

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Búsqueda de un bio receptor específico para
*Streptococcus pneumoniae***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

DAN ISRAEL ZAVALA VARGAS

Director de tesis
Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Ciudad de México, enero de 2017

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 del día 31 de Enero de 2017, en la Ciudad de México, para optar el grado de Maestría en Ciencias Genómicas al Cirujano Dentista Dan Israel Zavala Vargas.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Dra. Lilia López Cánovas

M. en C. Edgar Augusto Ortiz Benítez

AGRADECIMIENTO AL CONACyT.

La presente tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de convenio CB-222180 y se contó además con el apoyo económico de la beca del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por el apoyo académico brindado durante el tiempo de mi formación, al igual que el apoyo económico de la beca de posgrado.

A los que formaron parte de mi aprendizaje, en especial a mi comité tutorial; Dr. José de Jesús Olivares Trejo, Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez, M. en C. Edgar Augusto Ortiz Benítez y Dr. Marco Antonio González López.

A mis compañeros de generación y posgrado por sus consejos, apoyo y convivencia durante este tiempo; Araceli, Vanesa, Carlos, Hugo, José, etc.

A mis compañeros de laboratorio por todos los buenos momentos compartidos y el gran apoyo que día con día me brindaron; Cristián, Domingo, Miguel.

A mi familia por su apoyo y ayuda en las diferentes formas en las que me lo brindaron.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	11
ÍNDICE DE FIGURAS.....	14
RESUMEN.....	15
I.- INTRODUCCIÓN.....	15
1.- ANTECEDENTES GENERALES.....	15
1.1.- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
1.2.- Taxonomía.....	16
1.3.- Morfología y crecimiento.....	16
1.4.- Estructura y factores de virulencia.....	17
1.4.1.- Factores estructurales de virulencia.....	21
1.4.1.1.- Cápsula.....	21
1.4.1.3.- Ácido teicoico y colina.....	21
1.4.2.-Pared celular.....	21
1.4.2.- Factores moleculares de virulencia.....	23
1.4.2.1.-Neumolisina.....	23
1.4.2.2.- Neuroaminidasa.....	23
1.4.2.3.- Autolisina.....	24
1.4.2.4.- Proteasa de la inmunoglobulina A.....	24
1.4.2.5.- Hialuronidasa.....	24
1.4.2.6.- Proteínas de superficie PspA y PsaA.....	25
1.5.- Patogénesis.....	25
1.6.- Defensas del hospedero.....	26
1.7.- Tratamiento y resistencia.....	26

1.7.1.- Tratamiento contra neumonía.....	26
1.7.2.- Tratamiento contra meningitis.....	27
1.7.3.- Tratamiento contra otitis media.....	27
1.7.4.- Resistencia a antibióticos.....	27
1.7.4.1.- Resistencia a β -lactámicos.....	28
1.7.4.2.- Resistencia a macrólidos.....	28
1.7.4.3.- Resistencia a quinolonas.....	28
1.7.4.4.- Resistencia a optoquina.....	29
1.8.- Pruebas microbiológicas de identificación de <i>S. pneumoniae</i>	29
1.8.1.- Determinación de la actividad de la catalasa.....	31
1.8.2.- Prueba de sensibilidad a optoquina.....	32
1.8.3.- Prueba de sensibilidad a bilis.....	33
1.9.- Pruebas moleculares de identificación de <i>S. pneumoniae</i>	34
1.9.1.- Secuenciación.....	34
1.9.2.- PCR.....	34
1.9.3.- Microarreglos.....	34
II. ESTADO DEL ARTE.....	35
2.1.- Nanotecnología.....	35
2.2.- Nanosensores.....	36
2.2.1.- Nanosensores ópticos.....	37
2.2.2.- Nanosensores con fibra óptica.....	37
2.2.3.- Nanosensores electromagnéticos de detección por medición de la corriente eléctrica.....	37
2.2.4.- Nanosensores mecánicos.....	37

2.3.-Nanopartículas como bio sensores.....	37
3.2.- Nanopartículas acopladas a aptámeros.....	38
3.3.- Aptámeros.....	38
III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO.....	40
3.1.- Bio análisis.....	40
3.1.1.- Sensores y bio sensores.....	40
3.1.2.- Tipos de bio sensores.....	41
3.1.2.1.- Bio sensores de afinidad.....	41
3.1.2.1.1.- Inmunosensores.....	41
3.1.2.1.2.- Genosensores.....	41
3.1.2.1.3.- Apta sensores.....	42
3.3.1.- Selección de aptámeros.....	42
IV. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL PROYECTO.....	44
V. HIPÓTESIS.....	44
VI.OBJETIVOS.....	44
6.1.- Objetivo general.....	44
6.2.- Objetivos específicos.....	44
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	45
VIII. METODOLOGÍA.....	46
8.1.- Cepas bacterianas.....	46
8.1.1.- Cultivos en medio sólido.....	46
8.1.2.- Cultivos en medio líquido.....	46
8.1.3.- Conservación bacteriana en el laboratorio.....	46

8.2.- Cell-SELEX.....	46
8.2.1.- Diseño del experimento.....	46
8.2.2.- Bacterias de selección y contra selección.....	46
8.2.3.- Distintos tiempos de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	48
8.2.4.- Diseño de oligonucleótidos.....	49
8.2.4.1.- Diseño de la biblioteca de aptámeros.....	48
8.2.4.2.- Diseño de los primers.....	48
8.2.5.- Incubación de los aptámeros con la bacteria blanco.....	48
8.2.6.- Elución y purificación de aptámeros.....	49
8.2.7.- Amplificación y purificación de aptámeros seleccionados.....	49
8.2.8.- Contra selección.....	49
8.3.- Síntesis de AuNP's.....	49
IX.- RESULTADOS.....	51
9.1.- Resultados de la selección de aptámeros.....	51
9.1.1.- Gel de agarosa de la biblioteca de aptámeros.....	51
9.1.2.- Gel de agarosa del primer ciclo de selección.....	52
9.1.3.- Cuantificación de aptámeros recuperados utilizando diferentes tiempos de incubación con la bacteria blanco.....	52
9.1.4.- Cuantificación de aptámeros recuperados utilizando diferentes tiempos de elución de la bacteria blanco.	54
9.1.5.- Gel de agarosa de diferentes rondas de selección de los aptámeros.....	55
9.2.- Prueba de la especificidad de los aptámeros seleccionados.....	56
9.2.1.- Biblioteca de aptámeros marcada con 6FAM como control.....	56
9.2.2.- Prueba de la especificidad del aptámero en el paso nueve del proceso de selección.....	58

9.2.3.- Prueba de la especificidad del aptámero final.....	60
9.2.4.- Resultados observados.....	61
9.2.5.- Conclusiones sobre la especificidad de los aptámeros seleccionados.....	61
9.3.- Acoplamiento de AuNP's-aptámeros a la <i>S. pneumoniae</i>	62
9.3.- Unión de AuNP's-aptámeros a la <i>S. pneumoniae</i>	65
9.3.1.- Interacción de la AuNps-biblioteca de aptámeros a la <i>S. pneumoniae</i> como control.....	65
9.3.2.- Interacción específica de la AuNP's-aptámeros seleccionados a la <i>S.</i> <i>pneumoniae</i>	67
9.3.3.- Resultados observados.....	70
9.4.- Prueba de las AuNP's-aptámeros adheridas a la bacteria a diferentes tiempos de incubación.....	70
X. DISCUSIÓN.....	71
XI. CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

6FAM: 6-carboxi fluoresceína

°C: Grados centígrados

μl: Micro litros

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

apt: Aptámeros

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosín trifosfato

AuNP's: Nanopartículas de oro

AuNP's-apt: Nanopartículas de oro conjugadas con aptámeros

AuNP's-PEG: Nanopartículas de oro conjugadas con PEG

BID: Banco internacional de desarrollo

CO₂: Dióxido de carbono

cols: Colaboradores

CNT: Nanotubos de carbono

CMI: Concentración mínima inhibitoria

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DO: Densidad óptica

Fab: Fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo

Fc: Fragmento cristizable de un anticuerpo

g: gramos

h: horas

IgA: Inmunoglobulina A

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

kDa: Kilodaltones

µg/ µl: Microgramos por microlitro

µm: Micrómetro

ml: Mililitro

mg: Miligramos

min: Minutos

NaOH: Hidróxido de sodio

nmol: Nano moles

NCCLS: Comité internacional de estándares de laboratorios clínicos

NP's: Nanopartículas

nm: Nanómetros

ng: Nano gramos

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol

PM: Peso Molecular

PS: Polisacáridos Capsulares

PspA: Proteína de superficie neumococal

PUP: Proteína de Unión a Penicilina

rpm: revoluciones por minuto

RTPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

ssDNA: Ácido desoxirribonucleico de una sola cadena

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Crecimiento y morfología de <i>S. pneumoniae</i> en agar sangre.....	17
Figura 2. Estructura y factores de virulencia de <i>S. pneumoniae</i>	18
Diagrama 1. Factores de virulencia.....	19
Figura 3. Diagrama de cápsula, pared y membrana de <i>S. pneumoniae</i>	20
Figura 4. Diagrama de resistencia a antibióticos.....	27
Figura 5. Prueba de actividad de la catalasa.....	30
Figura 6. Prueba de sensibilidad a optoquina.....	31
Figura 7. Prueba de solubilidad en bilis.....	32
Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos de identificación de <i>S. pneumoniae</i>	33
Tabla 2. Ventajas y desventajas de algunos métodos moleculares de identificación bacteriana.....	35
Tabla 3. Ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos.....	39
Figura 8. Diagrama de un bio sensor.....	40
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	45
Tabla 4. Ciclos de selección y las diferentes bacterias que fueron utilizadas en cada ciclo.....	48
Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano.....	48
Tabla 5. Diseño de la biblioteca aptámeros.....	49
Tabla 6. Diseño de primers, dos de los cuales están modificados.....	49
Figura 10. Biblioteca de aptámeros.....	51
Figura 11. Primer ciclo de selección.....	52
Tabla 7. Cuantificación de aptámeros a diferentes tiempos de incubación.....	53
Figura 12. Gráfica de aptámeros cuantificados a diferentes tiempos de incubación.....	54
Tabla 8. Variación en los tiempos de elución de los aptámeros unidos a la bacteria blanco.....	54
Figura 13. Gráfica de la variación en los tiempos de elución de los aptámeros unidos a la bacteria blanco.....	55
Figura 14. Distintos ciclos de selección de aptámeros.....	55
Figura 15. Microscopías de fluorescencia.....	56
Figura 16. Microscopías de epifluorescencia.....	58
Figura 17. Microscopías de epifluorescencia.....	60
Tabla 9. Resumen de resultados observados.....	61
Figura 18. Espectro de absorbancia de AuNP's.....	62
Figura 19. Espectro de absorbancia de AuNP's-PEG.....	62
Figura 20. Espectro de absorbancia de AuNP's-PEG-Apt.....	63
Figura 21. Desplazamiento del espectro de absorbancia.....	63
Figura 22. Microscopías de epifluorescencia biblioteca de aptámeros conjugada con AuNP's.....	64
Figura 23. Microscopías de epifluorescencia aptámero final conjugado con AuNP's.....	67
Tabla 10. Resumen de resultados observados.....	69
Figura 24. Microscopías AuNP's-apt en distintos tiempos de interacción	71

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae es la causa más frecuente de neumonía extra hospitalaria y meningitis en adultos y se ha convertido también en el agente infeccioso más frecuente en lactantes y niños. Es el principal agente etiológico de la otitis media aguda bacteriana en niños y causa un tercio de las sinusitis agudas a nivel mundial¹. En los últimos años se han registrado cepas de este patógeno resistentes a la prueba de optoquina que es una de los principales métodos de identificación de esta bacteria, ocasionando con esto falsos negativos en su identificación. Por lo tanto y debido a las crecientes desventajas de estos métodos de identificación bacteriana, a la alta incidencia que presentan las infecciones con *S. pneumoniae* y al riesgo que con llevan éstas, es importante el desarrollo de nuevas técnicas de identificación de la misma. Por lo anterior nos hemos dado a la tarea de innovar un método de identificación para *S. pneumoniae* utilizando nanotecnología conjugada con aptámeros para desarrollar un bio receptor específico para este patógeno.

I.-INTRODUCCIÓN

1.- Antecedentes generales del tema.

1.1.- *Streptococcus pneumoniae*.

Inicialmente *S. pneumoniae* fue denominado “**microbio septicémico de la saliva**” por Pasteur y *Micrococcus pasteurii* por Sternberg en 1881, año en el cual ambos investigadores lo aislaron por primera vez. En 1886, este microorganismo fue denominado **neumococo** por Fraenkel debido a que causaba neumonía. Posteriormente, según sugerencia de Weichselbaum (1886), en 1920 fue denominado *Diplococcus pneumoniae* debido a su morfología, en 1974 en la octava edición del Manual de Bacteriología de Bergey, el neumococo fue denominado *Streptococcus pneumoniae* (Chester 1901), denominación aún vigente (28).

Streptococcus pneumoniae se ubica dentro de las principales prioridades como problema de salud pública tanto en los países industrializados como en aquéllos menos desarrollados. Es responsable de una elevada mortalidad y morbilidad, ya que es el agente causal de una gran variedad de infecciones como otitis media y sinusitis agudas, e infecciones severas como septicemia, meningitis y neumonía. La neumonía como síndrome, es responsable de la muerte de aproximadamente 4 millones de niños menores de 5 años de edad y de un número similar de adultos mayores de 60 años alrededor del mundo, la mayoría de estas muertes son atribuibles a *S. pneumoniae*. Según datos aportados por el banco internacional de desarrollo (BID), en Latinoamérica se producen cada año 9.000 casos de meningitis bacteriana aguda (MBA), con un 10% promedio de

mortalidad y 30% de secuelas.

S. pneumoniae es la principal causa de neumonías, meningitis bacterianas y de otitis media aguda en el mundo. La neumonía neumocócica es considerada como una de las más prevalentes y serias enfermedades tanto en los países desarrollados como en países en vías de desarrollo y afecta en primera instancia a los individuos con factores de riesgo como lo son; inmunodeficiencias primarias, secundarias o déficit en los factores del complemento, además de enfermedades crónicas como cirrosis hepática, diabetes mellitus, lupus eritematoso, alcoholismo, drogadicción, insuficiencia renal, síndrome nefrótico, etc. La *S. pneumoniae* es responsable del 10 al 25% de todas las neumonías. La enfermedad neumocócica es más frecuente los 5 primeros años de vida, disminuyendo luego rápidamente y volviendo a aumentar su incidencia en personas mayores de 60 años. *S. pneumoniae* infecta exclusivamente al hombre. La tasa de portador nasofaríngeo es del 20 al 40%, la cual depende del período estudiado y de la población. La vía de transmisión del neumococo es aérea, a través de micro gotas de saliva de portadores o de enfermos. Es un organismo sensible al calor, al frío y a la desecación, todas las edades, razas y sexos son susceptibles a esta enfermedad (28).

1.2.- Taxonomía.

Streptococcus pneumoniae pertenece al género *Streptococcus* de la familia *Streptococcaceae*. El género *Streptococcus* está conformado por cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa y citocromo oxidasa negativa. Los estreptococos clínicamente relevantes son homofermentadores y el producto final de la fermentación de la glucosa es el ácido láctico (28).

1.3.- Morfología y crecimiento.

