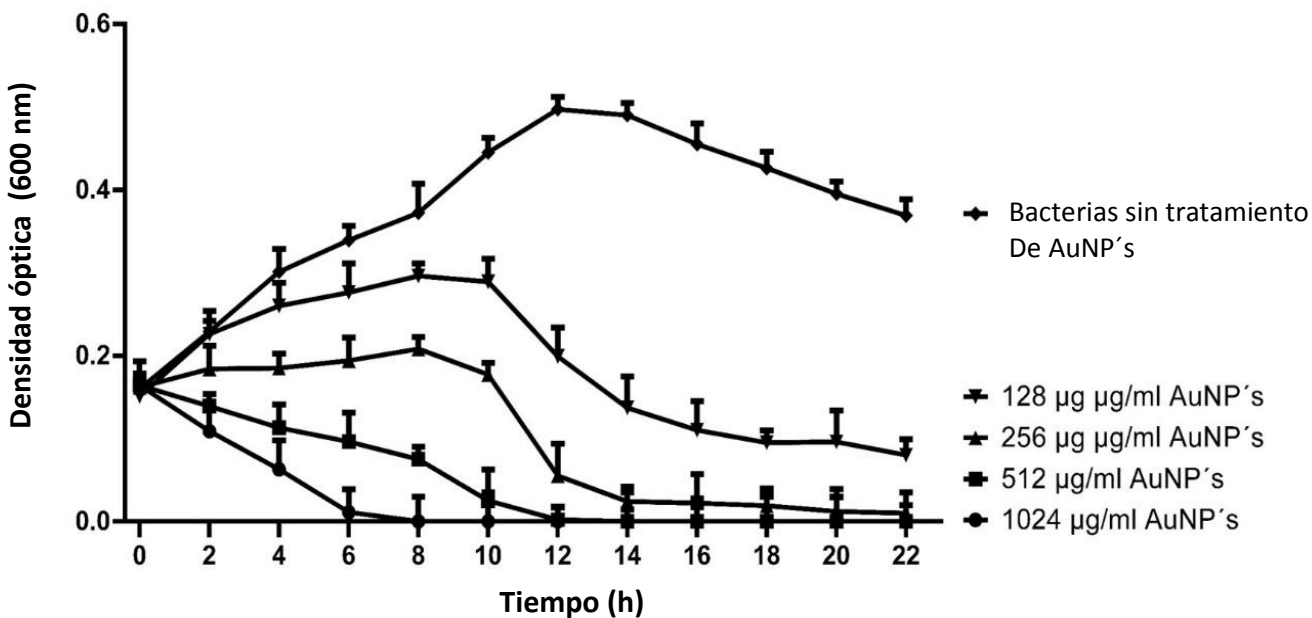


Figura 9. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las AuNP's en las cepas de *S. pneumoniae*. En las cepas R6 (a) y TIGR (b), se les agrego AuNP's a concentraciones de 128, 256, 512 y 1024 µg/ml, y se mide la densidad óptica cada 2 h. En ambas cepas se vio una actividad bacteriostática a concentraciones de 128 y 256 µg/ml de AuNP's, y a concentraciones de 512 y 1024 µg/ml de AuNP's un efecto bactericida.

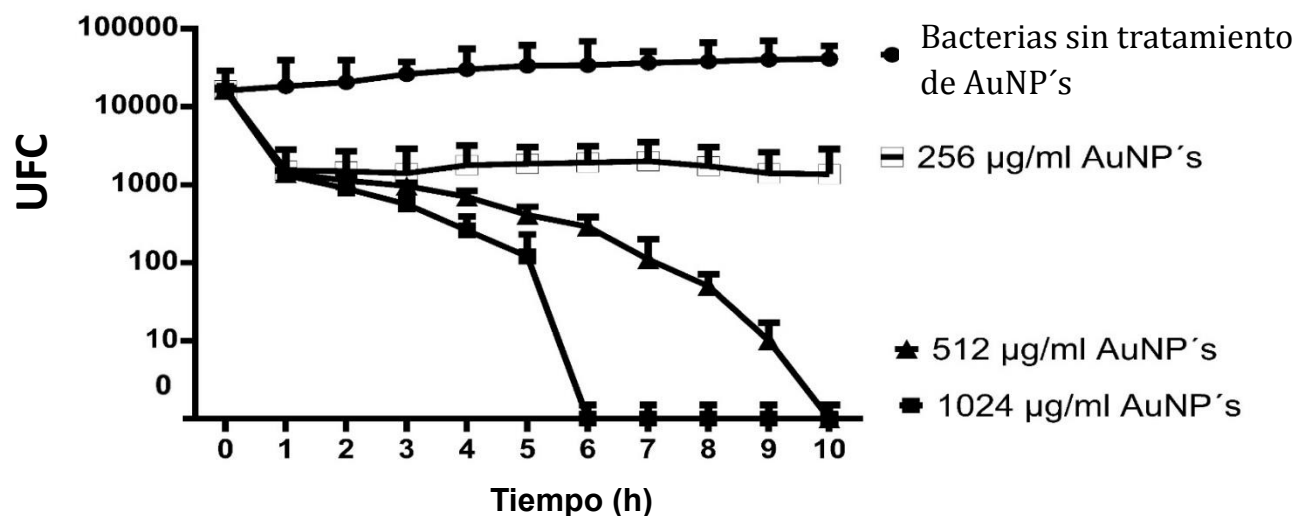
7. Ensayo de viabilidad de *S. pneumoniae* con tratamiento de AuNP's

Un ensayo de viabilidad nos permitió ver de manera más clara el efecto del tratamiento con AuNP's sobre el crecimiento de *S. pneumoniae*. En este ensayo logramos contabilizar las unidades formadoras de colonia (UFC) de ambas cepas durante el tratamiento con AuNP's durante 10 horas. Para lo cual se tomó 10 µL de las cepas tratadas con 256, 512 y 1024 µg/mL de AuNP's, los cuales se gotearon en una placa de Agar Sangre, se estiró y se dejó crecer por 24 horas a 37°C y 10% de CO₂.

La figura 10 muestra las UFC de las cepas R6 (Figura 10a) y TIGR4 (Figura 10b), donde se puede notar que el comportamiento de ambas cepas es similar a los tratamientos con diferentes concentraciones de AuNP's. Se inició el experimento con aproximadamente 10,000 UFC para el control y los diferentes tratamientos. Tras la primera hora de tratamiento con AuNP's las UFC disminuyen 10 veces su cantidad llegando a 1000 UFC. En la segunda hora de tratamiento con AuNP's, las concentraciones de 512 y 1024 µg/mL de AuNP's, muestran una disminución en el número de UFC, tendencia que se mantiene durante las horas posteriores hasta llegar a matar el total de las UFC a las 6 y 10 horas respectivamente.

Los datos obtenidos corroboran que las AuNP's tienen un efecto bactericida con un tratamiento a partir de los 512 µg/mL de AuNP's, el cual es más rápido conforme se aumenta la concentración de AuNP's.

a



b

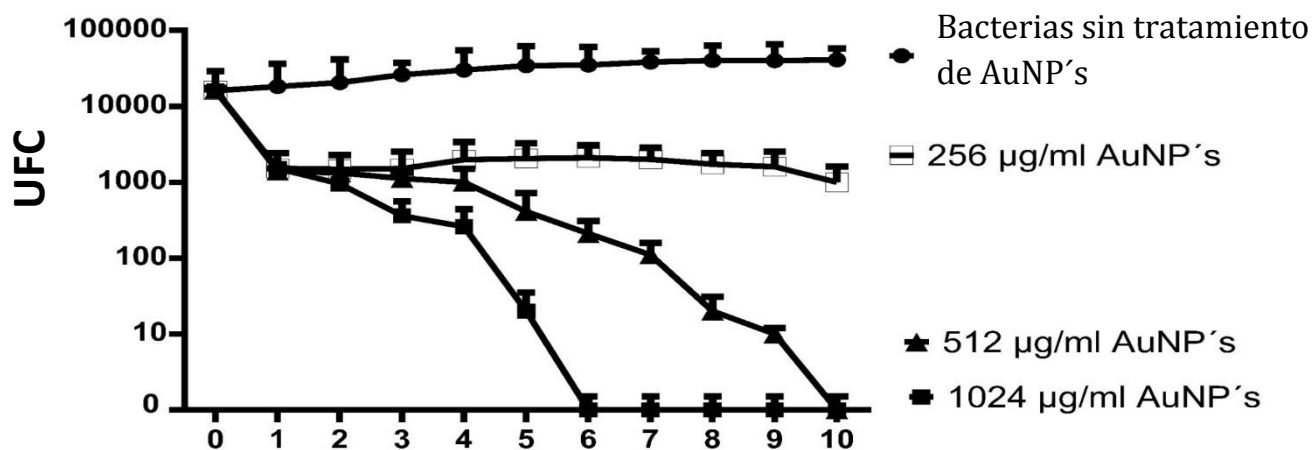


Figura 10. Determinación de la viabilidad. Las cepas R6 (a) y TIGR (b) muestran un comportamiento similar, una disminución drástica de la formación de UFC a las 2 horas con tratamiento de 512 µg/mL de AuNP's, Esta disminución es más drástica cuando se aumentó la concentración de AuNP's a 1024 µg/mL.

8. Efecto de las AuNP's en el pH del medio de cultivo Todd-Hewitt con crecimiento bacteriano.

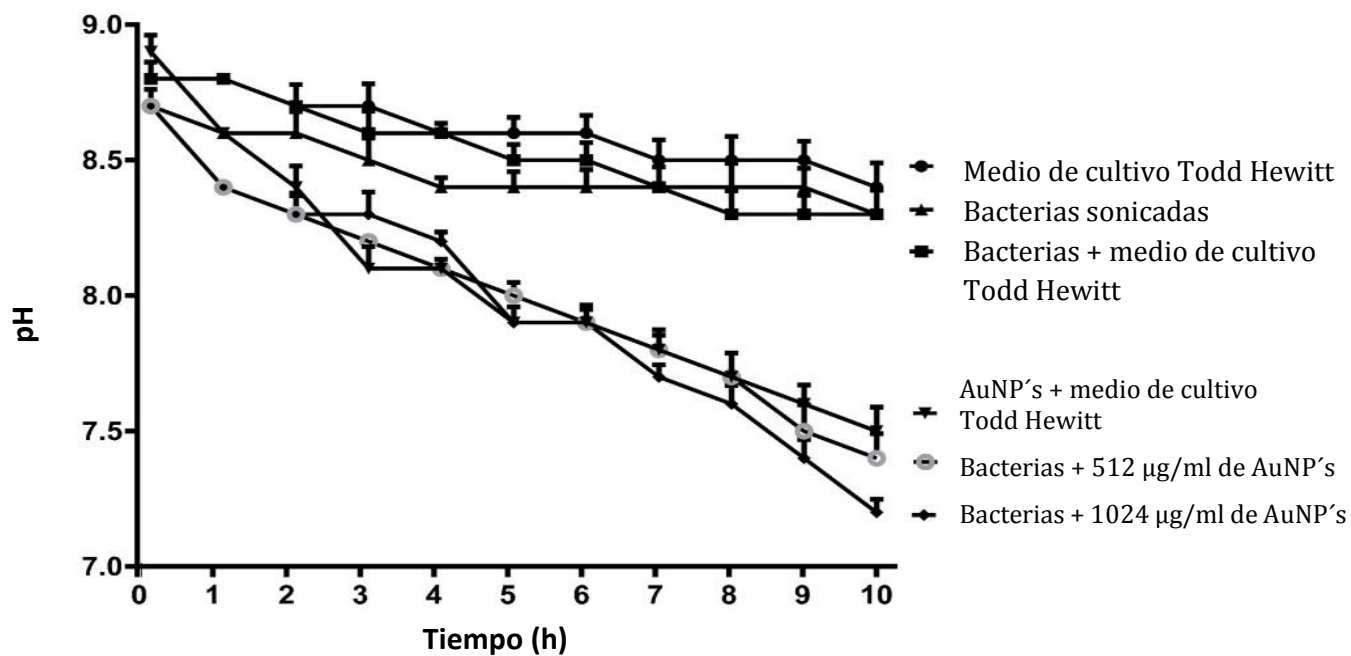
Los efectos de las AuNP's en el medio de cultivo donde es crecido *S. pneumoniae*, es importante para ver el efecto global que tienen las AuNP's. En primer lugar se midió el pH mediante un potenciómetro para determinar si este se ve afectado por acción de las AuNP's (Figura 11).