Los neumococos son bacterias Gram positivas encapsuladas con morfología de diplococos, con 0,5 a 2 μm de diámetro, arregladas en pares o en cadenas cortas, inmóviles, no formadores de esporas; típicamente crecen de modo difuso en caldo con suero y requieren medios enriquecidos para su desarrollo (28).

En cultivo agar sangre ovina, presenta colonias lisas, pequeñas, brillantes, rodeadas por un halo verde de α hemólisis. Este microorganismo es anaerobio facultativo y algunos aislados clínicos únicamente pueden crecer en presencia de CO_2 . El estreptococo pierde su viabilidad a 60 °C por 30 min, se lisa fácilmente, es soluble en bilis, sensible a la optoquina y muchos serotipos son virulentos para el ratón. Puede perder su característica de Gram-positivo después de la fase logarítmica (28).

Las colonias de *S. pneumoniae* en medio de cultivo sólido, exhiben una zona de depresión central causada por una autólisis parcial (Fig. 1). Con el envejecimiento del cultivo ocurre una pérdida de la viabilidad de estas bacterias (28).



Figura1. Crecimiento y morfología de *S. pneumoniae* en agar sangre. Se observa la hemólisis alfa o parcial en halos verdosos alrededor de la colonia debido a la actividad de la alfa hemolisina.

1.4.- Estructura y factores de virulencia.

La *S. pneumoniae* está constituida por diferentes estructuras bien definidas y factores de virulencia, es importante señalar que existen algunas estructuras celulares que además de tener una función estructural también funcionan como factores de virulencia, los cuales son utilizados por la bacteria para lograr una exitosa colonización e invasión en el hospedero. Estos factores no son únicamente estructuras como las cápsulas de polisacáridos, la pared celular o el ácido teicóico si no que también se ayuda de distintas moléculas que libera en su medio con distintos fines, algunos por ejemplo son; la neumolisina, la neuroaminidasa y la proteasa IgA. Éstos se muestran a continuación en la (Figura 2). Para una mejor comprensión hemos decidido dividir estos factores de virulencia en dos grupos; estructurales y moleculares como se muestra en el Diagrama 1.

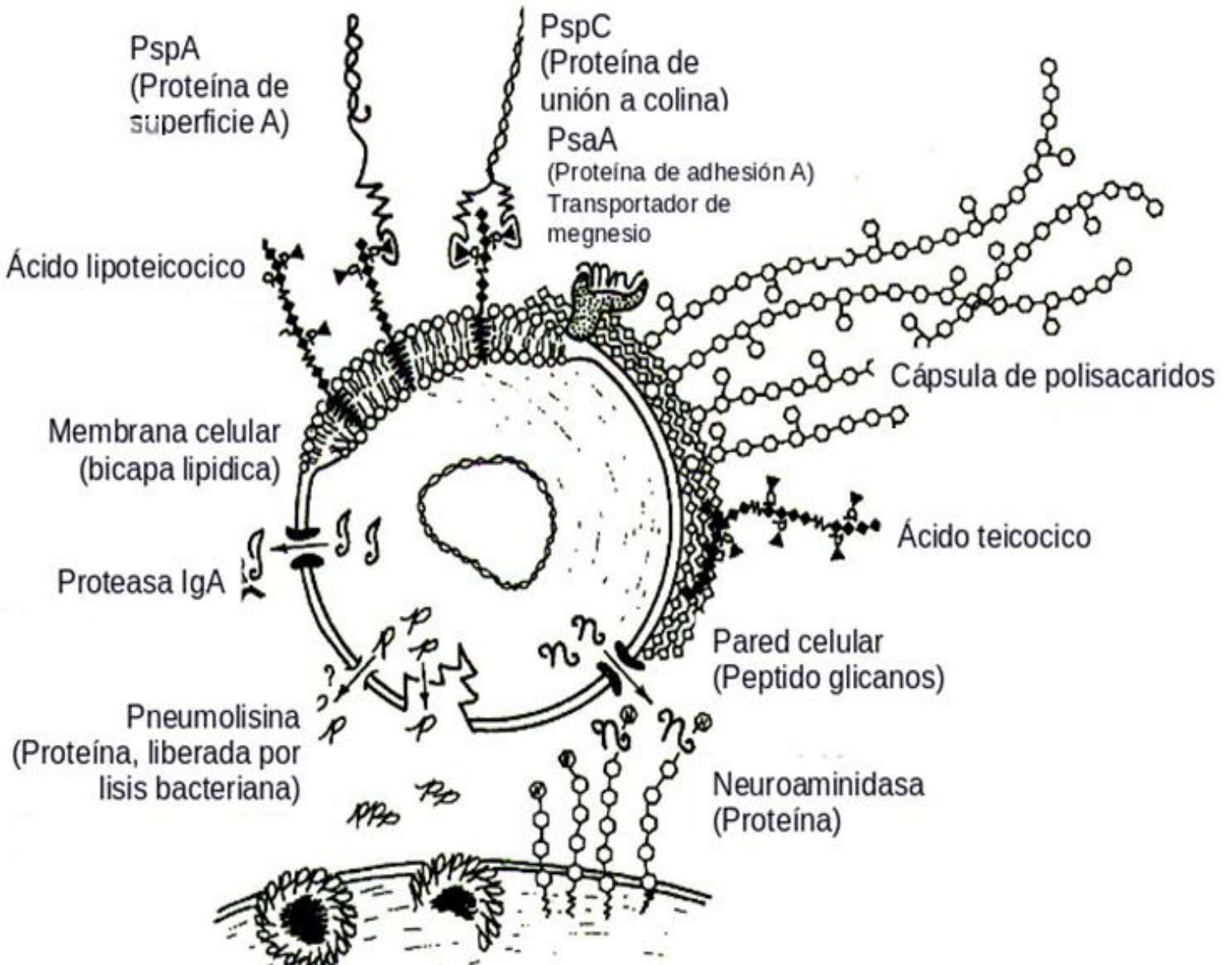


Figura 2. Estructura y factores de virulencia de *S. pneumoniae*. Se muestra un esquema de la *S. pneumoniae* en donde se observan algunas estructuras importantes en esta bacteria como; la pared celular, la membrana celular y la cápsula, además se muestran simbolizadas con letras algunas moléculas que la bacteria libera en el medio para lograr una mejor colonización. Con la letra *J* se simboliza la proteasa IgA, con la letra *n* se simboliza la neuroaminidasa y la neumolisina por una *R*.

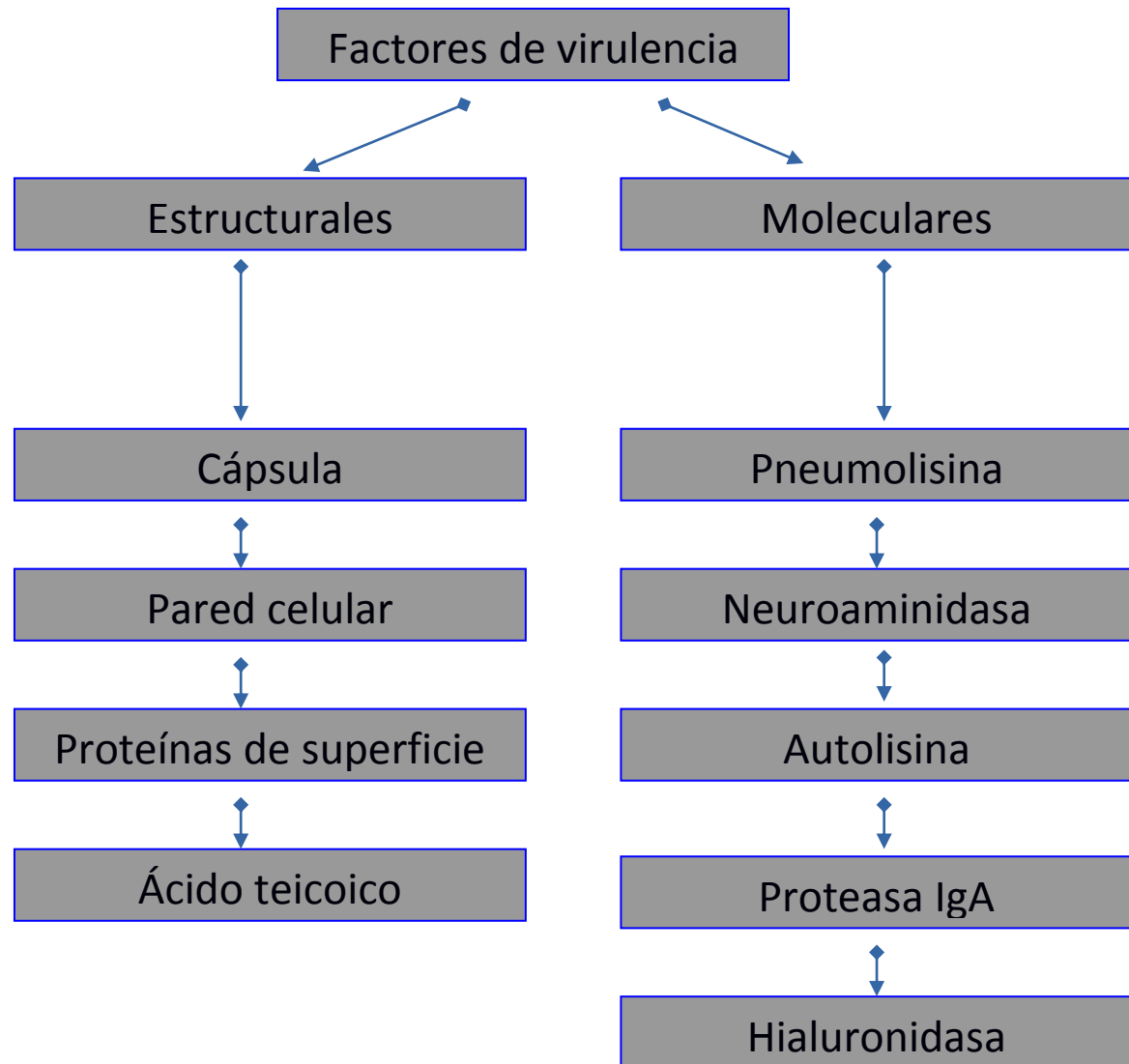


Diagrama 1. Factores de virulencia. Se observan los factores de virulencia de *S. pneumoniae* divididos en dos grupos; estructurales y moleculares. Los estructurales como su nombre lo dice son estructuras que también tienen una función durante la patogénesis, los moleculares son los liberados en algún momento por la bacteria para la colonización del hospedero.

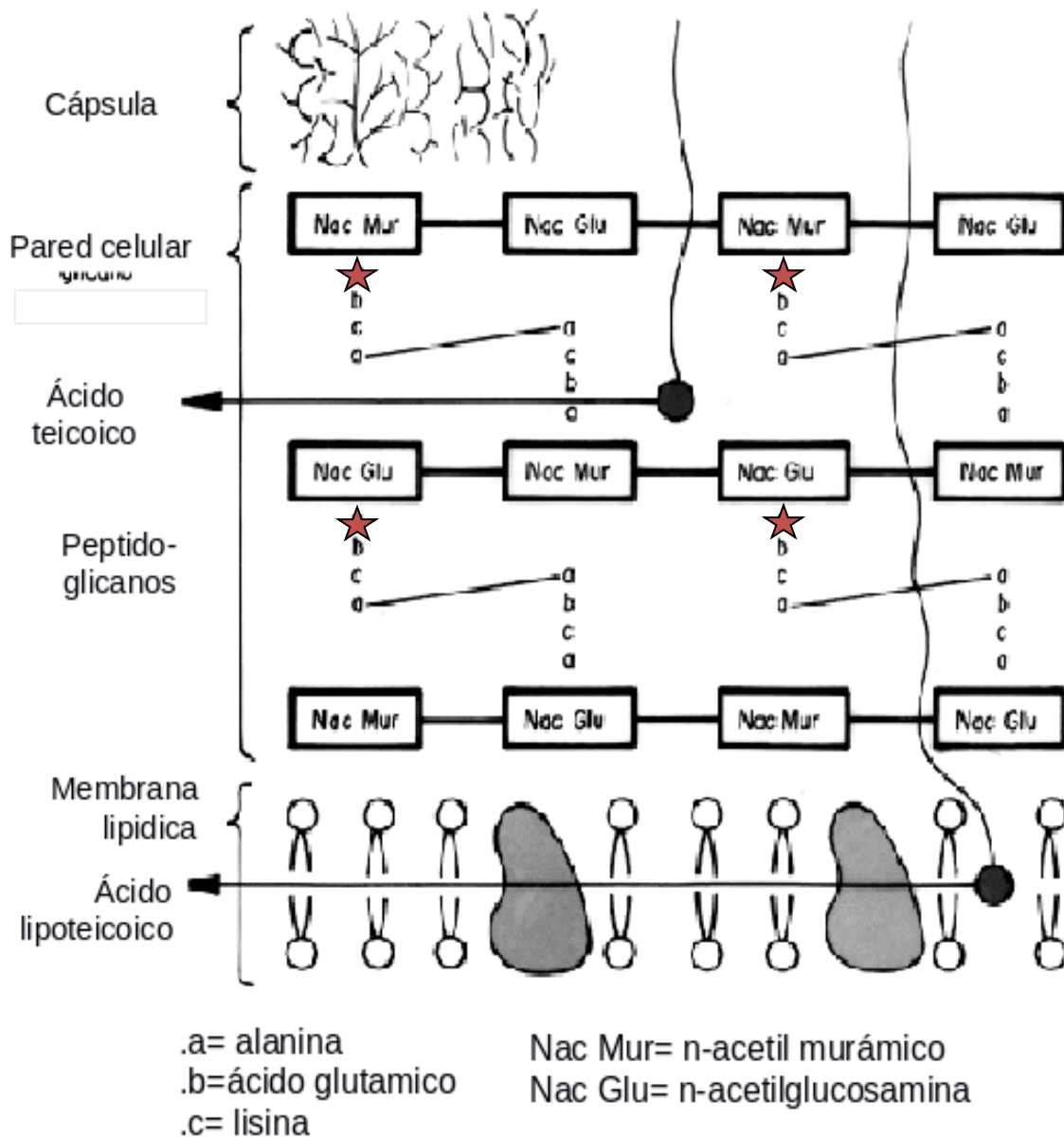


Figura 3. Diagrama de cápsula, pared y membrana de *S. pneumoniae*. En la parte superior se muestra la cápsula que está conformada por polisacáridos, en la parte media está la pared celular formada por peptidoglicanos, éstos se unen entre sí por medio de enlaces peptídicos en un extremo, mientras que en otro extremo se unen al n-acetil glucosamina que se encuentra formando capas de péptido glucanos. En la parte más baja se aprecia la membrana formada por una bicapa lipídica, en donde se encuentran algunas proteínas de membrana y ácido lipoteicoico. La diferencia entre éste y el ácido teicoico es la ubicación y la unión a lípidos. El símbolo ★ señala los sitios de corte de la autolisina.

1.4.1.- Factores estructurales de virulencia.