La medición del pH en la cepa R6 (Figura 11a) y TIGR4 (Figura 11b) tienen un comportamiento similar. Para este experimento se utilizaron 4 controles, el medio de cultivo Todd Hewitt donde crece *S. pneumoniae* sin tratamiento de AuNP's, el cual inicia con un pH de 8.7 y después de 10 horas termina en un pH de 8.5. Bacterias de *S. pneumoniae* sonicadas durante 6 minutos con una amplitud de 60 % y pulsos de 30 segundos, la cual inicio con pH de 8.8 y después de 10 horas termino con un pH de 8.5. Bacterias crecidas de *S. pneumoniae* en medio Todd Hewitt, la cual inicio en un pH de 8.8 y después de 10 horas termino con un pH de 8.5. Por último el medio de cultivo Todd Hewitt con una concentración de 512 µg/ml de AuNP's, iniciando con un pH de 8.7 y después de 10 horas de tratamiento con AuNP's, se vio una disminución de 1.2 unidades llegando a un pH final de 7.5.

Cuando las bacterias de *S. pneumoniae* son crecidas en medio de cultivo Todd Hewitt, y tratadas con 512 y 1024 µg/ml de AuNP's, la disminución de pH es más drástica, pasando de un pH inicial de 8.7 a 7.6 y 7.4 respectivamente después de 10 horas de tratamiento con AuNP's.

Estos datos muestran que el medio de cultivo Todd Hewitt, las bacterias de *S. pneumoniae* sonicadas y las bacterias de *S. pneumoniae* crecidas en medio de cultivo Todd Hewitt, permanece estable el pH en el rango de entre 8.8 y 8.5, cuando no tienen un tratamiento con AuNP's. Cuando se adiciona un tratamiento de AuNP's en las bacterias de *S. pneumoniae* y en el medio de cultivo Todd Hewitt solo, el pH disminuye, siendo las AuNP's las responsables de la disminución del pH.

a



b

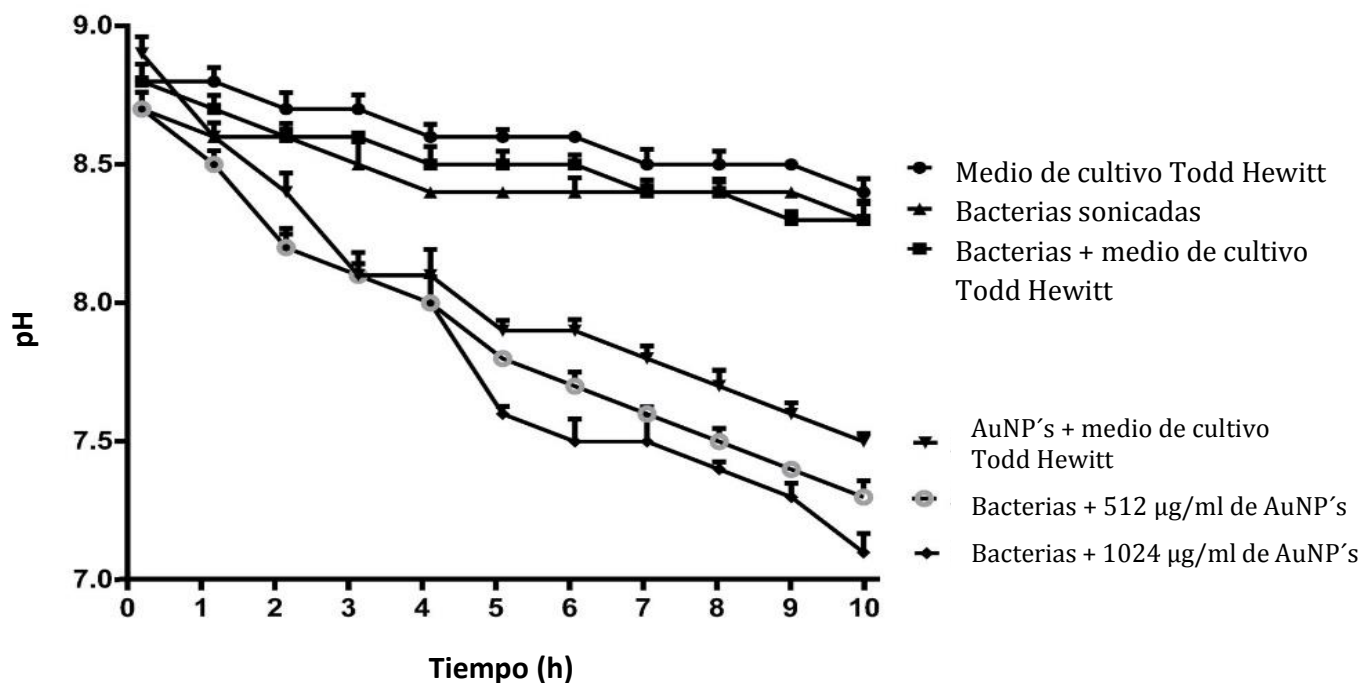


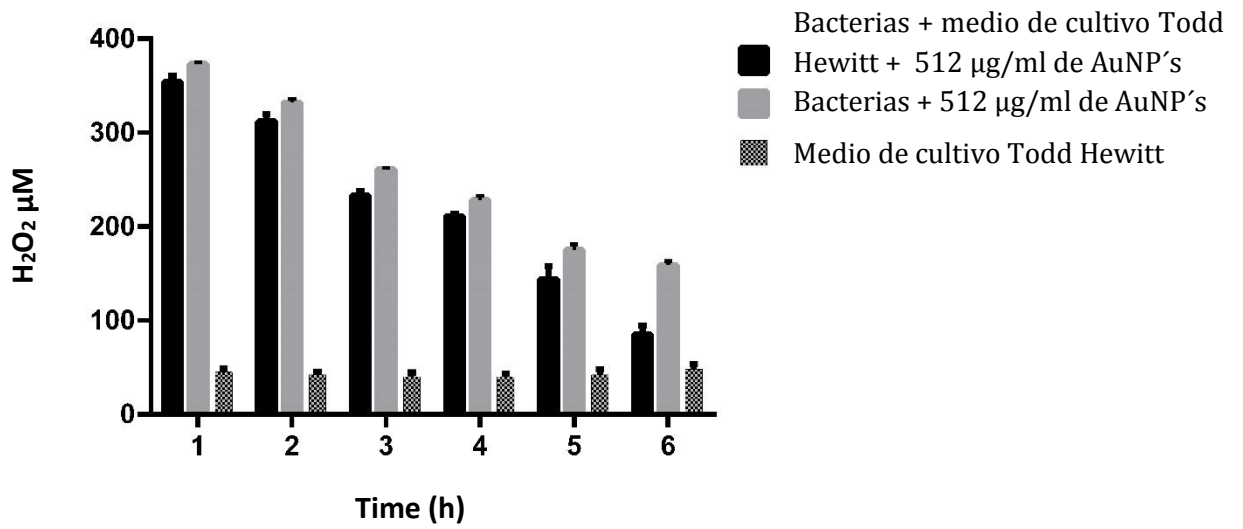
Figura 11. Efecto de las AuNP's en el pH. A las cepas R6 (a) y TIGR4 (b) se les mide el pH cada hora con un tratamiento de 512 y 1024 $\mu\text{g/ml}$ de AuNP's. Cuando se adiciona un tratamiento con AuNP's, el medio de cultivo se acidifica y se tiene una disminución del pH, dicha disminución es dependiente de la concentración de AuNP's.

9. Producción de ROS en la cepas *S. pneumoniae* tratadas con AuNP's

Para cuantificar la producción de ROS se utilizó el Kit Red Hydrogen Peroxide Assay, debido a que se piensa que la producción de ROS son causantes de la muerte bacteriana. En la figura 12 se muestra la cuantificación de ROS en la cepa R6 (Figura 12a) y TIGR4 (Figura 12b) después de un tratamiento de 512 µg/ml de AuNP's. Para este experimento se utilizó un control del medio de cultivo Todd Hewitt, el cual no muestra un aumento en la producción de ROS.

El seguimiento durante 6 horas de un cultivo de *S. pneumoniae* crecido en medio de cultivo Todd Hewitt, con y sin tratamiento de AuNP's, generaron una producción de ROS similar, la cual va disminuyendo a lo largo de la medición de ROS. Estos datos nos muestran que el tratamiento con AuNP's no genera un aumento en la producción de ROS en ambas cepas.

a



b

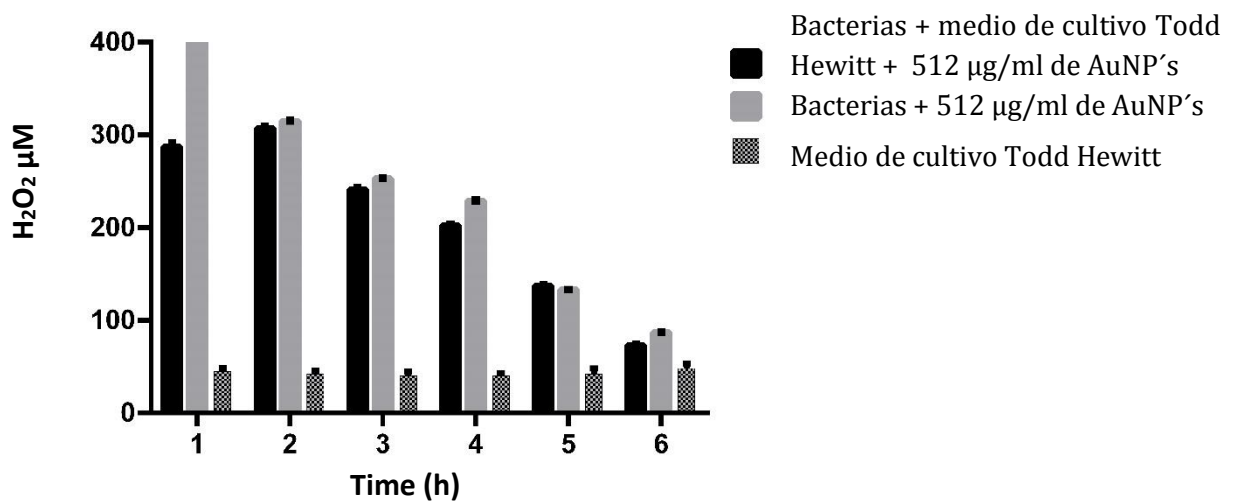


Figura 12. Cuantificación de la producción de ROS en las cepas de *S. pneumoniae* tratadas con AuNP's. El tratamiento con 512 μg/ml de AuNP's, no modificó la producción de ROS en las cepas R6 (a) y TIGR (b), esto comparado con el control en un periodo de 6 horas.

10. Proteínas de membrana obtenidas de las bacterias tratadas con AuNP's

Las proteínas de membrana obtenidas de las bacterias de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (Figura 13) tratadas con 512 µg/ml de AuNP's durante 2 horas, se corrieron en un gel SDS-Page al 12%, y el patrón de bandas se analizó con el programa Imagej para obtener la densidad óptica y ver si existía variación en la expresión. Del patrón de bandeo obtenido se tomaron 8 bandas, debido a que estas mostraron un patrón más claro en el gel. A las bandas se le asignó un número del 1 al 8 para su análisis y poder comparar su expresión con respecto al control.

Los pesos moleculares de estas bandas son:

Tabla 3. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas de membrana de *S. pneumoniae* R6. A las bandas seleccionadas se le calculo el peso molecular y se analizaron en el programa Imagej.

Numero de banda	Peso molecular aproximado en kDa
1	99.7
2	74.1
3	69.8
4	61.4
5	52
6	48.2
7	42.3
8	38.5

Las bandas seleccionadas y analizadas obtenidas de las proteínas de membrana de la cepa R6 de *S. pneumoniae*, tienen un peso molecular que van de los 38.5 kDa hasta los 99.7 kDa. De las 8 bandas que se tomaron para analizar, 6 de ellas muestran un cambio en su expresión (1, 2, 3, 4, 7 y 8).

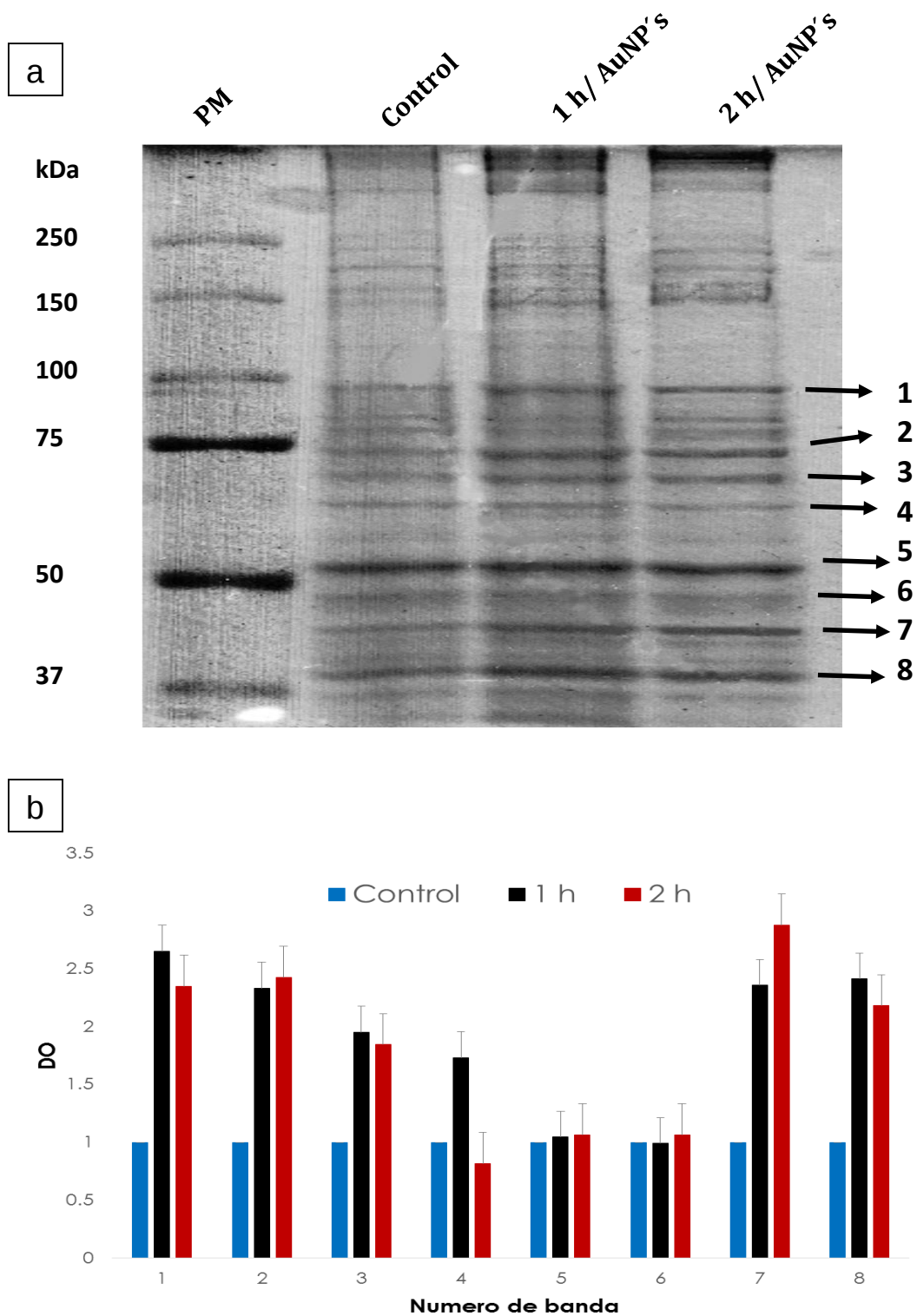


Figura 13. Análisis de la expresión de las proteínas de membrana de la cepa R6 de *S. pneumoniae*. (a) Gel SDS-PAGE al 12 % de las proteínas de membrana de cepa R6 tratadas con 512 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP's. (b) Densidad óptica del análisis de las 8 bandas seleccionadas para su análisis con el programa Imagej. De las 8 bandas analizadas, 6 mostraron un cambio significativo en su expresión. Gel teñido con azul de Coomassie G250.

Las proteínas de membrana obtenidas de las bacterias de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* (Figura 14) tratadas con 512 µg/ml de AuNP's durante 2 horas, se corrieron en un gel SDS-Page al 12%, y el patrón de bandas se analizó con el programa Imagej para obtener la densidad óptica y ver si existía variación en la expresión. Del patrón de bandeo obtenido se tomaron 6 bandas, debido a que estas mostraron un patrón más claro en el gel. A las bandas se le asignó un número del 1 al 6 para su análisis y poder comparar su expresión con respecto al control.

Los pesos moleculares de estas bandas son:

Tabla 4. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas de membrana de *S. pneumoniae* TIGR4. A las bandas seleccionadas se le calculo el peso molecular y se analizaron en el programa Imagej.

Numero de banda	Peso molecular aproximado en kDa
1	282.3
2	150
3	101.8
4	97.2
5	74.2
6	72.9

Las bandas seleccionadas y analizadas obtenidas de las proteínas de membrana de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*, tienen un peso molecular que van de los 282.3 kDa hasta los 72.9 kDa. De las 6 bandas que se tomaron para analizar, 4 de ellas muestran un cambio en su expresión (1, 4, 5 y 6).

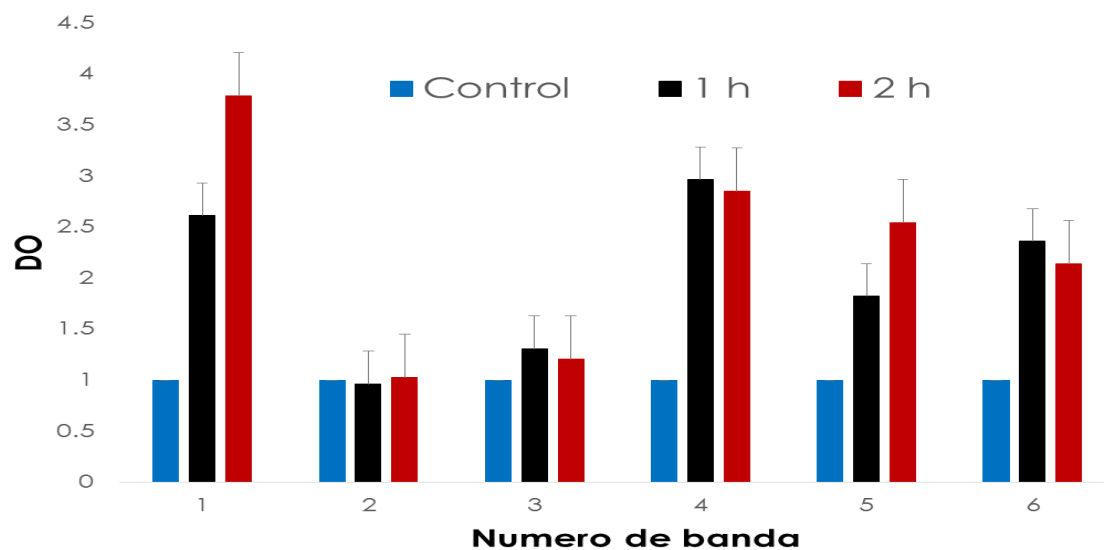
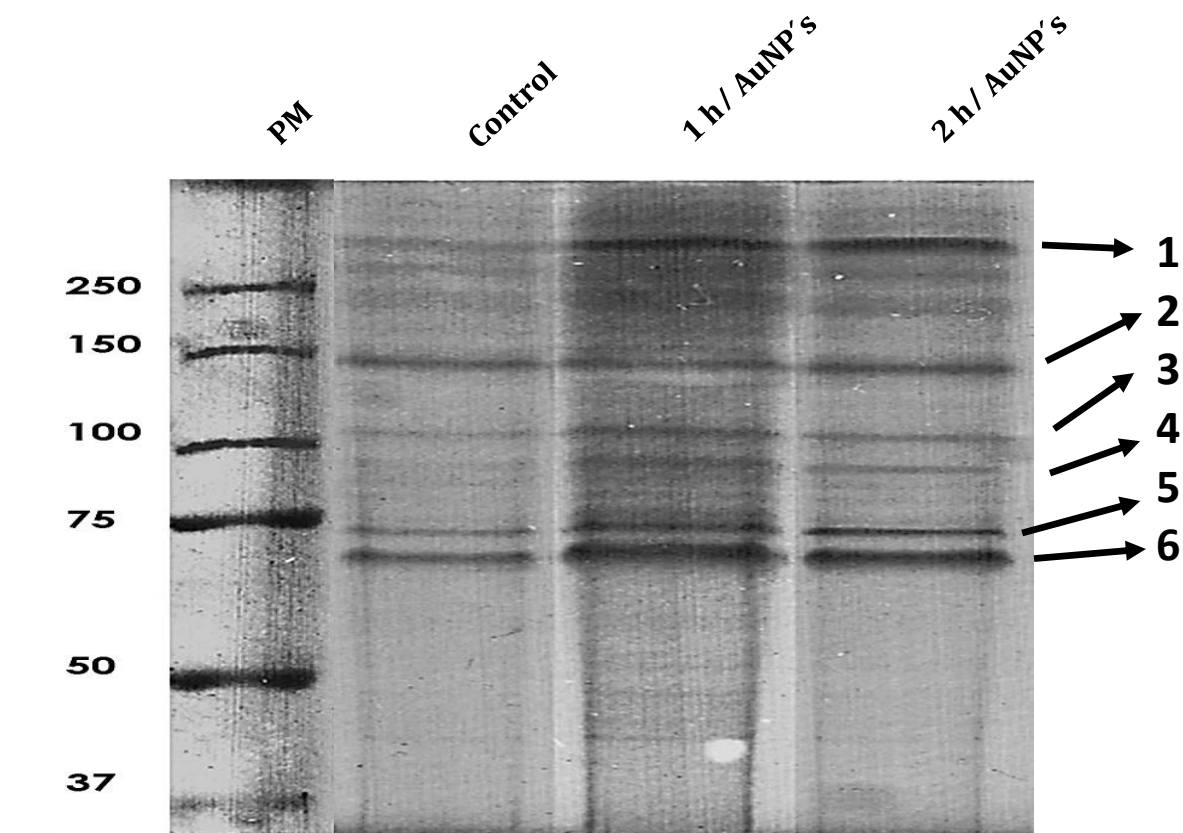


Figura 14. Análisis de la expresión de las proteínas de membrana de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. (a) Gel SDS-PAGE al 12 % de las proteínas de membrana de cepa TIGR4 tratadas con 512 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP's. (b) Densidad óptica del análisis de las 6 bandas seleccionadas para su análisis con el programa Imagej. De las 6 bandas analizadas, 4 mostraron un cambio significativo en su expresión. Gel teñido con azul de Coomassie G250.

11. Proteínas secretadas obtenidas de las bacterias tratadas con AuNP's

Las proteínas secretadas obtenidas de las bacterias de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (Figura 15) tratadas con 512 µg/ml de AuNP's durante 4 horas, se corrieron en un gel SDS-Page al 12%, y el patrón de bandas se analizó con el programa Imagej para obtener la densidad óptica y ver si existía variación en la expresión. Del patrón de bandeado obtenido se tomaron 6 bandas, debido a que estas mostraron un patrón más claro en el gel. A las bandas se le asignó un número del 1 al 6 para su análisis y poder comparar su expresión con respecto al control.

Los pesos moleculares de estas bandas son:

Tabla 5. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas secretadas de *S. pneumoniae* R6. A las bandas seleccionadas se le calculo el peso molecular y se analizaron en el programa Imagej.

Numero de banda	Peso molecular aproximado en kDa
1	251.1
2	101
3	87.4
4	64.3
5	50.8
6	40.1

Las bandas seleccionadas y analizadas obtenidas de las proteínas secretadas de la cepa R6 de *S. pneumoniae*, tienen un peso molecular que van de los 251.1 kDa hasta los 40.1 kDa. De las 6 bandas que se tomaron para analizar, 4 de ellas muestran un cambio en su expresión (2, 3, 5 y 6).