1.4.1.1.- Cápsula

Esta bacteria cuenta con una cápsula externa a la pared celular, como se muestra en la Figura 2, de naturaleza polisacárida compleja que es una parte muy importante para la patogénesis de las infecciones neumocócicas. La composición antigénica de la cápsula es variable en diferentes cepas y permite agrupar a los *S. pneumoniae* en más de 90 diferentes serotipos capsulares y aproximadamente 45 serogrupos. Se definen como pertenecientes a un mismo serogrupo, los serotipos que presentan inmunogenicidad cruzada, por ejemplo 6A y 6B. La identificación de cada serotipo se realiza mediante una reacción antígeno-anticuerpo utilizando antisueros específicos, lo que da como resultado un abultamiento de los anticuerpos en la cápsula, fenómeno conocido como "quellung". También se utilizan hoy en día otras técnicas para la serotipificación como aglutinación con látex o por métodos moleculares como amplificación génica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (43).

La complejidad antigénica capsular de *S. pneumoniae* explica en parte la elevada incidencia y severidad de las infecciones por este agente. La inmunidad es serotipo específica, lo que significa que teóricamente un sujeto puede tener cerca de 90 infecciones neumocócicas durante su vida. Esto podría ser verdad si la virulencia de cada serotipo fuera similar y la inmunidad fuera de larga duración y homogénea para todos los serotipos, pero en realidad la calidad y duración de la inmunidad depende del serotipo, de la edad del paciente y de otros parámetros aún no bien definidos (43).

No obstante que se conocen 90 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*, solo 12 han sido utilizados para uso clínico, los cuales son 1 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 14 - 18 - 19 y 23 ya que estos serotipos son responsables del 80% o más de las infecciones neumocócicas invasoras. Se ha observado que los serotipos varían de acuerdo a la distribución geográfica y los grupos etarios. De los 12 serotipos el 1 y 5 son más frecuentes en regiones del mundo de menor desarrollo socioeconómico (43).

La regulación genética de la cápsula es también compleja y es así que algunas cepas pueden experimentar una transformación o cambio de serotipo.³⁷ Este fenómeno no había sido identificado previamente y, si bien su frecuencia es baja, se presenta en cepas con resistencia a los antimicrobianos y asociadas a colonización e infecciones en niños. Estos cambios de serotipo en una cepa ocurren por mecanismo de recombinación genética en el que se modifican o se reemplaza el locus que codifica para la expresión de la cápsula. Uno de estos ejemplos es el serotipo 19F que surgió como variante de un clon serotipo 23F multiresistente detectado en España y el cual se ha diseminado a diferentes países. El análisis molecular de estas cepas mediante diferentes técnicas de tipificación muestra una total identidad genética entre ellas, diferenciándose sólo en el serotipo capsular. Como estas variantes han surgido en las cepas

resistentes a antimicrobianos, ya sea a penicilina o multiresistentes, se podría plantear hipotéticamente que mutaciones o reordenamientos genéticos que llevan a resistencia antimicrobiana se asocian a otras recombinaciones genéticas resultando en cepas mejor adaptadas. Estas variantes son cepas resistentes a los antibióticos, la presión y selección de los antimicrobianos puede influir en forma importante en un aumento potencial de su prevalencia y facilitar la diseminación de estas variantes. Esto obliga a la vigilancia de este fenómeno y al uso racional de antimicrobianos (39, 40).

La capacidad de recombinación genética que posee *S. pneumoniae* se había puesto en evidencia desde hace mucho tiempo. En 1944 Avery, MacLeod y McCarty observaron un fenómeno muy peculiar en *S. pneumoniae*: cepas a capsuladas, no virulentas, también denominadas R pueden transformarse en cepas capsuladas o S, virulentas, en contacto con cepas S en un modelo *in vitro* o también *in vivo* inoculándolas en ratón; esto ocurre por incorporación activa de material genético desde el ambiente al genoma bacteriano y también por mutaciones espontáneas. Esta transformación genética está presente en muy pocos microorganismos (43).

1.4.1.2.- Polisacárido capsular y de pared celular.

El polisacárido capsular (PS) es un determinante esencial para la antigenicidad del neumococo y todo el sistema de clasificación está basado en serotipos por su diversidad antigénica, el PS es el responsable de la diferenciación de esta única especie en 90 serotipos. El PS fue descrito como el primer antígeno, no proteico, inductor de anticuerpos en humanos. La cápsula se sintetiza rápida y extensivamente durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano y el antígeno PS puede ser detectado en el suero y orina de pacientes con enfermedad neumocócica (28).

Los estudios de la estructura química de este antígeno revelan que la mayoría de los tipos poseen una cápsula cargada negativamente (excepto 7 y 14 que son neutros) y poseen componentes ácidos como el ácido glucurónico (en los tipos 1, 2, 3, 5, 8, 9A y 9V) o fosfato en enlaces fosfodiéster (en los tipos 6A, 6B, 11A, 15F, 19F, 19A y 23F). Los estudios inmunológicos demuestran que el antígeno PS es T-independiente y puede interactuar directamente con las células B para la producción de anticuerpos (28).

La cápsula consiste en polímeros de alto peso molecular conformados por unidades repetitivas de oligosacáridos, ligados por enlaces covalentes a la pared celular. El polisacárido se denomina sustancia soluble específica, la cápsula es considerada el principal factor de virulencia de esta bacteria, debido a su resistencia a la fagocitosis (28).

El polisacárido de la pared bacteriana, denominado también polisacárido C (C-PS), es un complejo de ácido teicoico, principal componente de la pared celular del neumococo (Figura 3). Está ligado covalentemente al peptidoglicanos a través de residuos de ácido murámico. La cantidad de este

antígeno varía de cepa a cepa, pero es igual en casi todos los tipos de neumococo (28).

1.4.1.3.- Ácido teicoico y colina.

La colina es un componente estructural bacteriano inusual que se encuentra de manera característica en la superficie celular de otros microorganismos que residen principalmente en las vías respiratorias superiores, en el neumococo la colina media la adherencia bacteriana por medio del receptor del factor activador de plaquetas (rFAP), ya que la colina tiene la capacidad de mimetizar con su ligando para poder utilizar este receptor, el cual está ampliamente distribuido en la superficie del tejido epitelial de la nasofaringe humana. La colina está unida al ácido lipoteicoico que a su vez se ancla a la pared y membrana bacteriana como se muestra (Figura 3) (55).

1.4.1.4.- Pared celular.

La pared celular de *S. pneumoniae* tiene la estructura general de las cocáceas Gram positivas, con una capa importante de peptidoglicanos constituida por subunidades alternadas de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico enlazadas por puentes peptídicos. Un componente importante de esta pared es el ácido teicoico, rico en galactosamina, fosfato y en colina; esta última sustancia es exclusiva de esta bacteria y cumple una función reguladora importante en la hidrólisis de la pared. El ácido teicoico se dispone de dos formas en la pared celular, una expuesta en la superficie celular y otra unida de manera covalente a los lípidos de la membrana citoplasmática (Figura 2) (43).

1.4.2.- Factores moleculares de virulencia.

1.4.2.1.- Neumolisina.

Es una proteína de 52,8 kDa y la secuencia de aminoácidos es homóloga a las hemolisinas producidas por *Staphylococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes*(28). Es una proteína intracelular que pertenece a la familia de toxinas tiol activadas, es conservada en aislados de neumococo y tiene una variedad de efectos tóxicos en diferentes tipos de células, aunque no es secretada por el neumococo, puede ser liberada cuando éste es lisado por el efecto de la autolisina, esta proteína tiene la capacidad de oligomerizarse en la membrana de sus células blanco para formar un poro transmembranal con forma de anillo, de unas 40 subunidades ocasionando la lisis celular (55).

1.4.2.2.- Neuroaminidasa.

Es una proteína de 107 kDa y está asociada con la pared celular, la neuroaminidasa corta el ácido N-acetilneuramínico de los glicolípidos, al igual que en las lipoproteínas y los oligosacáridos presentes en las superficies celulares y los fluidos corporales del hospedero. En el oído medio, la pérdida de ácido siálico inducida por la neuroaminidasa acompaña el avance del *S. pneumoniae* hacia la trompa de Eustaquio. Asimismo, esta bacteria posee genes

que codifican distintas enzimas que tienen actividad de neuroaminidasa; por ejemplo, la neuroaminidasa A que en modelos animales contribuye a la colonización y la evolución a otitis media, aunque no interviene en la pérdida de audición que puede quedar como secuela (50).

1.4.2.3.- Autolisina.

Es una enzima de 35 kDa, también llamada amidasa, y tiene la capacidad de hidrolizar la capa de peptidoglicanos en un sitio específico: entre el ácido N-acetil murámico y el residuo alanina del puente peptídico (Figura 3). La actividad de la amidasa depende de la presencia de fosfato de colina en el ácido teicoico de la pared celular, éste permite la división celular (43). Ésta tiene la capacidad de formar oligómeros que en altas concentraciones se unen a la membrana celular del hospedero formando poros que causan la lisis celular, mientras que en bajas concentraciones se ha observado que tiene diferentes efectos *in vitro* como pueden ser estimulación de factores de necrosis tumoral alfa y de interleucina 1 beta en monocitos humanos, también inhiben el movimiento de los cilios en las células epiteliales respiratorias humanas, genera disrupción de monocapas en cultivos de células epiteliales de tracto respiratorio superior y de células alveolares, disminuye la actividad bactericida y la migración de los neutrófilos (49).

1.4.2.4.- Proteasa de la inmunoglobulina A.

Es una molécula de 220 kDa y son enzimas extracelulares presentes en *S. pneumoniae*, estas proteínas son secretadas en el medio (Figura 2), principalmente al inicio de la fase logarítmica de crecimiento (28). La proteasa IgA rompe la unión prolil treonil de la molécula de IgA, en los fragmentos Fab y Fc, previniendo de esta manera que ocurra de manera adecuada el proceso de inflamación del hospedero (55).

1.4.2.5.- Hialuronidasa.

Es una enzima de 40 kDa y aproximadamente el 99% de los aislamientos clínicos la produce, ésta es secretada activamente en el medio durante la fase logarítmica del crecimiento bacteriano (28). La hialuronidasa degrada el ácido hialurónico presente en el tejido conectivo de los mamíferos y de la matriz extracelular. Esto podría facilitar la diseminación bacteriana y la colonización. Esta enzima también puede potenciar la inflamación pulmonar que acompaña la neumonía por *S. pneumoniae* mediante interacciones complejas con citoquinas proinflamatorias (50).

1.4.2.6.- Proteínas de superficie PspA y PsaA.

Estas proteínas participan en la adherencia inicial a la célula blanco (43). La proteína de superficie neumococal (PspA) es una proteína de 37 kDa con antigenicidad variable y es encontrada en diferentes cepas de neumococo, se cree que es una probable proteína transmembranal, sin embargo la manera en la que funciona es desconocida debido a que es difícil de purificar, aunque algunos experimentos indican que inhibe la activación del complemento ya que previene la unión del c3 a la superficie bacteriana (49, 55). Otra de las lipoproteínas presentes en el *S. pneumoniae* es la PsaA también de 37 kDa que forma parte de un complejo transportador de manganeso (Figura 2). En este complejo la PsaA actúa como proteína fijadora de sustrato. Las mutaciones en el gen que codifica esta lipoproteína disminuyen la adhesión a las células y a la virulencia e incrementan la sensibilidad al estrés oxidativo (50).

1.5.- Patogénesis.

La infección neumocócica se manifiesta de varias maneras, puede variar desde el estado del portador, sin infección del tracto respiratorio, a un cuadro invasivo de neumonía, meningitis, endocarditis, bacteremia o a infecciones purulentas como otitis media y conjuntivitis entre otras. La bacteremia puede ocurrir en asociación con una faringitis hasta una septicemia fulminante con hemorragias en las glándulas suprarrenales (síndrome de Waterhouse-Friderichsen). La meningitis neumocócica es la complicación más común de una sinusitis, mastoiditis, otitis o neumonía. *S. pneumoniae* es un habitante normal de la nasofaringe humana; su número es limitado por la competencia con otros microorganismos de la nasofaringe e igualmente por los mecanismos de defensa específicos del hospedero. La enfermedad generalmente se asocia con la adquisición de una nueva cepa, seguida por la alteración de la microbiota. Por lo tanto, el estado inmune del hospedero en el momento de la colonización, así como la virulencia de la nueva cepa adquirida determinarán si el neumococo lo invadirá o no (28).

El daño de la mucosa de la nasofaringe, debido a una infección viral, bronquitis asmática o al humo, alcohol u otras drogas predispone a la infección neumocócica y aumenta la colonización bacteriana debido a una mayor exposición de receptores del hospedero a la adherencia del neumococo. El mecanismo por el cual el neumococo migra de la nasofaringe a los pulmones o a la circulación es poco conocido. Se sabe que después de la colonización el microorganismo debe sobrepasar los mecanismos de defensa específicos para poder invadir. El efecto tóxico de la neuroaminidasa, del peróxido de hidrógeno y la acción de la proteasa IgA puede tener importancia en esta fase de la infección y puede aumentar la probabilidad de que la bacteria alcance directamente el torrente circulatorio o la trompa de Eustaquio. En alrededor de un 30% de los pacientes con una infección neumocócica la bacteria alcanza el torrente circulatorio; donde sobrevive protegido por la cápsula que impide la fagocitosis, En el caso en que la

bacteria alcance el pulmón, por esa otra vía encuentra una nueva línea de defensa que son los macrófagos alveolares en donde nuevamente la cápsula le permite sobrevivir, la respuesta inflamatoria causa daño en los tejidos pulmonares y puede resultar en una alteración de los mecanismos de intercambio de gases, lo que puede llevar a cuadros de insuficiencia respiratoria (28).

La meningitis ocurre cuando la bacteria infecta las meninges produciendo una inflamación local que altera la barrera hematoencefálica, existen cuadros sobreagudos que pueden llevar a la muerte en pocas horas o evolucionar favorablemente con algunas secuelas como sordera, ceguera, parálisis, etc. (28).

1.6.- Defensas del hospedero.

La inmunidad humoral tiene importancia en la resistencia adquirida contra el neumococo, la cápsula polisacárida es inmunogénica e induce anticuerpos protectores tipo específico, los anticuerpos anti-PS promueven la opsonización de la bacteria, los microorganismos también pueden ser opsonizados por la activación de la vía clásica o de la vía alterna del complemento, las bacterias opsonizadas son rápidamente ingeridas por los fagocitos y eliminadas, los polisacáridos son reconocidos por mecanismos independientes de las células T, por lo tanto, ellos no estimulan anticuerpos de alto nivel de afinidad, particularmente en niños menores de 2 años, tampoco inducen células de memoria necesarias para una respuesta anamnésica. Si la funcionalidad de las células B está disminuida, como ocurre en los niños pequeños o en los inmunocomprometidos como los pacientes con SIDA, el riesgo de las neumococias sistémicas aumentan (28).

1.7.- Tratamiento y resistencia.

1.7.1.- Tratamiento contra neumonía.

La neumonía en adultos: de acuerdo a su severidad se pueden distinguir dos grandes grupos los cuales son tratados con diferentes antibióticos (44):

I. Neumonía leve o moderada: tratamiento oral con amoxicilina, fluoroquinolonas de tercera o cuarta generación o macrólido.

II. Neumonía grave: terapia intravenosa.

a) Ceftriaxona, cefotaxima o amoxicilina-clavulánico asociados o no a un macrólido o fluoroquinolona de segunda generación.

b) Fluorquinolonas de tercera o cuarta generación en terapia.

Una vez conocidos los resultados microbiológicos y en el caso de sensibilidad demostrada puede continuarse el tratamiento con penicilina G por vía

intravenosa. Así, amoxicilina o cefuroxima por vía oral serían las primeras opciones en neumonía neumocócica ambulatoria no grave y el tratamiento intravenoso con amoxicilina, cefuroxima, cefotaxima o ceftriaxona, cambiando a vía oral tras la mejoría clínica, en los casos que precisen ingreso hospitalario (44).

1.7.2.- Tratamiento contra meningitis.

La meningitis neumocócica es una enfermedad grave que da lugar a una elevada mortalidad y secuelas como sordera, retraso mental, etc. Los criterios de tratamiento establecidos con penicilina y cefotaxima por el NCCLS están enfocados precisamente hacia este cuadro y se debe ser escrupulosos en su cumplimiento (45).

1.7.3.- Tratamiento contra otitis media.

El tratamiento para estas infecciones es entre los β -lactámicos, amoxicilina a dosis altas y ceftriaxona, alcanzan concentraciones suficientes en el oído y las mantienen por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI), más del 40% del intervalo entre dosis, por lo que se recomiendan como tratamiento para neumococos (46).

1.7.4.- Resistencia a antibióticos.

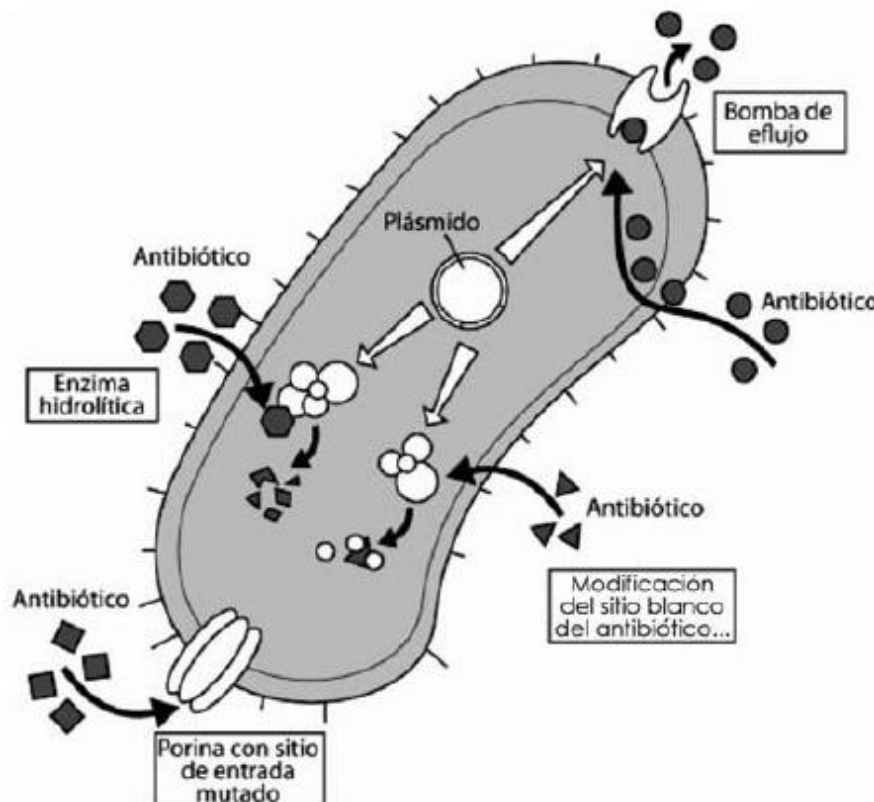


Figura 4. Diagrama de resistencia a antibióticos. Se muestran los cuatro mecanismos básicos para la resistencia a antibióticos que son; bomba de expulsión, modificación de sitio blanco del antibiótico, porina con sitio de entrada mutado, y la síntesis de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar el antibiótico, las figuras ● ▲ ■ ◆ simbolizan el antibiótico.

1.7.4.1.-Resistencia a β -lactámicos.

Los betalactámicos actúan en el último paso de la síntesis del peptidoglucano e inhiben las reacciones de transpeptidación catalizadas por varias proteínas de unión a penicilinas (PUP), inhibe la formación de la pared bacteriana.⁵⁶ La resistencia de *S. pneumoniae* a penicilina se debe al desarrollo de formas alteradas de proteínas (modificación de sitio blanco Figura 4) de unión a penicilina, de alto peso molecular, que presentan una baja afinidad por el antibiótico. La resistencia a penicilina afecta también al resto de los β -lactámicos y está ligada a modificaciones en las *pbp1a*, *pbp2x* y sobre todo *pbp2b*, mientras que alteraciones en las *pbp1a* y *pbp2x* afectan más a cefalosporinas de tercera generación (47).

1.7.4.2.- Resistencia a macrólidos.

Los macrólidos muestran poca afinidad por los ribosomas de células humanas, pero tienen una gran tendencia a fijarse al ARNm de la subunidad 23S bacteriana, lo que impide su función inhibiendo la síntesis de proteínas y a su vez el crecimiento bacteriano.⁵⁶ Dos principales mecanismos de resistencia a macrólidos han sido descritos en *S. pneumoniae*: modificación de sitio blanco (Figura 4) por modificación de la metilasa ribosómica 7 (gen *ermAM*) y bomba de expulsión (Figura 4) por la expulsión activa (gen *mefE*). El primero da lugar al fenotipo conocido como expresión fenotípica de resistencia, con CMI muy altas, que se caracteriza por resistencia a los tres grupos de antibióticos; macrólidos, estreptograminas y lincosamidas. El segundo mecanismo confiere resistencia frente a los macrólidos con CMI más bajas y no afecta a estreptograminas ni lincosamidas. Dos nuevos mecanismos, descritos inicialmente en mutantes de laboratorio, han sido identificados ahora en algunas cepas de Norteamérica y del este de Europa, con la particularidad de que la modificación en los aminoácidos encontrada en una cepa de Canadá incrementaba 500 veces la CMI de la telitromicina (47).

1.7.4.3.- Resistencia a quinolonas

El blanco principal de las quinolonas en los microorganismos grampositivos es la topoisomerasa IV, codificada por dos genes homólogos estrechamente relacionados, *parC* y *parE*, lo que impiden la reparación del ADN que puede sufrir daños constantes, lo cual ocasiona una serie de respuestas que producen la degradación del genoma y como resultado la muerte rápida de la bacteria

(56). Esta resistencia se da por mutación de sitio blanco (Figura 4), una mutación en *parC* confiere resistencia de bajo nivel, mientras que la resistencia de alto nivel requiere una segunda mutación en *parC* o mutaciones simultáneas en *parC* y *gyrA* (15). Es probable que recombinaciones entre genes de topoisomerasas de otras especies de estreptococos contribuyan en un futuro próximo a la extensión de resistencia de neumococos a fluoroquinolonas (47).

1.7.4.4.- Resistencia a optoquina.

El blanco de acción de la optoquina es la ATPasa de membrana y se une a las subunidades a, b, g, d, e. Este complejo citoplásmico dispone de un sitio catalítico para hidrolizar el ATP en ADP, es transmembranal y forma un canal de protones, la *S. pneumoniae* carece de cadena respiratoria y esta enzima genera un gradiente transmembranal de protones por medio de la energía liberada por la hidrólisis del ATP y éste regula el pH intracelular, esto hace que la enzima sea esencial para la viabilidad bacteriana, por lo que el inhibir de este mecanismo conlleva a la lisis bacteriana. Las mutaciones en los genes que codifican las subunidades de la ATPasa son las responsables de generar la resistencia de esta bacteria a la optoquina por medio de la mutación de sitios blanco (Figura 4). En 1987, Kontiainen y Sivonen informaron por primera vez la identificación de dos aislados clínicos de *S. pneumoniae* resistentes a la optoquina en muestras de sangre de un hombre de 74 años con neumonía y cirrosis hepática junto con el estudio de un niño de 8 meses con sepsis de otitis media. Desde entonces, la aparición de cepas *S. pneumoniae* optoquina resistentes se ha informado en los Estados Unidos, Israel, Portugal, Brasil y Argentina (48).

1.8.- Pruebas microbiológicas de identificación de *S. pneumoniae*.

Los métodos que se utilizan para identificar *S. pneumoniae* incluyen pruebas microbiológicas clásicas como la prueba de la optoquina (2). Otro método, llamado prueba de solubilidad en bilis, es confirmatorio y se basa en la capacidad de las sales para lisis a la *S. pneumoniae*¹³, sin embargo en la actualidad se utilizan otros métodos como la determinación del antígeno capsular que es un método serológico (3) o métodos moleculares para la determinación de genes de virulencia, como la autolisina y la neumolisina, éstos se determinan utilizando PCR que se ha usado y recomendado en estudios anteriores (2, 4, 5, 6).

Los métodos bioquímicos que se utilizan para identificar *S. pneumoniae* incluyen:

1.8.1.- Determinación de la actividad de lacatalasa.

La catalasa es unaenzimapresente en la mayoría de los microorganismosque poseen citocromos. Las bacterias quesintetizan catalasa hidrolizan el peróxido dehidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que selibera en forma de burbujas(Figura 5) (30).El *S. pneumoniae* carece de esta enzima, por lo tanto dicha prueba debe ser negativa para dicho patógeno.

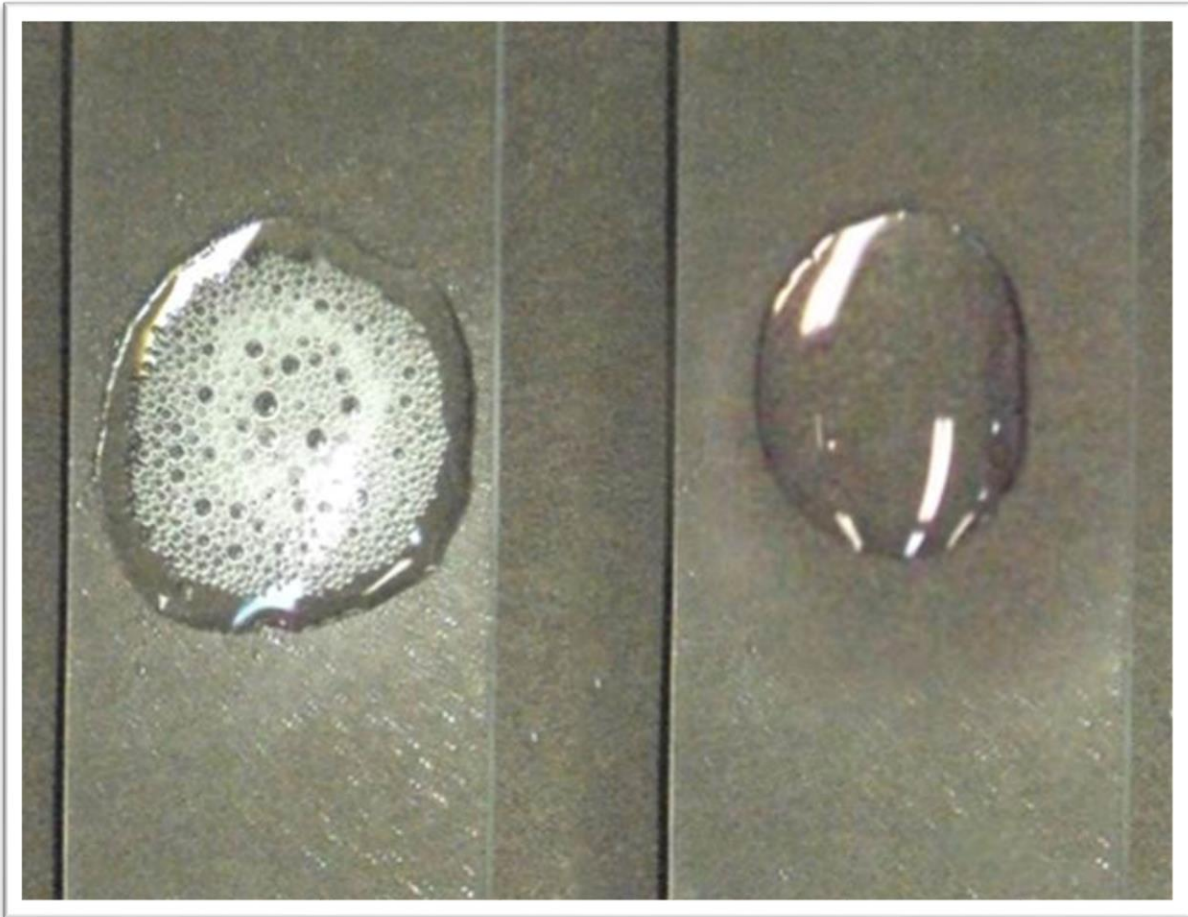


Figura 5. Prueba de actividad de la catalasa. Del lado izquierdo se observa un porta objetos con una muestra bacteriana positiva a esta prueba, mientras que del lado derecho se observa un porta objetos con una muestra bacteriana de *S. pneumoniae* que es negativa a esta prueba.

1.8.2.- Prueba de sensibilidad a optoquina.

Se utilizan discos de papel absorbente impregnados con 5 µg de etilhidroxicupreína (optoquina) para demostrar la sensibilidad del *S. pneumoniae* (Figura 6). Esta especie es sensible a la optoquina mientras que otras especies de estreptococos alfa-hemolíticos son resistentes a este compuesto (30).

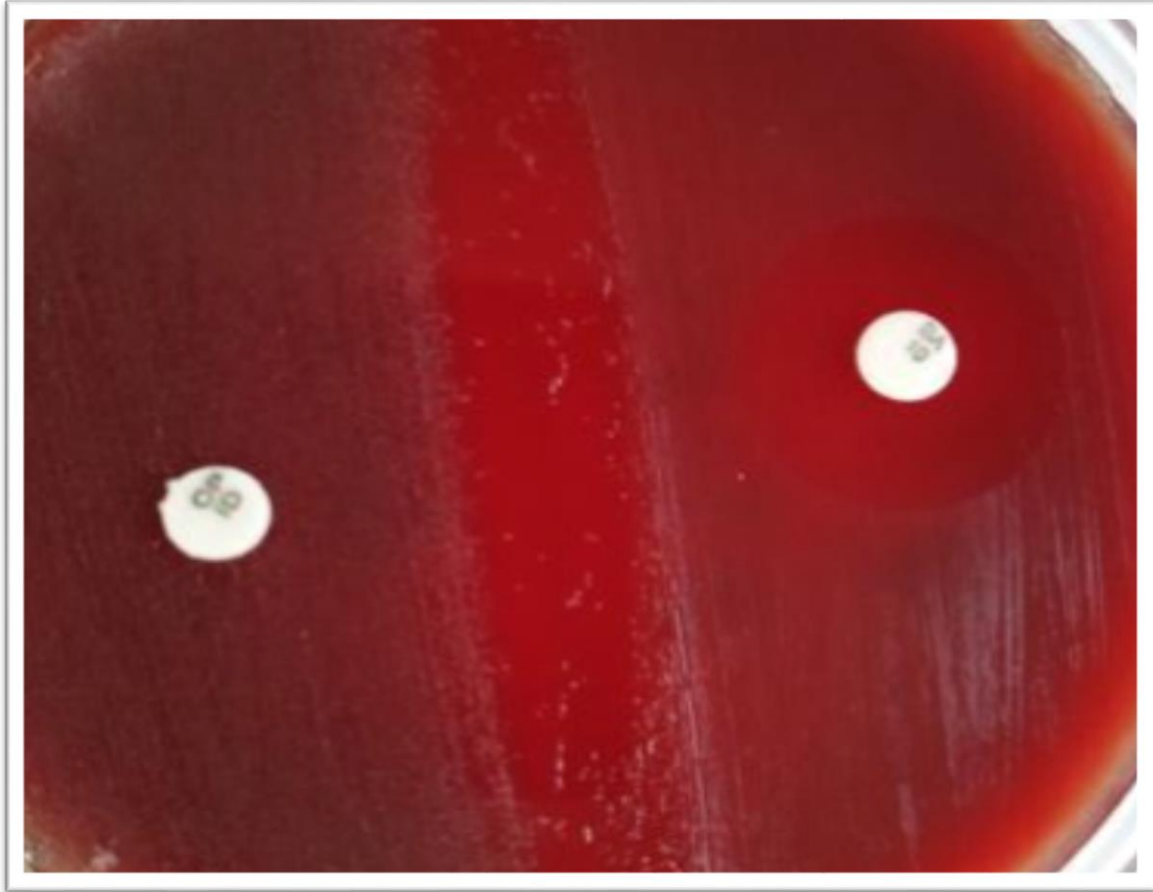


Figura 6. Prueba de sensibilidad a optoquina. Del lado izquierdo se observa un disco de papel impregnado con optoquina en interacción con una bacteria negativa a la prueba (sin halo de inhibición). Del lado derecho de igual manera se muestra un disco impregnado con optoquina en interacción con *S. pneumoniae*, en la cual se observa el halo de inhibición alrededor del disco.