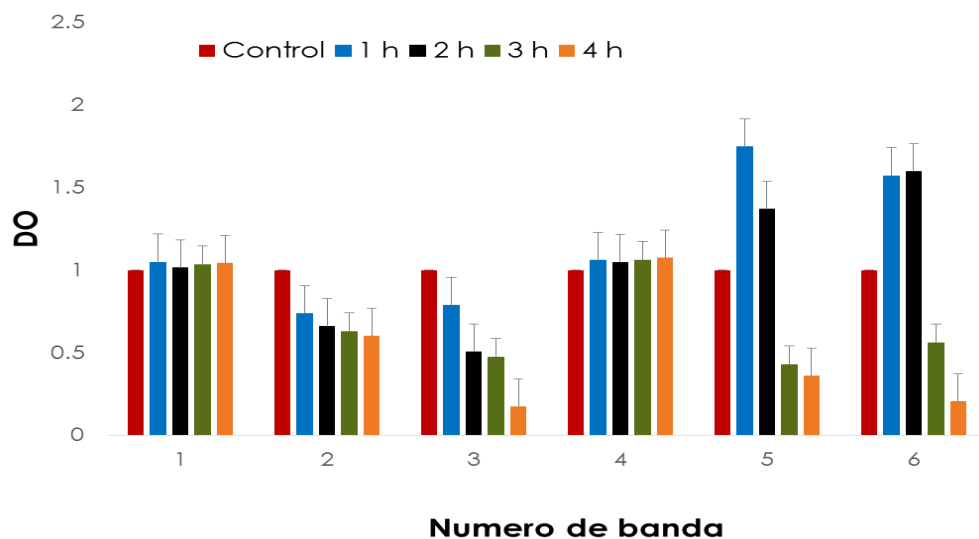
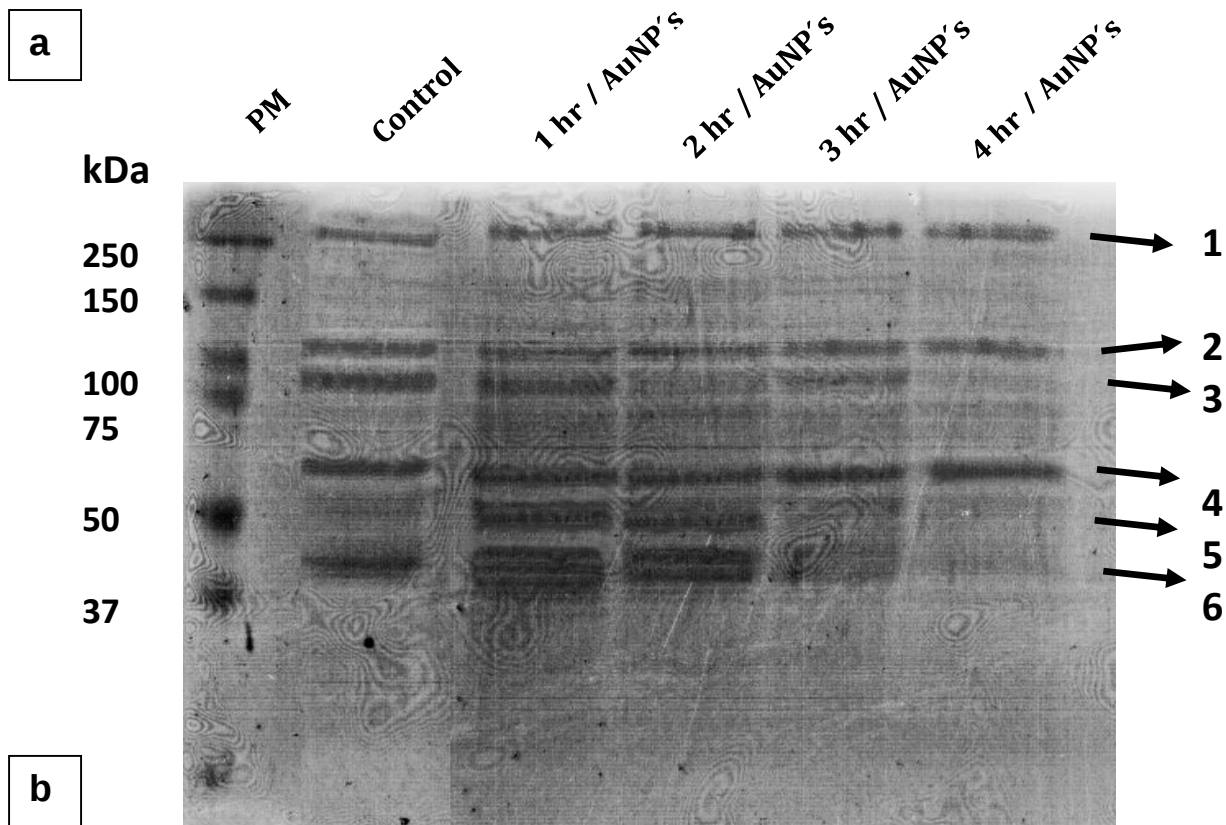


Figura 15. Análisis de la expresión de las proteínas secretadas de la cepa R6 de *S. pneumoniae*. (a) Gel SDS-PAGE al 12 % de las proteínas secretadas de cepa R6 tratadas con 512 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP's. (b) Densidad óptica del análisis de las 6 bandas seleccionadas para su análisis con el programa Imagej. De las 6 bandas analizadas, 4 mostraron un cambio significativo en su expresión. Gel teñido con azul de Coomassie G250.

Las proteínas secretadas obtenidas de las bacterias de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* (Figura 16) tratadas con 512 µg/ml de AuNP's durante 4 horas, se corrieron en un gel SDS-Page al 12%, y el patrón de bandas se analizó con el programa Imagej para obtener la densidad óptica y ver si existía variación en la expresión. Del patrón de bandeo obtenido se tomaron 6 bandas, debido a que estas mostraron un patrón más claro en el gel. A las bandas se le asignó un número del 1 al 6 para su análisis y poder comparar su expresión con respecto al control.

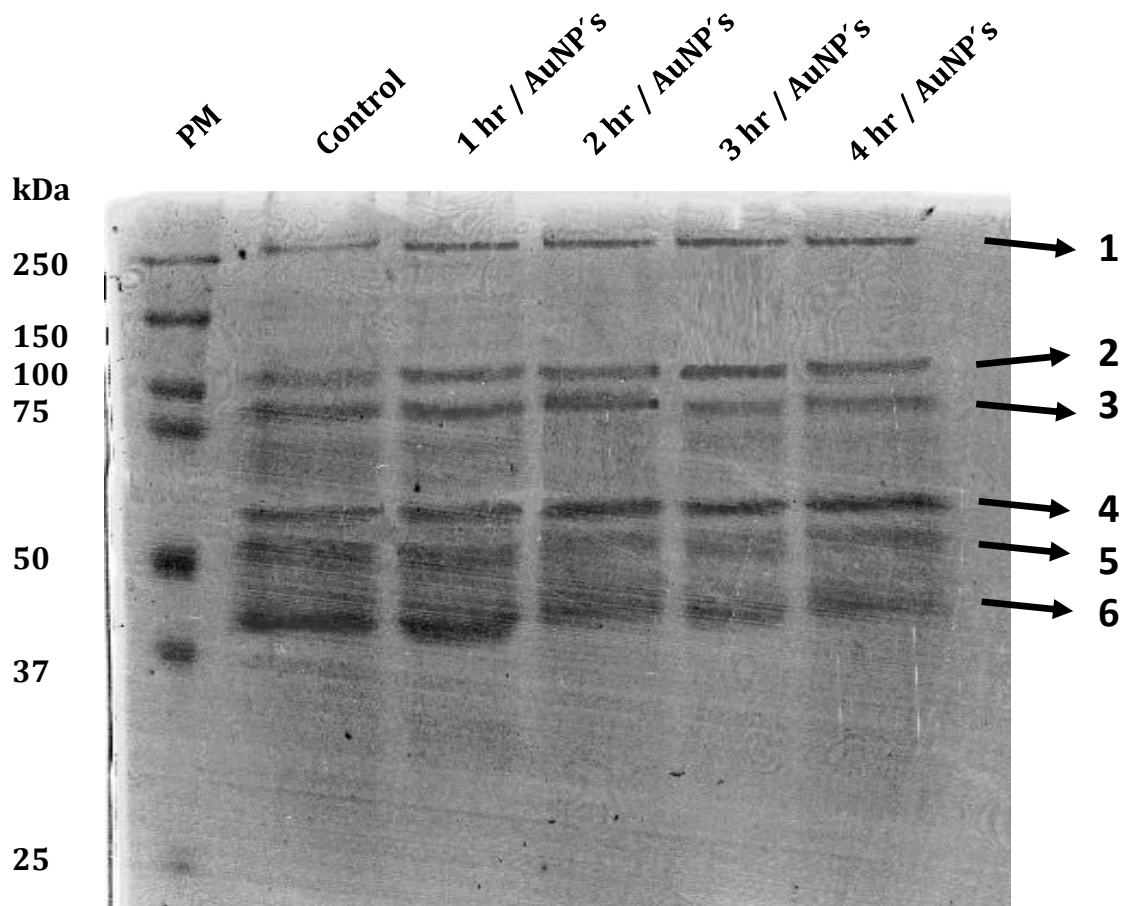
Los pesos moleculares de estas bandas son:

Tabla 6. Numero de bandas y peso moleculares de las proteínas secretadas de *S. pneumoniae* TIGR4. A las bandas seleccionadas se le calculo el peso molecular y se analizaron en el programa Imagej.

Numero de banda	Peso molecular aproximado en kDa
1	282.3
2	149.7
3	106.5
4	91.3
5	73.6
6	69.4

Las bandas seleccionadas y analizadas obtenidas de las proteínas secretadas de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*, tienen un peso molecular que van de los 282.3 kDa hasta los 69.4 kDa. De las 6 bandas que se tomaron para analizar, 4 de ellas muestran un cambio en su expresión (1, 4, 5 y 6).

a



b

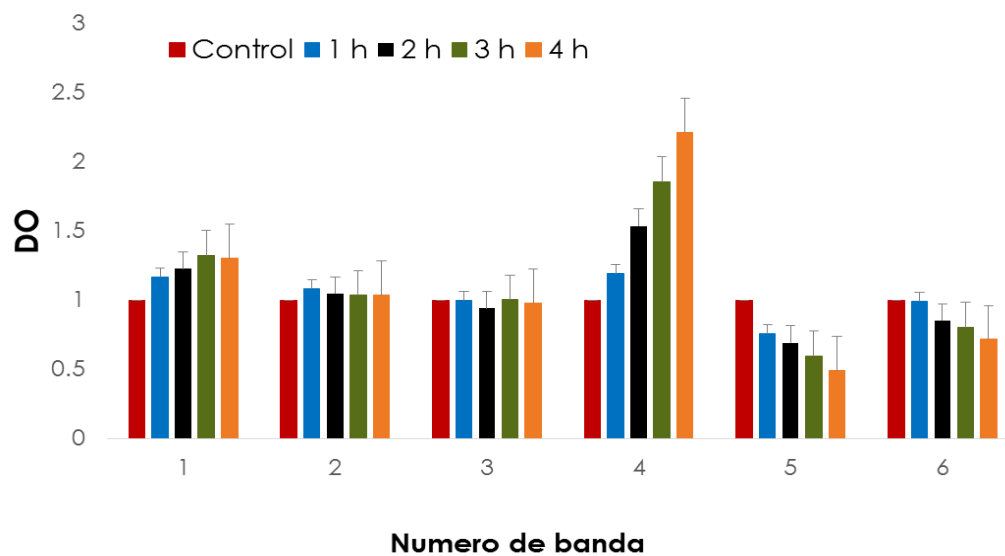


Figura 16. Análisis de la expresión de las proteínas secretadas de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*. (a) Gel SDS-PAGE al 12 % de las proteínas secretadas de cepa TIGR4 tratadas con 512 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP's. (b) Densidad óptica del análisis de las 6 bandas seleccionadas para su análisis con el programa Imagej. De las 6 bandas analizadas, 4 mostraron un cambio significativo en su expresión. Gel teñido con azul de Coomassie G250.

12. Visualización de la interacción de las AuNP's en *S. pneumoniae*

Para poder visualizar la forma y la estructura donde las AuNP's interaccionan con las cepas de *S. pneumoniae*, se realizó TEM de corte, esto para determinar si las interacciones se quedan a nivel superficial o existían un ingreso al citosol. La concentración que se utilizó como tratamiento 512 µg/mL de AuNP's, que demostró tener un efecto bactericida. Las imágenes obtenidas de TEM de las cepas R6 (Figuras 17-19, a-c) y TIGR4 (Figuras 17-19, d-f), fueron tomadas a los 30 min, 1, 2 y 3 horas de tratamiento con AuNP's.

Durante los primeros 30 minutos de tratamiento con AuNP's, en ambas cepas se observa la presencia y aglomeración de las AuNP's en la periferia de las bacterias. A la primera hora de tratamiento con AuNP's, estas mostraron tener un acercamiento a la membrana bacteriana e inicia la interacción AuNP-bacteria. Después de dos horas de tratamiento, se observa que las AuNP's ingresaron a la bacteria formando lo que denominamos "cuerpo de inclusión de nanopartículas". Adicionalmente a esta estos cuerpos de inclusión, las AuNP's, se observa que para ingresar al citosol bacteriano, los cuerpos de inclusión desestabilizaron la membrana, capsula y pared para lograr ingresar, y en este proceso se advierte la formación de lo que parece un poro que permite el ingreso de los cuerpos de inclusión a la bacteria. A las 3 horas de tratamiento, el daño generado por las AuNP's es demasiado importante que lleva a la lisis bacteriana.

Al observar que los cuerpos de inclusión no son un evento fortuito, y su presencia era constante en múltiples bacterias, se realizó un conteo manual de las imágenes obtenidas por TEM de cada cepa y obtener el número de bacterias que presentaban uno o más cuerpos de inclusión de los que no. Estos datos se muestran en la tabla 7.

Estos datos muestran la generación de los cuerpos de inclusión de nanopartículas el cual es capaz de hacer una desestabilización en la membrana, la cual lleva a la

formación de lo que creemos es un poro, que tiene como consecuencia la pérdida de la homeostasis bacteriana y la lisis de esta.

Tabla 7. Promedio de los cuerpos de inclusión presentes en las bacterias. Se contaron manualmente las bacterias que presentaban y no cuerpos de inclusión después del tratamiento con AuNP's en 10 campos distintos.

<i>Cepa bacteriana</i>	Bacterias con cuerpo de inclusión	Bacterias sin cuerpos de inclusión	Total
<i>R6</i>	72	25	97
<i>TIGR4</i>	68	31	99

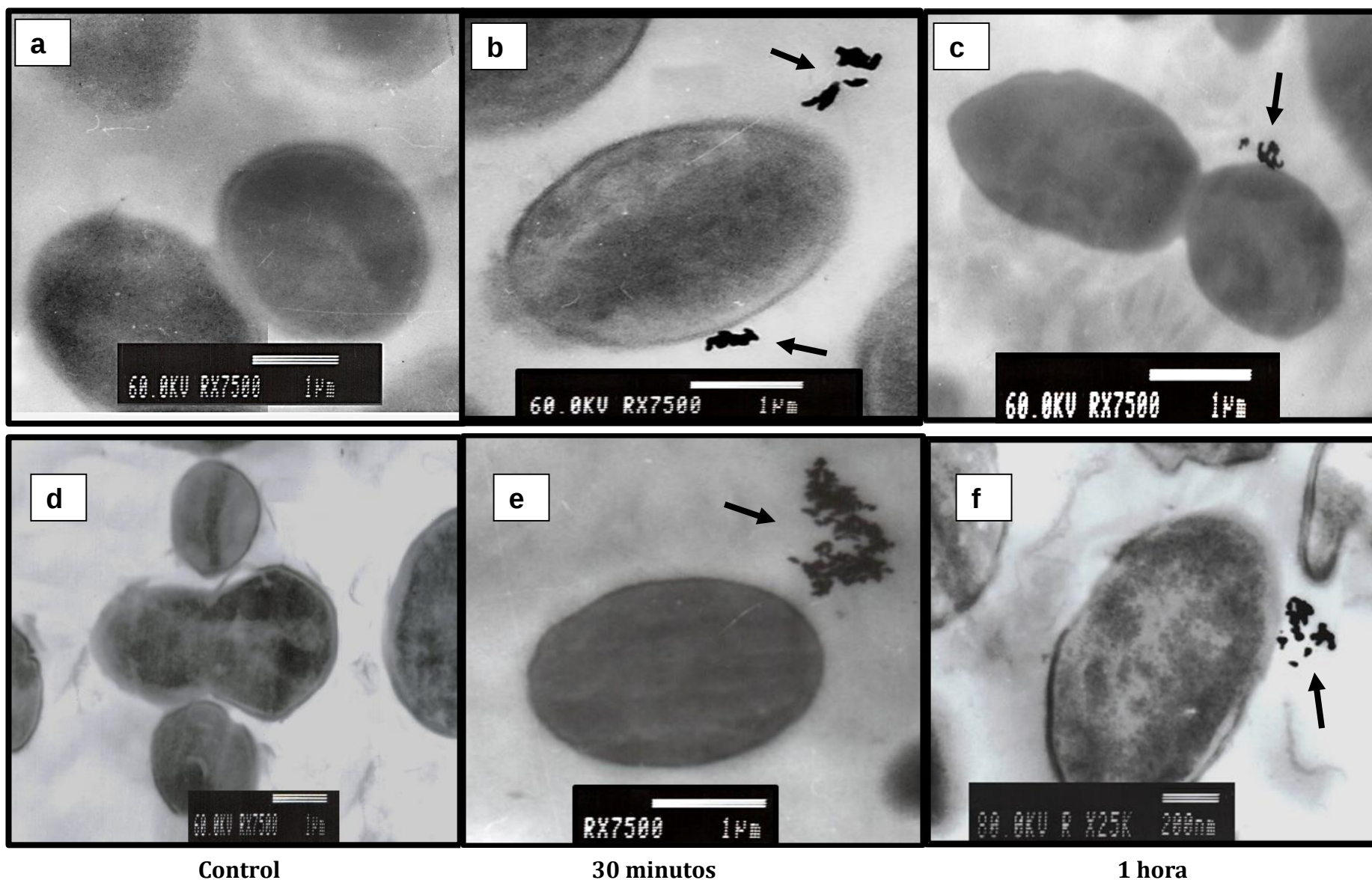
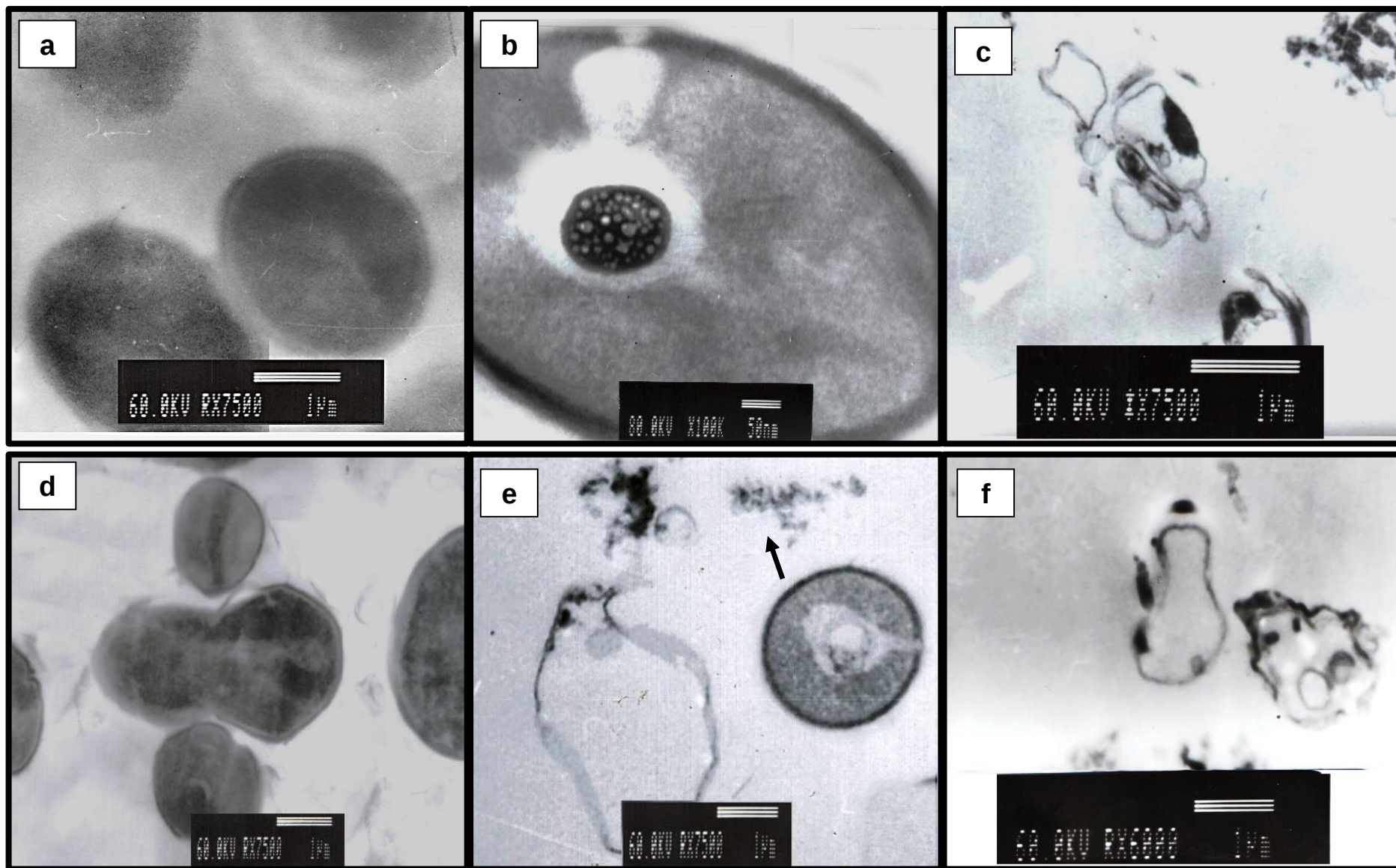


Figura 17. TEM de las interacciones de los cuerpos de inclusión con *S. pneumoniae*. En las cepas R6 (a-c) y TIGR4 (d-f), a los 30 min se pueden ver las AuNP's aproximándose a la bacteria (flecha), mientras que con 1 h de tratamiento, las AuNP's inician una interacción con la superficie bacteriana (flecha).



Control

2 horas de tratamiento

3 horas de tratamiento

Figura 18. TEM de las interacciones de los cuerpos de inclusión con *S. pneumoniae*. En las cepas R6 (a-c) y TIGR4 (d-f), a las 2 horas de tratamiento se puede ver la formación de los cuerpos de inclusión de las nanopartículas (flecha), las cuales permiten la entrada de las AuNP's, debido a la formación de un poro (flecha) en la membrana. A las 3 horas de tratamiento, el daño es tan importante que provoca la lisis bacteriana.

VIII. Discusión

En la presente tesis logramos demostrar que las AuNP's son capaces de generar un efecto bacteriostático y bactericida en *S. pneumoniae* dependiendo de la concentración que se esté utilizando. Y son capaces de acidificar el pH del medio donde crece *S. pneumoniae* y generar los cuerpos de inclusión de nanopartículas las cuales logran desestabilizar la membrana bacteriana generando un posible poro, y la lisis bacteriana.

Es espectro de tamaños en la que se puede sintetizar las AuNP's es infinito, por lo que se ha discutido y se sigue discutiendo las características que deben presentar las NP's para generar una actividad antimicrobiana. Se ha reportado en *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, la utilización de NP's en el rango de 10 – 100 nm, siendo las de 20 nm y funcionalizadas con PEG las más eficaces en la generación de un efecto bactericida. De estos reportes partimos para implementar las AuNP's funcionalizadas con PEG como un posible agente bactericida para *S. pneumoniae*.

La metodología empleada para la síntesis de las AuNP's fue descrita por Turkevich y col. en 1963, a la cual le realizamos algunas variantes. Las modificaciones en la temperatura de 100°C a 320°C y el aumento de la concentración de citrato de sodio a 18 mL, provee más energía al sistema, y aumenta la velocidad de reacción al ocasionar que haya más colisiones entre las partículas de oro. De acuerdo con lo reportado por Turkevich y col., su síntesis tiene como resultado de la síntesis AuNP's de entre 9 – 120 nm. Con las modificaciones realizadas logramos tener una metodología donde la uniformidad en el tamaño de las AuNP's sintetizadas es de 20 ± 0.9 nm.

La falta de un convenio, manual, o datos que definan una concentración y forma de administrar las AuNP's en un MIC, utilizamos las concentraciones mínimas inhibitorias establecidas por la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; www.clsi.org), teniendo como punto de corte para *S. pneumoniae* en la eritromicina de 0.03 - 0.125 µg/ml. El tratamiento con estas concentraciones no tuvo efecto sobre el crecimiento de las cepas, las cuales presentaron un comportamiento igual al control (sin tratamiento con AuNP's), razón por la cual se aumentaron gradualmente las concentraciones hasta

encontrar una bactericida. En este aumento de concentraciones, encontramos 4 que tienen un efecto directo en el crecimiento de las cepas de *S. pneumoniae*, las cuales son de 128, 256, 512 y 1024 µg/ml de AuNP's. Siendo las concentraciones de 128 y 256 µg/ml de AuNP's, una concentración bacteriostática, debido a que solo limita el crecimiento bacteriano. Caso contrario a lo que pasa a las concentraciones de 512 y 1024 µg/ml de AuNP's, donde a las 4 horas de tratamiento se ve una disminución evidente en el crecimiento y a las 6 horas la muerte bacteriana.

Los modelos y propuestas que tratan de explicar la manera en que las NP's ejercen su efecto bactericida es diversa. De los modelos propuestos nosotros abordamos tres de ellas, que son: generación de radicales libres (ROS), cambio en el pH e interacción bacteria.