1.8.3.-Prueba de sensibilidad abilis.

S. pneumoniae posee una enzima auto lítica intracelular, una amidasa, que lisa la pared celular durante la división. Al añadir sales biliares (desoxicolato de sodio) se activa esta enzima y se produce la autólisis del microorganismo (Figura 7) (30).

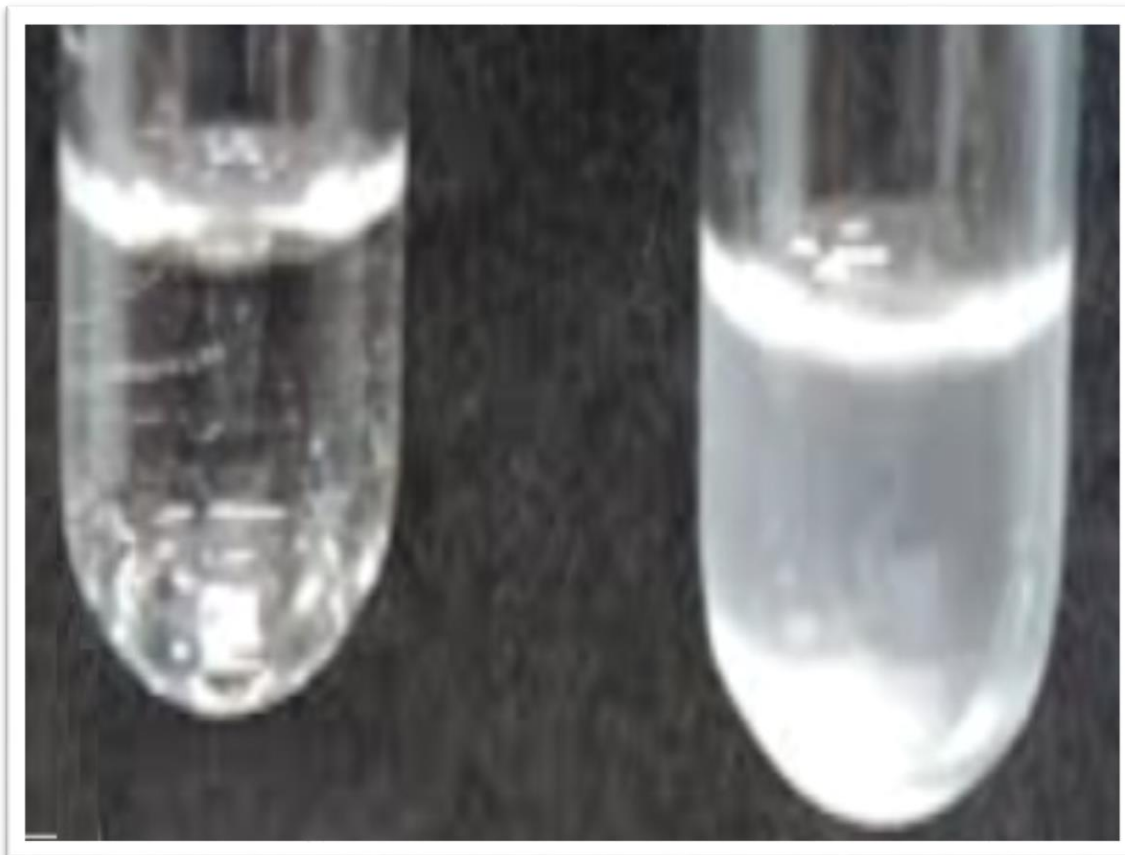


Figura 7. Prueba de solubilidad en bilis. Del lado izquierdo se observa una muestra de *S. pneumoniae* sometida a esta prueba, por lo que se ha eliminado la turbidez del medio que se observa al suspender a la bacteria en una solución líquida, del lado derecho se colocó una muestra de una bacteria negativa a la prueba de solubilidad en bilis, por lo que se nota la turbidez en el medio.

Las cepas neumocócicas resistentes a optoquina se dieron a conocer por primera vez en Finlandia en 1987³² y desde entonces los informes esporádicos de los aislados de diversas áreas geográficas han aparecido en la literatura (32, 33, 34, 35). En particular, Aguiar y cols. informaron recientemente la aparición de neumococo optoquina resistente en Portugal, lo que representó el 3,2% de todos los aislados clínicos recuperados de 30 laboratorios en todo el país. Con esto se demuestra que este método de identificación bacteriana es cada vez menos confiable, ésta no es la única desventaja de los métodos de identificación bacteriana, como se muestra en la Tabla 1. Además de esto los tres métodos básicos presentan ciertas desventajas siendo la más importante el tiempo para su realización, ya que todos éstos necesitan de un cultivo celular que básicamente

requiere de 18 a 24 horas para su crecimiento y posteriormente el tiempo para realizar la prueba y obtener resultados. A continuación se observa la Tabla 1 de las ventajas y las desventajas de los métodos de identificación de *S.pneumoniae*, entre las ventajas se encuentra que son métodos económicos, sencillos de realizar y de interpretar, entre las desventajas se encuentra principalmente la aparición de cepas resistentes a optoquina y el tiempo que se necesita desde la toma de la muestra hasta obtener el resultado.

METODO DE IDENTIFICACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	TIEMPO PARA OBTENER RESULTADOS
Catalasa	Económica. Los reactivos son fáciles de obtener(peróxido). Es sencilla. Resultados fáciles de interpretar.	Poco específica. La enzima está presente sólo en cultivos viables. Los cultivos viejos pueden dar resultados falsos negativos.	10 - 20 segundos a partir de un cultivo bacteriano (18-24 horas).
Optoquina	Económica. Los reactivos son fáciles de obtener (discos de optoquina). Es sencilla. Resultados fáciles de interpretar.	Existen cepas de <i>S. pneumoniae</i> resistentes a la optoquina. Un porcentaje elevado de cepas no capsuladas tienen sensibilidad intermedia.	De 18-24 a partir de un cultivo bacteriano (18-24 horas).
Solubilidad en bilis	Económica. Los reactivos son fáciles de obtener (desoxicolato desodio). Es sencilla. Resultados fáciles de interpretar.	La prueba no debe realizarse con cultivos viejos, ya que la actividad enzimática podría perderse.	2 horas a partir de un cultivo bacteriano (18-24 horas).

Tabla1. Ventajas y desventajas de los métodos de identificación de *S. pneumoniae*. Se muestran las tres pruebas bioquímicas básicas para la identificación de *S. pneumoniae*, éstas son en conjunto la manera clásica de identificar a este microorganismo.

1.9.- Pruebas moleculares de identificación de *S. pneumoniae*.

Entre las ventajas de estos métodos de identificación es que son métodos altamente sensibles aunque entre sus desventajas tenemos que son métodos con altos costos, son pruebas tardadas, ya que para realizarlas se necesita aislar la muestra y cultivarla alrededor de 18 h. Estos se muestran en la Tabla 2.

1.9.1.- Secuenciación.

En la década de los 80 comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador housekeeping está en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Así pues, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en su secuencia (30).

1.9.2.- PCR.

Este procedimiento se realiza en un termociclador en donde el ADN genómico se utiliza como molde para la amplificación por PCR de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1.500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Para esto se utilizan cebadores universales o complementarios a las regiones conservadas, por lo que se amplificaría únicamente el gen del ARNr 16S de la bacteria en la que los cebadores hibriden. Ninguno de los cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garantice la amplificación de todos los procariotas (30).

1.9.3.- Microarreglos.

Los microarreglos son en la actualidad una poderosa herramienta de análisis de expresión de genes, debido al mayor número de secuencias que se pueden analizar al mismo tiempo y tienen grandes ventajas sobre otras técnicas como la PCR convencional, la RTPCR y la PCR en tiempo real, en las cuales sólo se pueden analizar un número muy limitado de genes de manera simultánea, debido a que en la mayoría de los casos se requiere montar un ensayo por cada gen a analizar. En términos generales, un microarreglo se encuentra integrado por dos partes, el material biológico o sintético denominado como prueba y el soporte sólido en el cual se inmoviliza o adsorbe el material biológico. Una vez extraído el ADN genómico, éste se hace interaccionar con el microarreglo para que éstos hibriden y posteriormente esto emitirá un resultado que podrá ser interpretado como positivo o

negativo para distintos genes al mismo tiempo (30).

Método	Tiempo	Sensibilidad	Requiere equipo y personal especializado	Costos
PCR	Desde 4 a 12 hrs +18 hrs	Alta	Sí	2000-4000 NMX
Microarreglos	2-4 hrs + 18 hrs	Alta	Sí	≥10 000 NMX
Secuenciación	7-48 hrs + 18 hrs	Alta	Sí	>200 NMX

Tabla 2. Ventajas y desventajas de algunos métodos moleculares de identificación bacteriana. En esta tabla se comparan tres métodos moleculares utilizados para la identificación de *S. pneumoniae* de los cuales podemos destacar que todos necesitan personal especializado, tienen altos costos y no son inmediatos aunque son métodos altamente sensibles.

II. ESTADO DEL ARTE.

2.1.- Nanotecnología.

De acuerdo con la Fundación Nacional de Ciencia y a la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos, la nanotecnología es la capacidad de entender, controlar y manipular la materia a nivel de "supramolecular" que involucra grupos de moléculas (en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 100 nm) con el fin de crear materiales, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones debido a su estructura pequeña. La definición implica el uso de los mismos principios y herramientas para establecer una plataforma unificadora para la ciencia y la ingeniería a nano escala y el uso de las interacciones atómicas y moleculares para desarrollar métodos de fabricación eficientes.

El control de la nanotecnología promete una plataforma tecnológica amplia y revolucionaria para diferentes sectores como la industria, biomedicina, ingeniería del medio ambiente, seguridad y protección, alimentos, recursos hídricos, conversión de energía y muchas otras áreas (14). La primera definición de la nanotecnología que logró cierto grado de aceptación internacional se desarrolló después de consultar con expertos en más de 20 países en 1987-1998 (51, 52). Sin embargo, a pesar de su importancia, no existe una definición reconocida a nivel mundial. Básicamente cualquier definición de nanotecnología incluye tres elementos:

- El rango de tamaño de las estructuras materiales bajo consideración - la escala de longitud intermedia entre un solo átomo o molécula y alrededor de 100 diámetros moleculares o alrededor de 100 nm. Esta condición por sí sola no es suficiente, ya que todos los sistemas naturales y artificiales contienen estructuras a nano escala (14).
- La capacidad de medir y transformar a nano escala; sin ella no tenemos nueva comprensión y una nueva tecnología; tal facultad se ha alcanzado sólo parcialmente hasta ahora, pero se han logrado progresos significativos en los últimos cinco años (14).
- El último elemento es la capacidad, las ventajas, propiedades y funciones específicas que tienen los elementos a nano escala sobre los compuestos desarrollados a micro y macro escala; esto es una motivación clave para la investigación a nano escala (14).

En las últimas dos décadas científicos e ingenieros han dominado la complejidad de trabajar con materiales a nano escala. Ahora los investigadores tienen una idea más clara de cómo crear materiales a nano escala con propiedades que nunca se imaginaron antes, ahora productos que utilizan materiales a nano escala y el proceso para su fabricación ya están disponibles para su consumo. Por ejemplo baterías para herramientas se fabrican con materiales a nano escala con el fin de ofrecer más potencia, más rápidamente con menos calor. Los protectores solares que contienen dióxido de titanio a nano escala u óxido de zinc son transparentes y reflejan la luz ultravioleta para prevenir las quemaduras de sol (15). La nanotecnología puede ser utilizada para diversas funciones, en esta investigación únicamente nos enfocaremos en la nanotecnología para sistemas de bio sensado.

2.2.- Nanosensores.

Los nanosensores son dispositivos de sensado de un diámetro menor a 100 nm, éstos son utilizados principalmente para tres áreas; a) monitoreo físico y químico de fenómenos en áreas de difícil alcance, b) detección bioquímica de organelos, moléculas o células, y c) detección de partículas en el campo de la industria y el medio ambiente. Los nanosensores pueden ser agrupados en tres grandes categorías por sus mecanismos de funcionamiento:

2.2.1.- Nanosensores ópticos.

Los primeros nanosensores ópticos están basados en una fluorescencia, la cual se unía a una nanopartícula y ésta era utilizada para medir el pH o localizarse dentro de una célula. El nanosensor óptico más básico es una nanopartícula marcada con alguna fluorescencia o tinción que podía ser introducida en una célula para poder resaltar una área deseada, la ventaja de éstas es que tenían la capacidad de causar el mínimo daño a la célula y sus principales desventajas eran la interferencia del marcaje celular como resultado de la unión de algunas proteínas, en algunos casos los nanosensores también podían ser fagocitados por las células para su degradación (69).

2.2.2.- Nanosensores con fibra óptica.

Los métodos convencionales para la investigación intracelular necesitan fijar a la célula muestra para realizar su análisis, este proceso de fijado usualmente podía destruir a la célula o realizar cambios en su estructura. Los nanosensores de fibra ópticos tienen el potencial de analizar procesos celulares *in vivo*, en una señal eléctrica o en cualquier otra señal medible, esta señal a su vez podrá ser reconocida por un sistema de fibra óptica para emitir una señal que podrá ser interpretada por sistema o base de datos (69).

2.2.3.- Nanosensores electromagnéticos de detección por medición de la corriente eléctrica.

El principal ejemplo es el de nanopartículas de oro suspendidas en sulfuro de hidrógeno en el que el fundamento básico es que la adsorción de moléculas de sulfuro de hidrógeno en las nanopartículas cambia el comportamiento de sus electrones cuando éstas interactúan con su blanco, por lo tanto al aplicar una corriente eléctrica ésta sufrirá una variación al momento en que la nanopartícula haga interacción, esta alteración podrá ser medida e interpretada como una señal (69).

2.2.4.- Nanosensores mecánicos.

En estos sistemas se miden la interacción de nanoesferas ensambladas en dispositivos microelectrónicos, estas nanoesferas tienen características medibles como vibración y elasticidad dándole la capacidad a este dispositivo de medir frecuencia de resonancia, constante de elasticidad, presión y aceleración (69).