La cuantificación de ROS en específico H_2O_2 , no mostro tener un aumento es su producción en las cepas de *S. pneumoniae* por el tratamiento con AuNP's. No debemos olvidar que *S. pneumoniae* es un colonizador de las vías respiratorias superiores, donde se presenta un gran estrés oxidativo. Por lo que *S. pneumoniae* ha generado mecanismo por los cuales es capaz de revertir el daño que genera ROS. La explicación de porqué el tratamiento no provoca un aumento en la producción de ROS en *S. pneumoniae* es sencilla. *S. pneumoniae* expresa 4 enzimas que están implicadas en la eliminación de los ROS que son producidos por el metabolismo bacteriano y el estrés oxidativo que pudiera estar generado por las AuNP's. Estas enzimas son la NADH oxidasa, la cual convierte el oxígeno molecular (O_2) en H_2O . La superóxido dismutasa, que convierte el O_2^- a H_2O_2 y oxígeno molecular. La peroxidasa de tiol, eliminando en O_2^- y H_2O y la hidropoxidasa de alquilo, la cual transforma los compuestos de H_2O_2 a OH^- y H_2O .

Estas enzimas le dan a *S. pneumoniae* un mecanismo para sobrevivir en un ambiente con un alto estrés oxidativo como son las vías respiratorias superiores. Este mecanismo ayuda a tolerar el posible estrés oxidativo que pudiera estar generándose por el tratamiento con AuNP's.

El análisis del pH no es más que una medición de la concentración de H^+ , por lo que este cambio afectara el crecimiento y la viabilidad bacteriana. El inicio del pH en el medio de cultivo Todd Hewitt solo, es de 8.6. Al adicionar una concentración de 521 y 1024 $\mu\text{g/mL}$ de AuNP's, la disminución en el pH es de 1.2 unidades después de 10 horas de tratamiento. La acidificación en el pH es dependiente de la concentración de AuNP's, así que entre mayor sea la concentración, el pH del medio será menor. Nosotros somos los primeros en abordar los cambios en el pH debido al tratamiento con AuNP's, y pudimos observar que existen un cambio y pudiera ser el responsable de la pérdida de viabilidad de *S. pneumoniae*.

El análisis de un perfil de proteínas secretadas y de membrana, nos permitió identificar diferencia en la expresión en ambas cepas cuando son expuestas a un tratamiento de AuNP's. La diferencia se hizo más significativa en las proteínas de membrana, esto puede ser debido a que en esta estructura bacteriana, es donde se tendría uno de las primeras interacciones AuNP's-bacteria. Cui y col. (2012) da uno de los hallazgos más importantes en *E. coli*, identificando cambio en la expresión de 165 proteínas diferentes.

La búsqueda de una interacción entre las AuNP's y *S. pneumoniae*, nos mostró mediante TEM de corte, que la interacción de AuNP's-bacteria no se queda a nivel de membrana, observamos que las AuNP's se internalizan formando los cuerpos de inclusión de nanopartículas, las cuales miden aproximadamente 100 nm. Refiriendo a la bibliografía, algunos autores hacen mención de la internalización de las NP's, pero ninguno habla del tamaño o como es que son capaces de entrar a la bacteria.

Los cuerpos de inclusión se pueden identificar a partir de las 2 horas de tratamiento con AuNP's, y van aumentando su tamaño entre más tiempo de tratamiento se tenga, lo que genera la lisis bacteriana.

Hasta el momento no existe una explicación de cómo es que las AuNP's generan su efecto bactericida, pero en este caso se propone un posible modelo por el cual las AuNP's lisan las bacterias (Figuras 19-21).

Al funcionalizar las AuNP's con PEG, les confiere las propiedades de ser inertes, con una baja toxicidad, no inmunogénica, incrementar su solubilidad y generar un entorno hidrófobo; pero una de las características más importante es que le confiere una pequeña carga positiva. Esta pequeña carga le permite interaccionar con la pared y la membrana (Figura 18 y 19), las cuales presentan una carga negativa, adicionando a la carga negativa que presenta el ácido teicoico y ácido lipoteicoico (Figura 19 y 21), por interacción electrostática permiten la unión de las AuNP's con la bacteria.

Al secuestrar a los peptidoglicanos de la pared y los fosfolípidos de la membrana (Figura 20) genera una especie de micela, la cual es el inicio de la formación de los cuerpos de inclusión. Las AuNP's que tienen contacto con la capsula y la membrana, se quedan unidas a estas estructuras (Figura 21), provocando la generación de un poro, por el cual las demás AuNP's pueden ingresar a la bacteria.

La formación del poro y la entrada de más AuNP's, las cuales siguen secuestrando los peptidoglicanos y los fosfolípidos, se empiezan a unir y formar un cuerpo de inclusión más grande. Esto es favorecido por el PEG, al formar un microambiente hidrófobo, los fosfolípidos permiten estar en un ambiente encapsulado y estable.

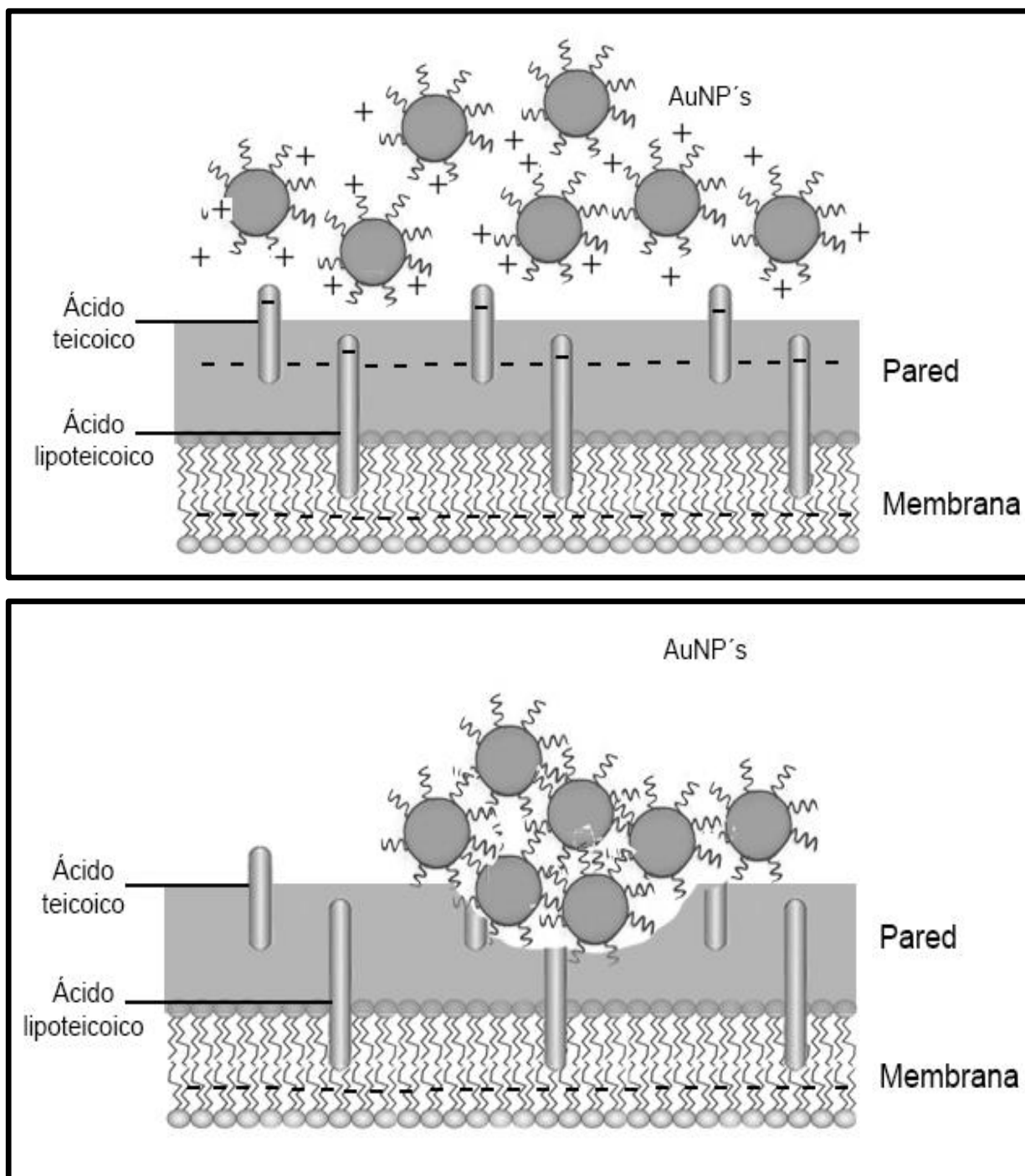


Figura 18. Modelo propuesto de interacción de las AuNP's con las bacterias. La carga positiva que le da el PEG a las AuNP's, permite una interacción electrostática con la pared y la membrana de la bacteria, lo que facilita la entrada de las AuNP's a la bacteria.

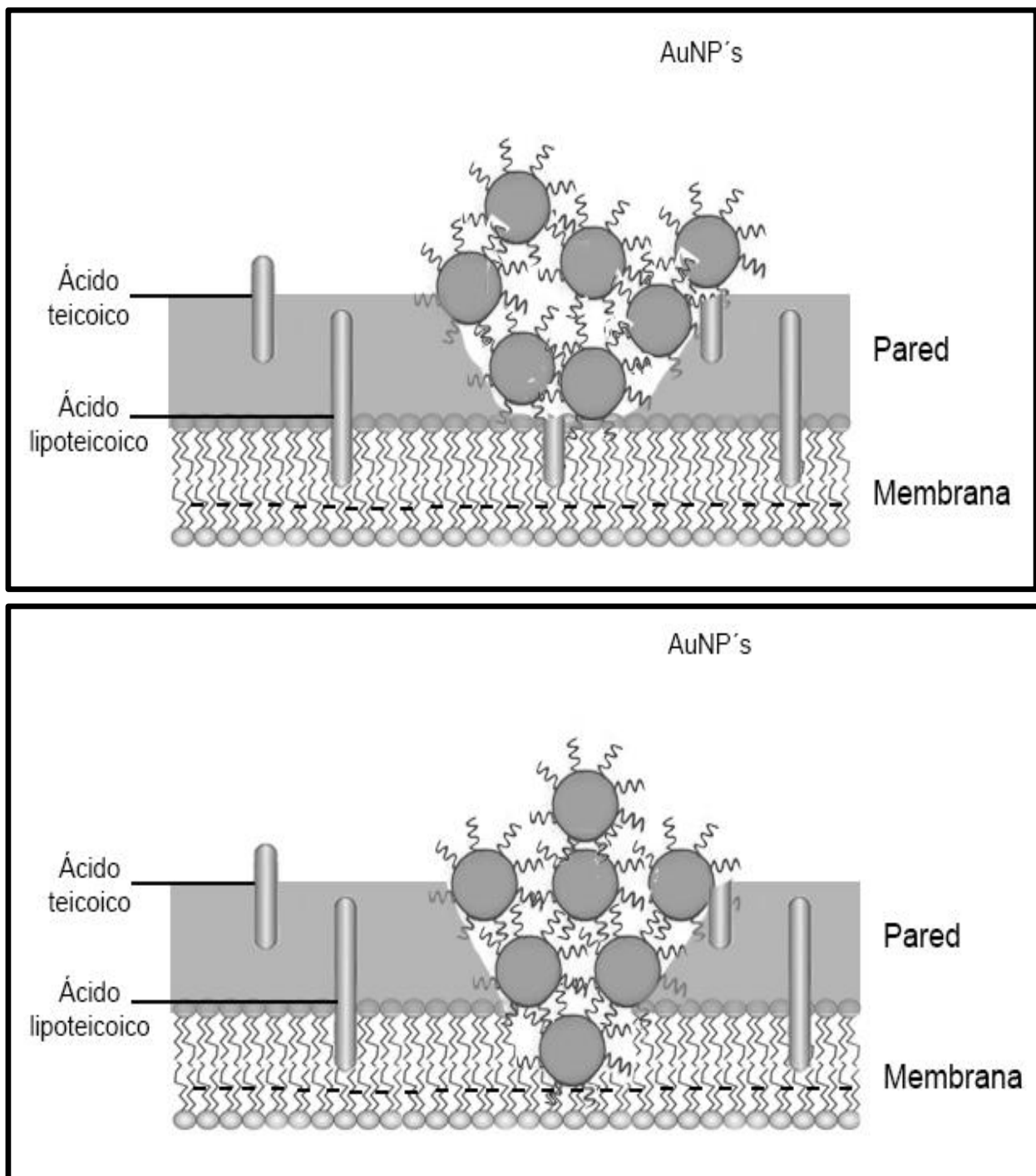


Figura 19. Modelo propuesto para la formación de un posible poro. La interacción electrostática de las AuNP's con la pared y la capsula, genera el secuestro de los peptidoglicanos de la pared y los fosfolípidos, lo que genera la formación de un poro.

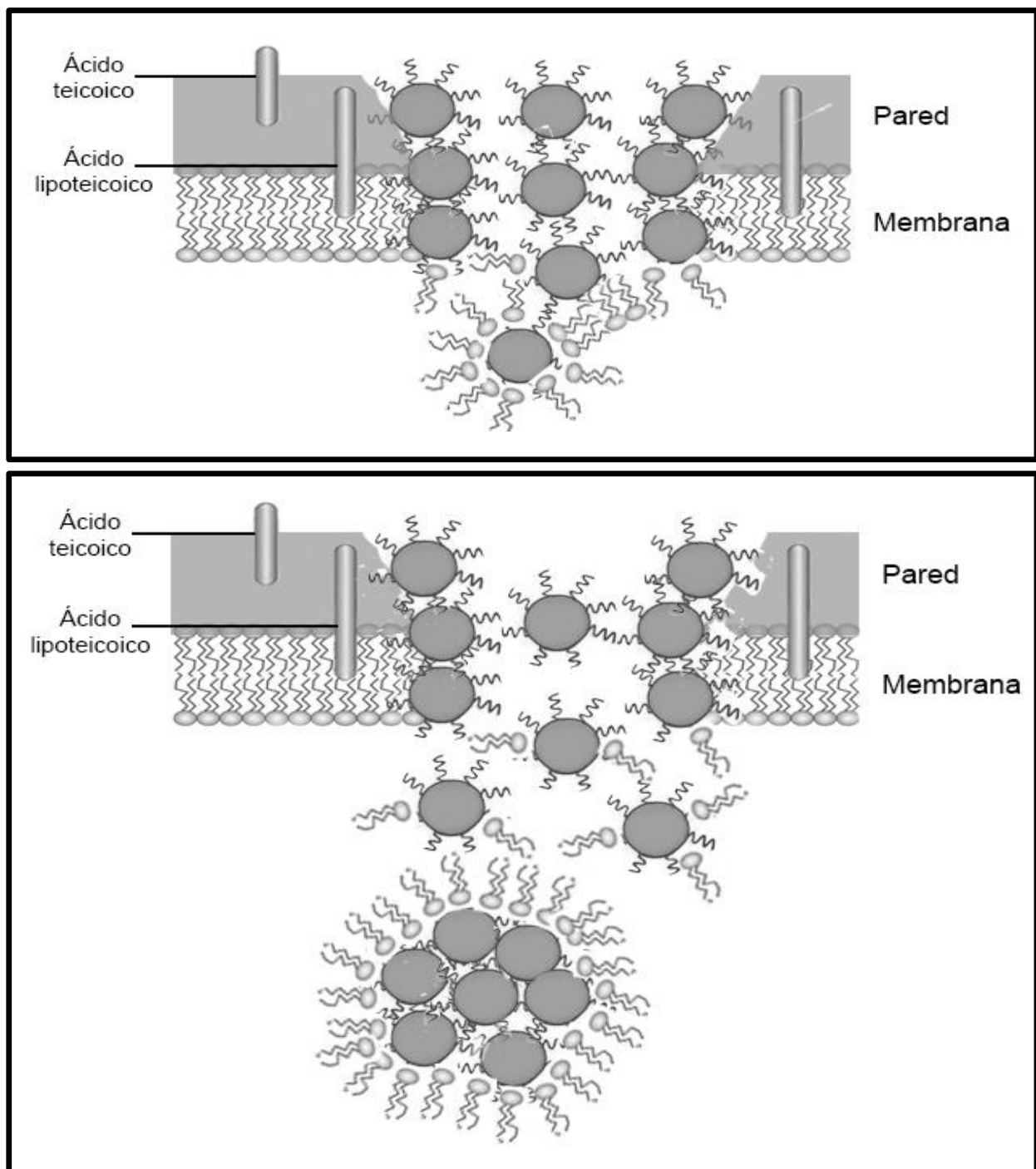


Figura 20. Formación de los cuerpos de inclusión de nanopartículas. El secuestro de los fosfolípidos, permite una estructura estable de las AuNP's en el citosol bacteriano. La formación del poro y el cuerpo de inclusión, llevara a la lisis de la bacteria y la muerte de esta.

IX. CONCLUSIÓN

El tratamiento con AuNP's en las cepas R6 y TIGR4 de *S. pneumoniae*, tienen un efecto bacteriostático a concentraciones menores a 512 µg/mL de AuNP's y bactericida a partir de esta concentración, lo que nos permite sentar un precedente sobre las concentraciones efectivas de AuNP's que se necesitan para lisar a la bacteria *S. pneumoniae*.

El análisis del perfil proteico nos mostró un cambio en la expresión de las proteínas de membrana y secretadas, lo que nos abre un camino para identificar las y poder aclarar como *S. pneumoniae* enciende sus mecanismos de defensa para evitar el daño provocado por las AuNP's.

La generación de ROS no mostro un aumento en su producción en *S. pneumoniae* al ser tratadas con AuNP's, porque las pequeñas concentraciones que se producen, no son suficientes para provocar un daño.

Sin embargo, el análisis del efecto de las AuNP's sobre el pH del medio de cultivo, se observó una disminución gradual de pH al tratar las bacterias con AuNP's, y esta disminución de pH es proporcional a la concentración de AuNP's que administra.

El resultado más importante fue el obtenido mediante TEM, donde pudimos observar la formación de los cuerpos de inclusión de nanopartículas, las cuales proponemos se forman por el secuestro de los peptidoglicanos de la pared y los fosfolípidos de la membrana. Proponemos que el secuestro de estos elementos, genera la formación de un poro, lo que hace que se pierda la homeostasis de la bacteria al salir el material citosólico, la desestabilización de la membrana y por consecuencia, la lisis bacteriana.

Los resultados obtenidos nos dan el primer paso para el entendimiento y tratar de explicar el mecanismo por el cual las AuNP's generan su efecto bactericida, al menos en *S. pneumoniae*.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pasteur L., Chamberland M. and Roux E. (1881). Sur une maladie nouvelle, provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. Compt Rend Acad Sci. 92:159-65.
2. Sternberg G. (1881). The pneumonia-coccus of Friedlander (*Micrococcus Pasteuri*, Sternberg). Am. J Med Sci. 90:106-23.
3. Musher D. (1995). *Streptococcus pneumoniae*. En Mandell-Douglas-Bennet. Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. Cuarta edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap 178.
4. Avery O., MacLeod C. and McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction if transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med. 79:137-57.
5. Hardie J. (1986). Genus *Leuconostoc*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 6th ed. Vol. 2. P.H. Sneath (Ed.), Williams and Wilkins Co, Baltimore. pp 1043-1061.
6. Deibel H. and Seeley W. (1974). Family II. Streptococcaceae In: Buchanan RE, Gibbons NE (Ed.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 490-515.
7. Rotta J. (1986). Pyogenic Hemolytic Streptococci. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2. Williams and Wilkins Co. USA. pp 1052.
8. Trombe C., Laneelle A., and Laneelle G. (1979). Lipid composition of aminopterin-resistant and sensitive strains of *Streptococcus pneumoniae*. Effect of aminopterin inhibition. Biochim Biophys. 574: 290-300.
9. Coffey J., Enright C., Daniels M., Morona K., Morona R., Hryniewicz W., Paton C. and Spratt G. (1998). Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol. 27:73-83.

10. Henrichsen J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 33:2759-2762.
11. Weinberger D., Malley R. and Lipsitch M. (2011). Serotype replacement in disease following pneumococcal vaccination: A discussion of the evidence. Lancet. 378(9807):1962–1973.
12. Dámaso D., Moreno-López M. and Daza M. (1984). Betalactaminas I. Penicilinas. Antibióticos y quimioterápicos antibacterianos. Uso clínico. Grutesa, Madrid. pp 119-168.
13. Avery T., MacLeod C., and McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exp. Med. 79:137-158.
14. Iannelli F., Pearce J. and Pozzi G. (1999). The type 2 capsule locus of *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. 181:2652–2654.
15. Hoskins J., Alborn W., Arnold J., Blaszczyk L., Burgett S., Bradley B., Estrem S., Fritz L., Fu D., Fuller W., Geringer C., Gilmour R., Glass J., Khoja H., Kraft A., Lagace R., LeBlanc D., Lee L., Lefkowitz E., Lu J., Matsushima P., McAhren S., McHenney M., McLeaster K., Mundy C., Nicas T., Norris F., O'Gara M., Peery R., Robertson G., Rockey P., Sun P., Winkler M., Yang Y., Young-Bellido M., Zhao G., Zook C., Baltz R., Jaskunas S., Rosteck P., Skatrud P. and Glass J. (2001). Genome of the Bacterium *Streptococcus pneumoniae* Strain R6. J Bacteriol. 183(19): 5709–5717.
16. Tettelin H, Nelson K., Paulsen I., Eisen J., Read T., Peterson S., Heidelberg J., DeBoy R., Haft D., Dodson R., Durkin A., Gwinn M., Kolonay J., Nelson W., Peterson J., Umayam L., White O., Salzberg S., Lewis M., Radune D., Holtzapple E., Khouri H., Wolf A., Utterback T., Hansen C., McDonald L., Feldblyum T., Angiuoli S., Dickinson T., Hickey E., Holt I., Loftus B., Yang F., Smith H., Venter J., Dougherty B., Morrison D., Hollingshead S. and Fraser C. (2001). Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science 293: 498-506.

17. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2004). Manual para la vigilancia de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Colombia: Instituto Nacional de Salud. 1-177.
18. Gómez-Barreto D, Calderón-Jaimes E., Rodríguez R., Monteros L. and Juárez M. (1999). Características clínico-microbiológicas de la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina. *Salud Publica Mex.* 41:397-404.
19. Henrichsen J. (2001). Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 2. Elsevier Science. 182:11-117.
20. Jansson P., Lindberg B. and Lindquist U. (2001). Structural studies of the polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 4. Elsevier Science. 95:73-80.
21. Bentley S., Aanensen D., Mavroidi A., Saunders D., Rabinowitsch E., Collins M., Donohoe K., Harris D., Murphy L., Quail M., Samuel G., Skovsted I., Kalløft M., Barrell B., Reeves P., Parkhill J. and Spratt B. (2006). Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet.* 2(e31):0262-0269.
22. Li Y., Weinberger D., Thompson C., Trzcinski K. and Lipsitch M. (2013). Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. *Infect. Immun.* 81(12):4519-24.
23. Preado J. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS. *Rev Chil Infect.* 18 (1): 6 -9.
24. Gómez D., Rodríguez S., Calderón E. and Espinosa L. (2001). Bases fisiopatológicas para la prevención de las infecciones por *streptococcus pneumoniae*. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 58(12):1665-1146.
25. Obaro S., Adegbola R., Banya W. and Greenwood B. (1996). Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination (letter). *Lancet.* 348(9022):271-272.
26. Cockeran R., Anderson R. and Feldman C. (2005). Pneumolysin as a vaccine and drug target in the prevention and treatment of invasive pneumococcal disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.).* 53(3):189-198.
27. Greenberg D. (2009). The shifting dynamics of pneumococcal invasive disease after the introduction of the pneumococcal 7-valent conjugated vaccine: toward the new pneumococcal conjugated vaccines. *Clin Infect Dis.* 49(2):213-215.

28. Ericibengoa M., Arostegi N., Marimon J., Alonso M. and Perez-Trallero E. (2012). Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal carriage in healthy children attending a day care center in northern Spain. Influence of detection techniques on the results. BMC Infectious Diseases. 12:69.
29. Mufson M. (1990). *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell G.L., Douglas R.D., Bennett J.E. (Eds). Principles and practice of infectious diseases (3ª Ed.). Churchill Livingstone Inc. New York. 1539-1544.
30. Sternberg G. (1881). A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. National Board of Health Bulletin. 2:781-783.
31. Liñares J., Gracia D. and Alonso T. (1989). *Streptococcus pneumoniae*: Desarrollo de resistencia a los antibióticos en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1: 53-58.
32. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Neumonía, Nota descriptiva N°331. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>. Consultado 26 de agosto de 2014.
33. Agudelo B. (2013). Tratamiento de la neumonía por *Streptococcus pneumoniae* y consideraciones de resistencia. Neumol Pediatr. 8(2):86-90.
34. Jorgensen J., Ferraro M., McElmeel M., Spargo J., Swenson J. and Tenover J. (1994). Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance by use of the E Test. J Clin Microbiol. 32:159-163.
35. Pallarés R., Liñares J., Vadillo M., Cabellos C., Manresa F., Fernández-Viladrich P., Martín R. and Gudiol F. (1995). Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumoniae in Barcelona, Spain. N Engl J Med. 333:474-480.
36. Dessen A., Mouz N., Gordon E., Hopkins J. and Dideberg O. (2001). Crystal structure of PBP 2x from highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. J Biol Chem. 276:106-112.
37. Hakenbeck R., Kaminski K., König A., Linden M., Paik J. and Reichmann P. (2012). Penicillin-binding proteins in β -lactam resistant *Streptococcus pneumoniae*. Future Microbiol. 7(3):395-410.