2.3.- Nanopartículas como biosensores.

En la era de la nanotecnología las nanopartículas de metales nobles (NP's) han jugado un papel importante en el desarrollo de nuevos bio sensores y en la mejora de las técnicas de biosensores existentes para satisfacer la demanda de diagnósticos biomoleculares más específicos y altamente sensibles. Las propiedades fisicoquímicas únicas de tales metales en la nano escala han conducido al desarrollo de una amplia variedad de biosensores, tales como: (i) Nanobio sensores para diagnóstico y atención de enfermedades. (ii) Nanosondas para la detección *in vivo* de imagen, seguimiento y monitoreo de

células enfermas o la vigilancia de la terapia (17).

Es importante destacar que dadas las características y las ventajas que ofrece la nanotecnología una nanopartícula no tiene la capacidad específica de seleccionar o adherirse selectivamente a un tipo de célula, para lo que se necesitaría un ligandocapaz de darle a las nanopartículas una capacidad selectiva.

3.2.- Nanopartículas acopladas a aptámeros.

En el caso de administración local de fármacos, tales como los que se suministran a través de la inyección de vehículos dentro de un órgano, es posible lograr un efecto deseado dentro de un subconjunto de células en contraposición a un efecto generalizado en todas las células del órgano diana. En el caso del cáncer, los efectos citotóxicos de un agente terapéutico serían dirigidos a las células cancerosas y así se lograría reducir al mínimo el daño a las células no cancerosas dentro y fuera del órgano objetivo (18). Estas a su vez pueden ser marcadas para funcionar como un medio de contraste específico para poder marcar las células dañadas con cáncer, además también han surgido sensores capaces de reconocer específicamente alguna bacteria como *Staphylococcus aureus*.

El uso de las nanopartículas es muy variado y aunque la aplicación de la nanotecnología en distintos campos de la medicina es de reciente desarrollo, es necesario que se continúe con dichos avances, ya que éstos ofrecen una amplia gama de recursos con un sin fin de posibles aplicaciones en distintos campos. Debido a esto hemos optado en esta investigación por utilizar nanopartículas como biosensores bacterianos.

Distintas clases de moléculas han tenido aplicación en la nanotecnología, incluyendo diversas formas de moléculas basadas en anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos humano murino, anticuerpos humanizados, de una sola cadena generados a partir de un hibridoma murino o de presentación de fagos, etc. Otras clases de ligandos tales como hidratos de carbono y ligandos de ácido nucleico también llamados aptámeros se han utilizado como ligandos para aplicaciones de administración dirigida. Los aptámeros son una nueva clase de ligandos que son pequeños, no inmunogénicos, fáciles de sintetizar, caracterizar y modificar y exhiben una alta especificidad y afinidad por su blanco (18).

3.3.- Aptámeros.

Los aptámeros son pequeños ácidos nucleicos de una sola hebra que se pliegan en una estructura tridimensional bien definida. Ellos muestran una alta afinidad y especificidad por sus moléculas diana. Los aptámeros pertenecen a la familia de los ácidos nucleicos y son sintetizados químicamente (36).

El concepto de moléculas de ácido nucleico que actúan como ligandos fue descrito por primera vez en la década de 1980 cuando se demostró que algunos virus codifican ARN pequeño estructurado que se une a las proteínas del huésped con alta afinidad y especificidad. Estos ligandos de ARN habían evolucionado con el

tiempo para mejorar la supervivencia y la propagación de los virus (18).

Posteriormente, se demostró que estos ligandos de ARN de origen natural pueden inhibir la replicación viral y tener beneficios terapéuticos. Además se han descrito métodos para llevar a cabo la evolución *in vitro* para aislar nuevos ligandos de ácido nucleico que se unen a un gran número de moléculas con diversas aplicaciones en la investigación y la práctica clínica (18).

A diferencia de los anticuerpos como ligandos los aptámeros presentan ciertas ventajas para su uso, éstas se muestran en la Tabla 3. Entre estas ventajas sobresale su manipulación, estabilidad, afinidad y especificidad al igual que su rango de blancos en donde los aptámeros tienen ventaja sobre los anticuerpos además que los aptámeros resultan ser no inmunogénicos.

	Aptameros	Anticuerpos
Rango de blancos	Puede ser producido contra casi cualquier blanco	Limitado a blancos que producen una respuesta inmune
Síntesis y manufactura	Producido en vitro (no se utilizan animales) Baja variabilidad entre lotes Sintetizado químicamente	Producidos en animales Baja reproducibilidad entre lotes Se requieren reactivos caros para ser sintetizados
Manipulación y almacenamiento	Son estables a temperatura ambiente No es necesario que sean refrigerados o congelados	Deben mantenerse refrigerados o congelados Se desnaturalizan fácilmente.
Estabilidad	Pueden resistir repetidas rondas de desnaturalización sin perder su función	Funciona solo bajo condiciones específicas
Vida media	Larga vida media puede durar varios años congelado Puede ser reusado varias veces	Limitado a seis meses Un solo uso
Complicaciones <i>in vivo</i>	No despierta respuesta inmune	Puede causar respuesta inmune
Afinidad y especificidad	Alta afinidad y gran especificidad debido a su proceso de aislamiento	Alta afinidad y buena especificidad

Tabla 3. Ventajas de los aptámeros sobre los anticuerpos. Se muestra una comparación entre los anticuerpos y los aptámeros en donde sobresalen las ventajas que tienen los aptámeros. Además de los mostrados en esta tabla, los aptámeros una vez seleccionados son económicos y para su reproducción sólo es

necesario conocer su secuencia.

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO.

3.1.- Bio análisis.

El campo del biosensor es uno de los focos más importantes de la nanotecnología. El uso de biomoléculas acopladas a nanopartículas ofrece nuevas oportunidades para los sistemas de bio detección. La capacidad electroquímica de nanopartículas ofrece alternativas de detección altamente sensibles, además de ser la técnica más fácil y barata comparada con detecciones ópticas tales como espectroscopía de fluorescencia, microscopías o espectrofotometrías (54).

3.1.1.- Sensores y bio sensores.

Un sensor químico se define como un dispositivo que responde a un analito particular de manera selectiva a través de una reacción química y que puede usarse para la determinación cualitativa o cuantitativa de un determinado analito. De acuerdo con las recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), un biosensor es un dispositivo autónomo integrado por un receptor(o bio receptor) y un elemento transductor (Figura 8) que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa (54).

Sus dos elementos son esenciales: en primer lugar, la capacidad de reconocimiento molecular de un bio sensor (Figura 8) que pueden estar formados por; anticuerpos, ADN, enzimas y componentes celulares de sistemas vivos o nanopartículas, en segundo lugar, el elemento transductor para traducir las interacciones del elemento de bio reconocimiento en una señal detectable, la cantidad de señal generada es proporcional a la concentración del analito permitiendo mediciones tanto cuantitativas como cualitativas en tiempos cortos. El elemento de bio reconocimiento le da al sistema la capacidad de responder selectivamente a un analito o grupo de analitos particulares, evitando así las interferencias de otras sustancias, por lo tanto, un elemento altamente selectivo y sensible de bio reconocimiento (bio receptor) es la base para el desarrollo de un bio sensor eficiente (54).

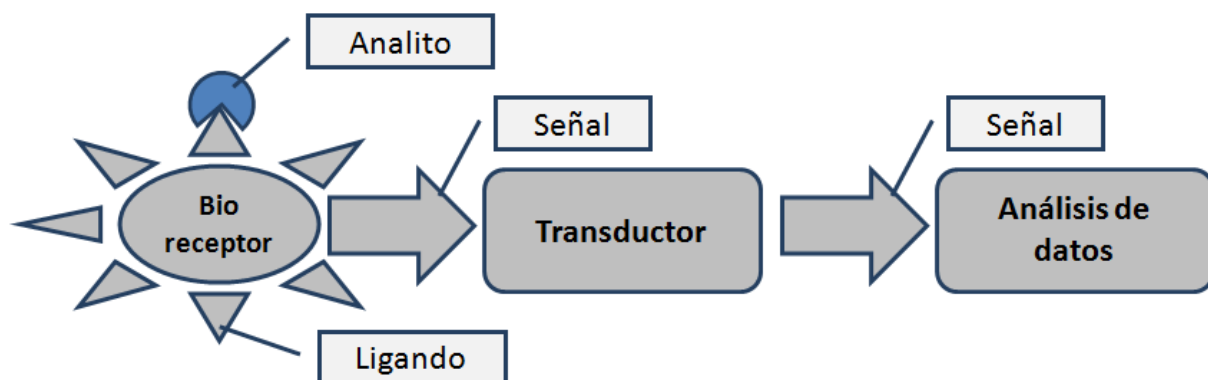


Figura 8. Diagrama de un bio sensor. Se muestra del lado izquierdo un bio receptor que interacciona con un analito, posteriormente la información de la señal de

interacción pasa a un elemento transductor que emite datos que pueden ser analizados.

3.1.2.- Tipos de bio sensores

3.1.2.1.- Bio sensores de afinidad.

Los biosensores electroquímicos de afinidad, basados en el etiquetado enzimático, resuelven los problemas de detección radioactiva (por ejemplo, riesgos para la salud) y abren nuevas posibilidades en ensayos biológicos ultrasensibles y automatizados. Sin embargo, la investigación biológica y otros campos científicos y tecnológicos necesitan una gama más amplia de etiquetas más fiables y más robustas para permitir el bioanálisis de alto rendimiento y la determinación simultánea de múltiples analitos. Las técnicas de marcado existentes (por ejemplo, enzimas o isótopos) tienen varios inconvenientes: los marcadores usados tienen tiempos de vida cortos y tienen un número limitado de combinaciones prácticas (de más de dos enzimas), para el análisis simultáneo de diversos analitos existe diferentes tipos de bio sensores por afinidad. A continuación hablaremos de ellos (54).

3.1.2.1.1.- Inmunosensores.

Los inmunosensores son bio sensores basados en ligando de afinidad en los que la reacción inmunoquímica se acopla a un transductor, estos bio sensores usan anticuerpos como el elemento de detección bioespecífico y se basan en la capacidad de un anticuerpo para formar complejos con el correspondiente antígeno, los inmunoensayos están entre los más específicos de las técnicas analíticas, estos proporcionan límites de detección extremadamente bajos y pueden utilizarse para una amplia gama de sustancias. A medida que la investigación avanza hacia la era de la proteómica, estos ensayos se vuelven extremadamente útiles para identificar y cuantificar proteínas. Los inmunosensores se basan en reacciones inmunológicas que se utilizan para el reconocimiento del antígeno por el sitio de unión del anticuerpo para formar el complejo estable antígeno/anticuerpo (54).

3.1.2.1.2.- Genosensores.

Los biosensores de ADN representan un tipo muy importante de biosensores de afinidad en los que las moléculas de bio reconocimiento son oligonucleótidos de secuencia conocida y el evento de reconocimiento es la hibridación con las secuencias complementarias. Entre los diversos tipos de sensores de ADN, el sensor electroquímico tiene la ventaja que utiliza equipos muy simples para realizar mediciones a bajo costo y cuenta con la posibilidad de miniaturización, los bio sensores de ADN basados en la hibridación de ADN juegan un papel cada vez más importante en el análisis de ADN, aunque no son el único tipo, ya que se han estado desarrollando bio sensores basados en aptámeros. Éstos como tal no hibridan con su blanco sino que utilizan la capacidad del ADN para plegarse y formar estructuras terciarias que pueden unirse a un blanco específico (54).

3.1.2.1.3.- Aptasensores

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que se están investigando para su uso clínico y como sensores. Estas pequeñas moléculas de ARN/ADN pueden formar estructuras capaces de formar uniones específicas a proteínas de superficie celular u otras dianas celulares y son esencialmente un equivalente químico de anticuerpos. Los aptámeros tienen la ventaja de ser altamente específicos de tamaño relativamente pequeño y no inmunogénico (11). La conjugación de los aptámeros y las nanopartículas de hierro puede utilizarse como un bioreceptor de *S. pneumoniae*, para ser utilizado como un bio sensor bacteriano. Las nanopartículas de oro pueden ser utilizadas para numerosas aplicaciones, tales como la mejora de contraste en microscopías, reparación de tejidos, inmunoensayos, la desintoxicación de fluidos biológicos, hipertermia, la administración de fármacos y la separación de células. Todas estas aplicaciones biomédicas requieren que las nanopartículas tengan un revestimiento superficial específico, que tiene que ser no tóxico y biocompatible. Dichas nanopartículas pueden unirse a los medicamentos, proteínas, enzimas, anticuerpos o nucleótidos y aptámeros y pueden ser dirigidas a un órgano, tejido, tumor o en este caso a algún microorganismo como una bacteria (10). A continuación se muestran algunos ejemplos de nanopartículas conjugadas con aptámeros para ser utilizados como bio sensores:

En el año 2010 Xun Mao y cols. desarrollaron una tira de nanopartículas conjugadas con aptámeros utilizadas como bio sensores para la detección rápida, sensible y cuantitativa de las células cancerosas. Este sistema bajo circunstancias óptimas fue capaz de detectar un mínimo de 4000 células sin ninguna otra instrumentación únicamente mediante detección visual y 800 células con un lector de banda móvil en un tiempo de 15 min. También en el 2013 Yi Chung Chang y cols. diseñaron un método rápido de detección de *Staphylococcus aureus*, el cual está basado en nanopartículas de oro acopladas a aptámeros capaz de reconocer a su blanco específicamente de entre otras catorce bacterias distintas.

Como los ejemplos anteriores se han desarrollado un gran número de bio sensores o sistemas de suministros de fármacos basados en nanopartículas acopladas con aptámeros de ADN o de RNA. Éstos han repercutido notablemente en casi todas las ramas de la medicina como la cardiología (67), oftalmología (62), endocrinología (61), oncología (60), inmunología (60) y ortopedia (66), los bio sensores de este tipo no han sido únicamente diseñados para el campo de la medicina también están siendo utilizados con otras funciones como; medir el intercambio de pH (65), la luz (63), la temperatura (64), o la presencia de un analito tal como glucosa (68).

3.3.1.- Selección de aptámeros.

Desde el establecimiento del procedimiento SELEX en 1990, muchos aptámeros se han generado contra una variedad de objetivos, incluyendo compuestos químicos de pequeñas a grandes proteínas con multidominios, aunque el SELEX se lleva a cabo por lo normal usando una molécula diana altamente purificada, un estudio teórico ha

sugerido que los objetivos heterogéneos complejos también se pueden emplear para la generación de aptámeros específicos (23).

Esta idea ha sido confirmada experimentalmente por la identificación de los aptámeros contra los glóbulos rojos (24), seguido de la identificación contra tripanosomas africano vivo (25) con la combinación de un paso negativo de selección, por medio de éste las variantes de unión a las células no diana son eliminados. Debido a varias características atractivas de SELEX utilizando células vivas o Cell-SELEX, variedades de células vivas se han utilizado como objetivos para este procedimiento.

En el corto tiempo desde que Jack Szostak y Larry Gold describen de forma independiente las bases de la metodología para la evolución *in vitro* de los aptámeros, estos ligandos se han surgido como una clase importante de moléculas para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (18).

El proceso para la selección de aptámeros es conocido como systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX), es la parte más importante del aislamiento de aptámeros y consta de pasos iterativos de unión y amplificación usando una biblioteca de oligonucleótidos (18, 19). Antes de comenzar el proceso SELEX, una biblioteca de oligonucleótidos mono catenarios de ADN debe ser sintetizada químicamente con secuencias fijas en cada extremo que flanquean una región de 40 nucleótidos sintetizados de manera aleatoria.

Se calcula que 1 nmol corresponde a aproximadamente 1×10^{15} secuencias y estos se utilizan como una plantilla para generar un transcrito de 80 nucleótidos con la ADN polimerasa. Para iniciar el proceso SELEX, la biblioteca de oligonucleótidos se incuba con la proteína diana. Los aptámeros unidos a la proteína se separan de los aptámeros no unidos y luego se amplifican y se purifican para cerrar una ronda del proceso, las rondas de selección posteriores seleccionan aún más a la biblioteca de aptámeros, ya que se aplica presión para seleccionar sólo las interacciones de alta afinidad. Por lo general el proceso de selección varía desde ocho hasta veinte rondas para alcanzar la afinidad deseada por la proteína diana. Estos pasos son automatizables²¹, lo que implica que el proceso SELEX puede seguir el ritmo de la aceleración hasta alcanzar la tasa de selección deseada.

Al finalizar el experimento SELEX los aptámeros seleccionados son secuenciados y analizados por su afinidad. Para lograr una síntesis química más eficiente, los aptámeros se diseñan con el tamaño más pequeño posible para igualmente conservar su alta afinidad. Por lo normal se trata de minimizar el tamaño de los nucleótidos para alcanzar una longitud de 80 nucleótidos (22).

IV. IMPORTANCIA DE CONTINUAR CON EL PROYECTO.

S. pneumoniae es una bacteria de importancia médica por los efectos que puede tener sobre el paciente, por lo que un diagnóstico temprano es necesario. Además los métodos de diagnóstico más frecuentes generan falsos negativos, por lo tanto se requiere desarrollar nuevos métodos de diagnóstico bacteriológico directos que permitan obtener un método de bio sensor de este patógeno, disminuyendo el tiempo de respuesta a los padecimientos causados por dicho patógeno, por lo que es necesaria la construcción de un bioreceptor capaz de reconocer con alta especificidad a esta bacteria, lo que redundará en el establecimiento de nuevos esquemas para evitar padecimientos letales generados por *S. pneumoniae* y que en un futuro podrá ser utilizado como un método diagnóstico de referencia.

V. HIPÓTESIS.

Si una secuencia de aptámeros puede unirse y reconocer específicamente a *S. pneumoniae*, entonces éstos podrían conjugarse con nanopartículas de oro para funcionar como un bio receptor.

VI. OBJETIVOS.

6.1.- Objetivo general

Seleccionar un aptámero específico para *S. pneumoniae* que acoplado a nanopartículas de oro pueda funcionar como un bio receptor.

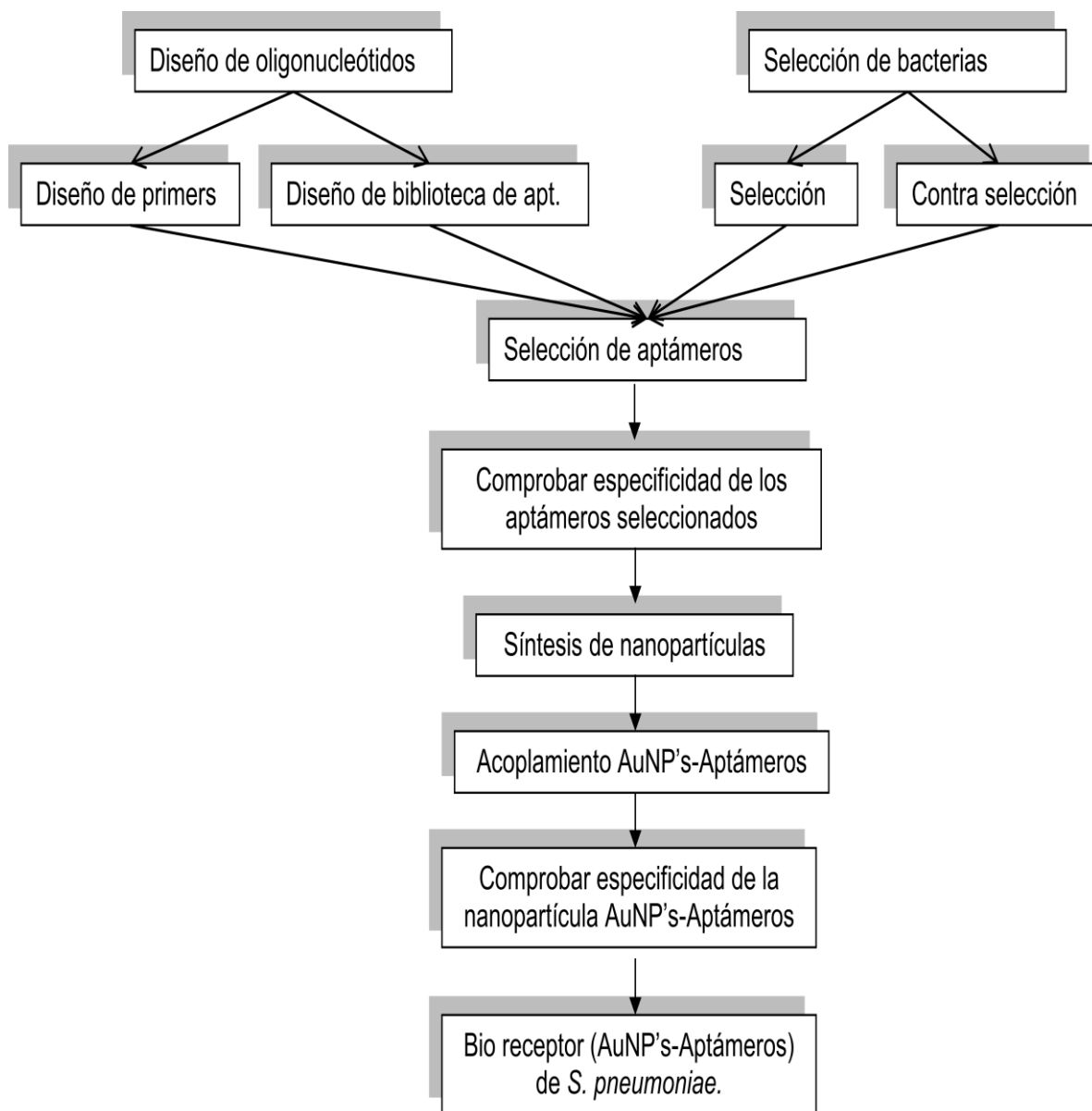
6.2.- Objetivos específicos

-Obtener una secuencia de aptámeros que se una específicamente a la superficie de *S. pneumoniae*.

-Conjugar aptámeros a la superficie de las nanopartículas de oro.

-Verificar la interacción entre *S. pneumoniae* y las nanopartículas de oro conjugadas con los aptámeros.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



VIII. METODOLOGÍA.

8.1.- Cepas bacterianas.

Las bacterias utilizadas para los experimentos fueron; *S. pneumoniae* (ATCC 49619, TIGR4, aislado clínico), *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus epidermidi*, *Helicobacter pylori* y *Acitenobacter baumanii*

8.1.1.- Cultivos en medio sólido.

Los cultivos se realizaron en agar sangre de carnero al 5% esterilizado, con un estriado masivo e incubado a 37°C durante 18 h, en una atmósfera regulada a 10% de CO₂ (SANYO, CO₂Incubator).

8.1.2.- Cultivos en medio líquido.

Después del crecimiento en un medio sólido las bacterias son recuperadas del medio y sembradas en un medio líquido Todd Hewitt enriquecido con extracto de levadura al 5% estéril. El medio inoculado se incubó a 37°C durante 18 horas en una atmósfera regulada al 10% de CO₂.

8.1.3.- Conservación bacteriana en el laboratorio.

Las bacterias se cosecharon en medio sólido y se almacenaron en criotubos eppendorf estériles de 1.5 ml, al cual se le agregaron .750 µl de caldo Todd Hewitt estéril y 0.200 µl de glicerol al 30% estéril y se mantuvo a -70°C.

8.2.- Cell-SELEX.

8.2.1.- Diseño del experimento.

Para nuestro proceso de selección hemos decidido tomar bacterias que se relacionan con las zonas que coloniza *S. pneumoniae*, basándonos en las tres patologías más comunes que causa el *S. pneumoniae*, que son; neumonía, otitis media y meningitis. También se seleccionaron dos bacterias distintas a *S. pneumoniae*, que causan cada una de patologías mencionadas y para corroborar la especificidad, utilizamos dos bacterias que fueron elegidas únicamente por el hecho de que no están relacionadas con los tejidos que infecta *S. pneumoniae*.

8.2.3.- Bacterias de selección y contra selección

Otitis media

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pyogenes

Pseudomonas aeruginosa

Neumonía

Streptococcus pneumoniae

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Meningitis*Streptococcus pneumoniae**Staphylococcus aureus**Escherichia coli***No relacionados***Salmonella spp.**Staphylococcus epidermidis*

Además de esto también utilizamos tres cepas distintas de *S. pneumoniae* que son TIGR4, ATCC 49619 y un aislado clínico, a las que una vez realizadas las rondas de contra selección se les realizó rondas de selección a cada una. A continuación se muestra una tabla que indica los ciclos de selección y contra selección, siendo nuestro blanco *S. pneumoniae* TIGR4 (Tabla 4).

Ciclo	Microorganismo	Ciclo	Microorganismo
1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Exponencial)	10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	<i>Escherichia coli</i>	11	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Exponencial)
3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Latencia)	12	<i>Salmonella spp.</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	13	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Estacionaria)
5	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Estacionaria)	14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6	<i>Streptococcus pyogenes</i>	15	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Decaimiento)
7	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Decaimiento)	16	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619

8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	<i>Streptococcus pneumoniae</i> aislado clínico
9	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Latencia)	18	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Exponencial)

Tabla 4. Ciclos de selección y las diferentes bacterias que fueron utilizadas en cada ciclo. En verde se encuentran marcadas las bacterias en ciclos de selección y en rojo las bacterias en ciclos de contra selección.

8.2.3.- Distintos tiempos de crecimiento de *S. pneumoniae*.

Pensando en la posibilidad de que exista diferente expresión de proteínas durante las diferentes etapas de crecimiento de la bacteria, decidimos tomar a nuestra cepa “blanco” TIGR4 en diferentes etapas de su crecimiento, cada etapa fue tomada un mínimo de dos veces durante el proceso de selección. La bacteria fue tomada a las 3, 6, 14 y 22 h (figura 9).

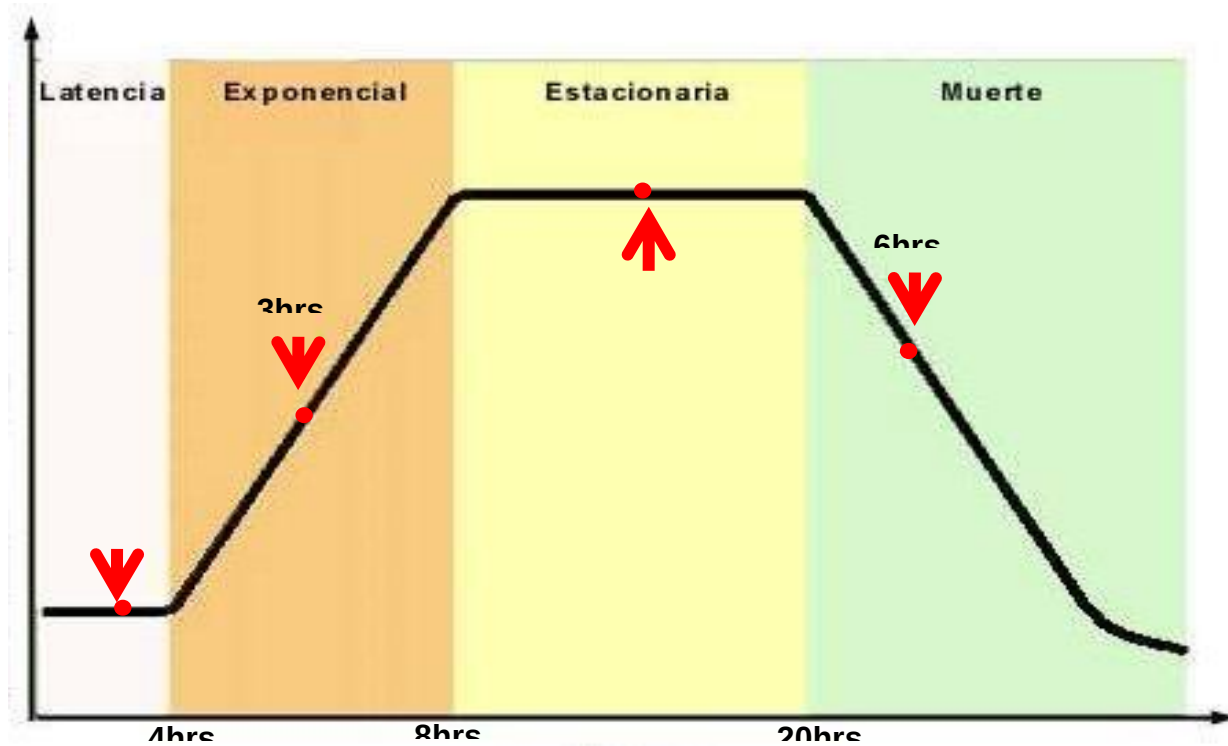


Figura 9. Curva de crecimiento bacteriano. Los puntos rojos son las diferentes h en las que la bacteria fue tomada.

8.2.4.- Diseño de oligonucleótidos.

8.2.4.1.- Diseño de la biblioteca de aptámeros.

El diseño de la biblioteca de aptámeros se realizó considerando lo siguiente; una secuencia denucleótidos de 80 bases, una secuencia aleatoria de 40 bases flanqueada de dos secuencias conocidas que hibridaron con los cebadores o primers para su amplificación, la secuencia se muestra en la Tabla 5.

Biblioteca de aptámeros
5' - AAC CCA ATG GAT AGC CGC GAA 40N GGC GGA TAC TAT CCG GGA C – 3'

Tabla5. Diseño de la biblioteca aptámero, la “40N” simboliza 40 nucleótidos aleatorios.

8.2.4.2.- Diseño de los primers

Los primers fueron diseñados considerando que la secuencia sentido debía ser purificada, por lo tanto el primer anti sentido fue biotinilado para posteriormente purificarlo por medio de una cromatografía de afinidad acoplada a agarosa-estreptavidina, a su vez el primer sentido fue marcado con 6FAM para posteriormente comprobar su interacción con nuestro blanco por microscopía de epifluorescencia, las secuencias de los primers así como sus modificaciones se muestran en la Tabla 6.

Primer	Secuencia
Sentido	5'- AAC CCA ATG GAT AGC CGC GAA- 3'
Sentido 6FAM	5'-/6fam/AAC CCA ATG GAT AGC CGC GAA- 3'
Anti sentido	5'- GTC CCG GAT AGT ATC CGC CTT- 3'
Anti sentido Biotinilado	5'- /biotina/GTC CCG GAT AGT ATC CGC CTT- 3'

Tabla6. Diseño de primers. Dos de los cuales están modificados el primer sentido fue marcado con 6FAM y en antisentido fue biotinilado

8.2.5- Incubación de los aptámeros con la bacteria blanco.