38. Ikezawa N. (2001). "Nanotechnology: Encounters of Atoms, Bits and Genomes", NRI papers, 37. Nomura Research Institute. Diciembre. <http://www.nri.co.jp/english/opinion/papers/2001/pdf/np200137.pdf>.
39. Sargent J. Jr. (2014). The National Nanotechnology Initiative: Overview, Reauthorization and Appropriations Issues. Congressional Research Service. <https://www.fas.org/sgp/crs/misc/RL34401.pdf>.
40. Invernizzi N. and Foladori G. (2005). El despegue de las nanotecnologías. CIENCIA ergo sum, Vol. 12-3, 321-327.
41. Tomalia D. (2009). In quest of a systematic framework for unifying and defining nanoscience. *J. Nanoparticle Res.* 11, 1251–1310.
42. Royal Society, UK National Academy of Science and the Royal Academy of Engineering, 2004.
43. Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider Y. and Préat V. (2006). Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release*. 116:1-27.
44. Clavijo D., García G., Mejía O., Ruiz A., Cardona A., Torrado C. and Mejía M. (2007). La frontera entre la biología molecular y la nanotecnología y su impacto en la medicina. *Iatreia*. 20:297-307.
45. Nuñez R. and Haza H. (2012). Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. *Revista CENIC, Ciencias biológicas*, 43 (3). Versión electrónica <http://revista.cnice.edu.cu/revistaCB>.
46. Lechuga M. (2011). Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud. 9º edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana. https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/farmavet/amgen.es/web/archivos/biotecnologia9/7_Nanomedicina.pdf.
47. Petros R. and DeSimone J. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9 (8):615-627.
48. Benyettou F., Hardouin J., Lecovey M., Jouni H. and Motte L. (2012). PEGylated Versus Non-PEGylated $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ @Alendronate Nanoparticles. *J Bioanal Biomed*. 4(3):39-045.

49. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2004). Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cnts/pdfs/LABS-manual-vigilancia-serotipos.pdf>. Consultado 30 julio 2013.
50. Prado V. (2001). Conceptos microbiológicos de *S. pneumoniae*. *Rev Chil Infect*; 18 (1): 6-9.
51. 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.
52. Henriques-Normark B. and Tuomanen E. (2013). The Pneumococcus: Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 3:a010215.
53. Gray B., Turner M. and Dillon Jr H. (1982). Epidemiologic studies of *S. pneumoniae* in infants: The effects of season and age on pneumococcal acquisition and carriage in the first 24 months of life. *Am J Epidemiol*; 116:692–703.
54. Myers C. and Gervaix A. (2007). *S. pneumoniae* bacteraemia in children. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30S; S24–S28.
55. Kadioglu A., Weiser J., Paton J. and Andrew P. (2008). The role of *S. pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature* april; 6:288-301.
56. Nelson A., Roche A., Gould J., Chim K., Ratner A. and Weiser J. (2007). Capsule enhances pneumococcal colonisation by limiting mucus-mediated clearance. *Infect. Immun.*; 75:83–90.
57. King S., Hippe K. and Weiser J. (2006). Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 59:961–974.
58. Kadioglu A., Coward W., Colston M., Hewitt C. and Andrew P. (2004). CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect. Immun.*; 72: 2689–2697.

59. Orihuela C., Gao G., Francis K., Yu J. and Tuomanen E. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.*; 190, 1661–1669.
60. Hava D. and Camilli A. (2002). Large-scale identification of serotype 4 *S. pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45, 1389–1406.
61. Patra C., Bhattacharya R., Mukhopadhyay D. and Mukherjee P. (2010). Fabrication of Gold Nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer. *Adv Drug Deliv Rev.*; 62(3):346–361.
62. Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W. and Jahnke-Dechent W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*; 3:1941–1949.
63. Llabot J., Palma S. y Allemandi D. (2008). Nanopartículas poliméricas sólidas. *Farmacotecnia*; 53:40-49.
64. Moritz M. and Geszke-Moritz M. (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*; 228:596–613.
65. Kruszynska M., Borchert H., Parisi J. and Kolny-Olesiak J. (2010). Synthesis and shape control of CuInS₂ nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*; 132:15976–15986.
66. Chen C., Tsao T., Li W., Shen W., Cheng C., Tang J., Jen C., Chau L. and Wu W. (2010). Novel U-shaped gold nanoparticles-modified optical fiber for localized plasmon resonance chemical sensing. *Microsyst. Technol*; 16:1207–1214.
67. Kokura S., Handa O., Takagu T., Ishikawa T., Naito Y. and Yoshikawa T. (2010). Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomed. Nanotechnol*; 6:570–574.
68. Coffey T., Dowson C., Daniels M., Zhou J., Martin C., Spratt B. and Musser J. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *S. pneumoniae*. *Mol Microbiol*; 5: 2255-60.
69. Bogaert D., D Groot R. and Hermans P. (2004). *S. pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*; 4(3):144–154.

70. Faden H., Duffy L., Wasielewski R., Wolf J., Krystofik D. and Tung Y. (1997). Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis*; 175:1440–1445
71. Jadhav S., Gaikwad S., Nimse M. and Rajbhoj A. (2011). Copper oxide nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *J. Clust. Sci*; 22:121–129
72. Lee S., Song and Lee B. (2010). Antibacterial activity of silver nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Korean J. Chem. Eng*; 27:688–692
73. Marius S., Lucian H., Marius M., Daniela P., Irina G., Romeo-Iulian O., Simona D. and Viorel M. (2011). Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly (amide-hydroxyurethane) media. *J. Mater. Sci. – Mater. Med*; 22:789–796.
74. Gottesman R., Shukla S., Perkas N., Solovyov L., Nitzan Y. and Gedanken A. (2011). Sonochemical coating of paper by microbiocidal silver nanoparticles. *Langmuir*; 27:720–726.
75. Liu J., Luo Z. and Bashir S. (2013). A progressive approach on inactivation of bacteria using silver–titania nanoparticles. *Biomater. Sci*; 1:194–201.
76. Dong C., Cairney J., Sun Q., Maddan O., He G. and Deng Y. (2010). Investigation of $Mg(OH)_2$ nanoparticles as an antibacterial agent. *J. Nanopart. Res*; 12:2101–2109
77. Cui Y., Zhao Y., Tianb Y., Zhang W., Lü X. and Jiang X. (2012). The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials*; 33:2327–2333.
78. Thill A., Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Auffan M. and Flank A. (2006). Cytotoxicity of CeO_2 Nanoparticles for *Escherichia coli*. Physico-Chemical Insight of the Cytotoxicity Mechanism. *Environ. Sci. Technol*; 40 (19):6151–6156.

79. Zhou Y., Kong Y., Kundu S., Cirillo J. and Liang H. (2012). Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus Calmette-Guérin*. *Journal of Nanobiotechnology*; 10:19.
80. Feng Q., Wu J., Chen G., Cui F., Kim T. and Kim J. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, 52:662-668.
81. Webster T. (2009). *Safety of Nanoparticles: From Manufacturing to Medical Applications*. Springer. 395(5):1199-1200.
82. Turkevich J., Stevenson P. and Hillier J. (1951). A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss Faraday Soc*, 55.
83. Prema P. And Thangapandiyan S. (2013). In-vitro antibacterial activity of gold nanoparticles capped with polysaccharide stabilizing agents. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 5(1):310-314.
84. Hajipour M., Fromm K., Ashkarran A., Jimenez de Aberasturi D., Ruiz de Larramendi I., Rojo T., Serpooshan V., Parak W. and Mahmoudi M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*; 31(9):499–511.

XI. APÉNDICE

1. Soluciones

Azul de Coomassie (100 ml)	0.29g de azul de Coomassie Disolver con agitación en 90 ml de solución v:v metanol H ₂ O y añadir 10 ml de ácido acético glacial Filtrar con pale whatman
Amortiguador de corrida para proteínas 2X (10 ml)	2.5 ml de Tris-HCl 100mM pH 6.8 4 ml SDS 10% 2 ml Glicerol 200 ml DTT 1M 0.1 mg azul de bromofenol Disolver agitando en 1° ml de H ₂ O, alucotar y guardar a T. A
DTT 1M (100 ml)	15.45 g de DTT Aforar con ddH ₂ O, alucotar y guardar a -20°C
EDTA 0.5M pH 8.0 (100 ml)	18.612g de EDTA Disolver en H ₂ O, aforar, ajustar pH con NaOH 10M, guardar a T. A

PBS 1X pH 7.0 (1 l)	8 g (137 mM) NaCl 0.2 g (2.7 mM) KCl 1.44 g (10 mM) NaHPO 0.24 g (2mM) KHHPO 800 ml ddH₂O Ajustar pH a 7.0 con HCl Aforar a 1 l.
SDS 10% (1 l)	100g SDS Disolver en 900 ml de H₂O, calentar a 68°C, aforar y alicuotar.
Solución desteñidora (100 ml)	30 ml Etanol 10 ml Acido acético Aforar con ddH₂O
Buffer Tris-HCl pH 8.8	18.165 gr tris- HCl 0.4 gr de SDS, Disolver en 60 ml de H₂O y ajustar el pH a 8.8, aforar con H₂O a 100 ml.
Buffer Tris-HCl pH 6.8	6.055 gr tris- HCl 0.4 gr de SDS Disolver en 60 ml de H₂O y ajustar pH a 6.8, aforar con H₂O a 100 ml.
Buffer de carga para proteínas 6X.	1.2 gr de SDS 0.93 gr de DTT 0.6 gr 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 H₂O Agitar lentamente hasta dissolver Perfectamente.

2. CONGRESOS

Durante la maestría el trabajo fue presentado en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica, noviembre 2014.



XXX Congreso Nacional de Bioquímica
Sociedad Mexicana de Bioquímica
Guadalajara, Jal. 2 al 8 de noviembre de 2014

<http://www.smb.org.mx/>

The nanoparticles of gold destroy the capsule of *Streptococcus pneumoniae*; the principal virulence factor that this pathogen has been developing to evade the immune system.

Edgar Augusto Ortiz Benítez, Mariana Carrillo Morales, Alejandra Stephany 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, Sal 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.

Streptococcus pneumoniae is a gram positive bacterium which has form of coccus. This pathogen causes otitis, sinusitis or infections more severe like pneumonia, meningitis or even worse septicemia, resulting lethal in many occasions for children and old people. The principal treatment is based in antibiotics as beta-lactams, trimethoprim-sulfamethoxazole, or inclusive in some cases it is necessary to give antibiotics of third generation like vancomycin. Since the excessive use of antibiotics produces resistance and even worse multi-resistance, it is therefore imperative to develop new alternatives of the treatment. One of them could be gold nanoparticles (AuNP's). The AuNP's tested in a non-pathogen laboratory strain, have shown to be a good alternative if they are utilized as antibacterial. In the case of *S. pneumoniae*, a bacterium capsulated has not been tested the antibacterial effect of AuNP's. In this work, the antibacterial effect of AuNP's was demonstrated in two strains: TIGR 4 (wild type) and R-6 (a mutant, without capsule). We observed that AuNP's inhibited the bacterial growth and the viability in both strains. A hypothesis proposed in order to explain the antibacterial effect of AuNP's was by modifications in the pH or the concentration of reactive oxygen species (ROS). In the case of *S. pneumoniae* cultures, the presence of AuNP's showed that the media was acidified for around of one pH unit. Interestingly, ROS quantification also showed an increasing. Finally, we attempted to explain the molecular mechanism by Transmission electronic microscopy (TEM) and we found that the NP's entered in both strains with or without capsule, in fact, we thought that the internalization was favoured by the presence of capsule, perhaps the presence of capsule attracted better the NP's, then they were grouped in a particular place of the bacterium and thus they were introduced in the bacterium forming a circular structure. Probably, this circular structure was involved in the bacterial lysis. Our overall results are showing the first approach in order to explain the mechanism by which the AuNP's destroy the bacteria. Additionally, we are proposing that these NP's are more effective to counteract infections caused by bacteria capsulated as *S. pneumoniae*, giving a better alternative in infections caused by this pathogen.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 27 de Enero del 2015, en la Ciudad de México, D. F., para optar al Grado de Maestro en Ciencias Genómicas, al Biólogo Experimental Edgar Augusto Ortiz Benítez.

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