Para la primera ronda de selección de aptámeros se incubaron 2×10^7 células blanco (*S. pneumoniae*) con 3 nmol de aptámeros en 500 μ L de buffer de unión a 4°C por 30 min. Después las células fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. para posteriormente ser lavadas con 0.5 ml de buffer de lavado tres veces y centrifugadas a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente se extrajo el sobrenadante para conservar el pellet.

8.2.6.- Elución y purificación de aptámeros.

La elución de los aptámeros de las células blanco se realizó con 500 microlitros de agua libre de DNAsas a 95°C por 2 min. Se extrajo el sobrenadante, el cual fue directamente amplificado por PCR para formar un pool enriquecido para la siguiente ronda.

Para las siguientes rondas de selección los aptámeros fueron incubados con las células blanco utilizando 1.5 ml de buffer de unión por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se volvió a incubar con las células blanco. Los pasos de lavado y elución fueron realizados utilizando los mismos tiempos de incubación y temperatura que en la primera ronda de selección.

8.2.6.- Amplificación y purificación de aptámeros seleccionados.

Las secuencias que se unieron a los blancos fueron amplificadas por PCR, lo que originó la formación de secuencias sentido y anti sentido de los aptámeros que hayan logrado adhesión con las células blanco. Es importante evitar que el pool de selección se contamine con estas secuencias, por lo que éstas fueron eliminadas por medio del etiquetado del primer anti sentido con biotina, que se unió a la cromatografía agarosa-estreptavidina. Una vez que esto ocurrió las cadenas sencillas fueron eluidas de las columnas con .5 ml de 0.2 M NaOH, por último para la purificación de los aptámeros éstos se pasaron por una columna para desalar y la cantidad resultante fue cuantificada por espectrofotometría a 260nm.

8.2.8.- Contra selección.

Las rondas de contraselección se realizaron con las bacterias que se muestran en la Tabla 4, a diferencia de las rondas de selección posterior a la incubación del aptámero con la bacteria, serán conservados únicamente los aptámeros que no se unieron a las bacterias de contra selección. Es importante mencionar que las rondas de selección y contra selección son intercaladas para dar un total de dieciocho rondas.

8.3.- Síntesis de AuNP's.

Se calentó la disolución de 200 ml de ácido tricloroáurico al 0,01% hasta conseguir su ebullición en agitación. Se utilizó un matraz de fondo redondo de 500 ml usando una placa caliente con temperatura controlada con agitación continua. Posteriormente se añadió la solución de citrato de sodio al 1% y se continuó calentando 15 min. para permitir una reacción completa. Después se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente con agitación continua y se agregó PEG de peso molecular 3400. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 h para permitir el intercambio completo de las moléculas de citrato con PEG. La solución AuNP's-PEG se centrifugó a 10.000 rpm durante 90 min. en lotes de 10 ml. Después del centrifugado el sobrenadante se decantó conservando el sedimento de AuNP's en el fondo del tubo de centrifugación. A continuación se repitió el centrifugado para eliminar cualquier residuo de PEG no unido u otros reactivos.

IX.- RESULTADOS

9.1.- Resultados de la selección de aptámeros.

9.1.1.-Gel de agarosa de la biblioteca de aptámeros

Para nuestro primer objetivo; “Encontrar una secuencia de aptámeros que se una específicamente a la superficie de *S.pneumoniae*” se corroboró la integridad de los aptámeros por medio de un gel de agarosa al 3%. El resultado nos mostro una única banda lo cual apunta a que la biblioteca de aptámeros tiene un tamaño homogéneo. La migración de las moléculas de aptámeros inferior a 50 pb explica porque los aptameros son moléculas de ADN de una sólo cadena (Figura 10).

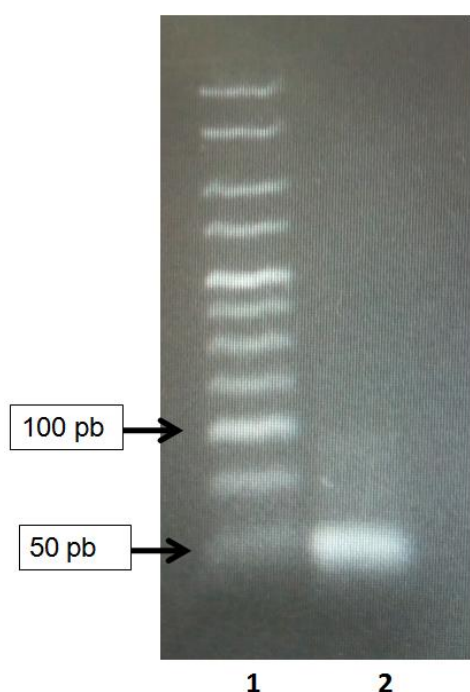


Figura 10. Biblioteca de aptámeros. Se observa un gel de agarosa al 3% de la biblioteca de aptámeros en el carril derecho, en el carril izquierdo se observa un marcador de 50pb.

9.1.2.-Gel de agarosa del primer ciclo de selección.

Para purificar las secuencias de aptámeros y obtener únicamente las que tuvieran afinidad por la bacteria blanco iniciamos los ciclos de selección bajo las condiciones mencionadas en el diseño del experimento. Se incubó la biblioteca de aptámeros con la bacteria blanco, después se realizó el protocolo de recuperación de ADN que se indica en la metodología, de éste se logró recuperar y cuantificar tanto los aptámeros que se adhirieron a la bacteria *S. pneumoniae* como los que no adheridos. Los aptámeros recuperados fueron amplificados y purificados. El resultado nos mostro que los dos tipos de aptameros fueron recuperados. La concentración inicial de aptámeros que fueron incubados con la bacteria blanco fue de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, de los cuales se pudieron recuperar 11.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aptámeros no adheridos y 5.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aptámeros adheridos a la superficie de la bacteria. Los aptámeros recuperados adheridos y no adheridos fueron resueltos en un gel de agarosa al 3%, (Figura 11).

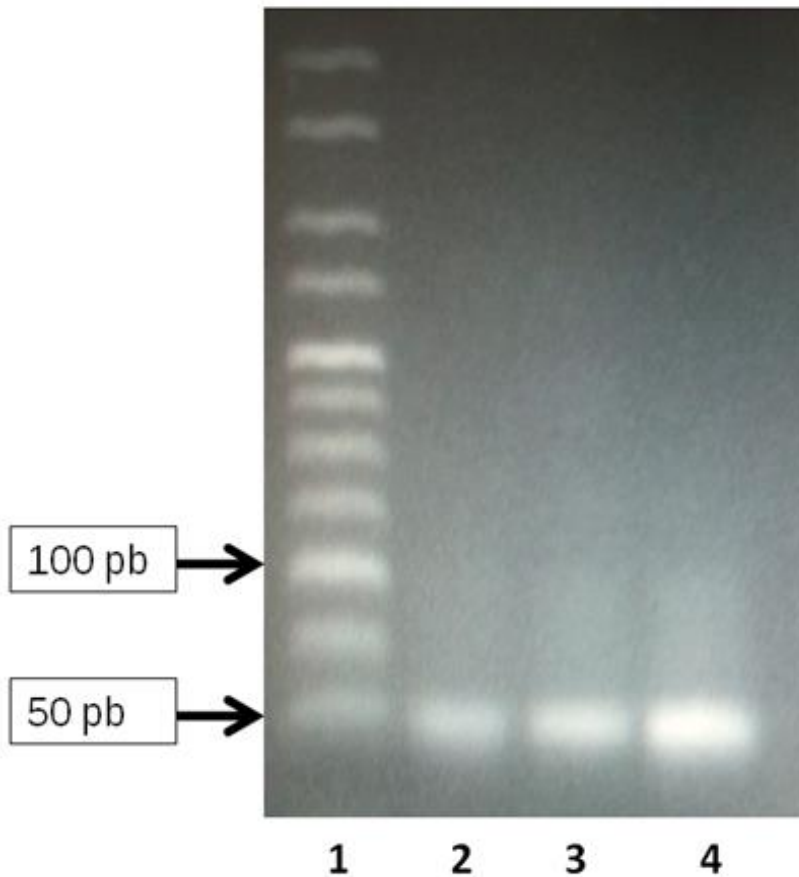


Figura 11. Primer ciclo de selección. Se observa en el primer carril del lado izquierdo un marcador de 50 pb posteriormente se observa la biblioteca de aptámeros, seguido de estos se observan los aptámeros que sí se adhirieron a la bacteria, y por último se muestran los aptámeros que no se lograron adherir a la bacteria.

9.1.3.- Cuantificación de aptámeros recuperados utilizando diferentes tiempos de incubación con la bacteria blanco.

Durante la estandarización del proceso de selección de los aptámeros y con el objetivo de purificar una secuencia de aptámeros capaz de unirse específicamente a la bacteria blanco se ensayaron diferentes tiempos de incubación de la bacteria con los aptámeros para determinar si al variar el tiempo de incubación existiría una variación en la cantidad de aptámeros adheridos a la bacteria y poder determinar el tiempo más corto de incubación para evitar la lisis de la bacteria y así no obtener mezclas de los aptámeros con el ADN bacteriano. Se realizó la incubación a diferentes tiempos y posteriormente recuperamos y cuantificamos los aptámeros que se unieron a nuestra bacteria blanco, así mismo los aptámeros que no se unieron y también el ADN genómico recuperado junto con los aptámeros adheridos. Es importante mencionar que las muestras fueron leídas por medio de espectrofotometría, los aptámeros adheridos y no adheridos fueron cuantificados a 260 nm mientras que el ADN genómico se leyó a 280 nm. Para esto utilizamos ocho diferentes tiempos de incubación y como resultado encontramos que el tiempo de incubación no parece alterar los aptámeros recuperados del proceso de selección, ya que en los diferentes tiempos se lograron obtener cantidades similares sin encontrar una diferencia significativa (tabla 7 y figura 12).

Cuantificación de aptámeros a diferentes tiempos de incubación $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			
Tiempo	No adherido	Adherido	ADN Genómico
10 min	10	5.5	0.000054
20 min	9.4	6.2	0.000066
30 min	9.8	6.2	0.000028
40 min	11.6	5.8	0.000084
50 min	11.3	5.6	0.000024
60 min	10.3	6.9	0.00002
90 min	11.2	6.4	0.000036
120 min	10.4	6.3	0.000022
Concentración inicial 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			

Tabla 7. Cuantificación de aptámeros a diferentes tiempos de incubación con la bacteria blanco, cuantificaron dos tipos de ADN; adherido y no adherido (ssDNA) y genómico (doble cadena).

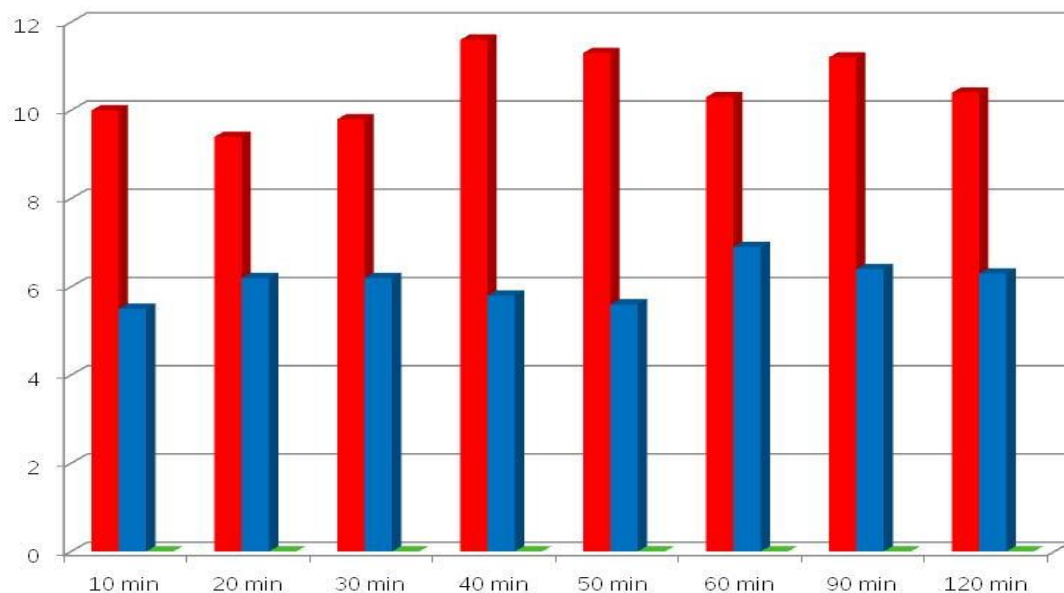


Figura 12. Gráfica de aptámeros cuantificados a diferentes tiempos de incubación. Las barras rojas representan el ADN no adherido, las barras azules representan el ADN eluido de una sola cadena, las barras verdes representan el ADN eluido de doble cadena.

9.1.4.- Cuantificación de aptámeros recuperados utilizando diferentes tiempos de elución de la bacteria blanco. aptámeros a diferentes tiempos de incubación con la bacteria blanco, cuantificaron do tipos de ADN; adherido y no adherido (ssDNA)y genómico (doble cadena).

Para optimizar las rondas de selección de los aptámeros y evitar la menor lisis celular de la bacteria blanco al momento de eluir los aptámeros que lograron la adhesión, lo que nos da como resultado un procedimiento más eficiente y rápido, decidimos analizar qué tiempo de elución era el más apropiado para evitar la pérdida de aptámeros adheridos a la bacteria y la presencia de más contaminantes. Para esto variamos los tiempos de elución y mantuvimos la temperatura constante a 95°C. Como resultado obtuvimos que no existe una diferenciassignificativa al aumentar el tiempo de elución, por lo que decidimos mantener a 2 min. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y en la Figura 13.

Cuantificación de aptámeros con 30 min de incubación a diferentes tiempos de elución alcalina $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			
	2 min	5 min	10 min
ADN eluido	4.8	5	4.7
ADN adherido	12	11.2	12.7
Concentración inicial 18 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			

Tabla 8. Variación en los tiempos de elución de los aptámeros unidos a la bacteria blanco. Se observa la cuantificación de los diferentes tiempos de elución.

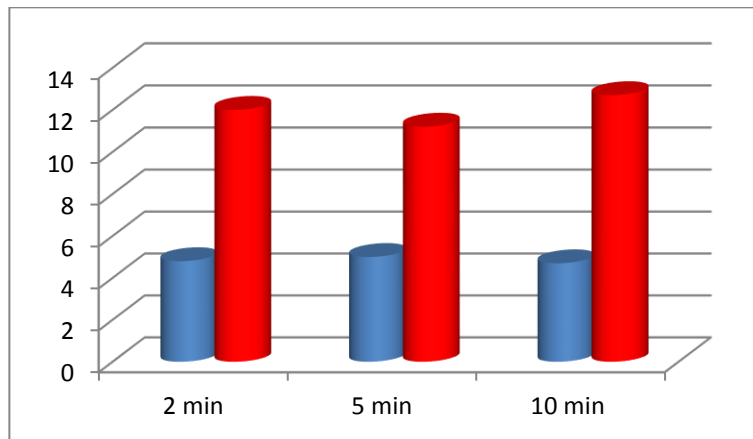


Figura 13. Gráfica de la Variación en los tiempo de elución de los aptámeros unidos a la bacteria blanco. Las barras rojas simbolizan el ADN adherido, barras azules ADN no adherido.

9.1.5.- Gel de agarosa de diferentes rondas de selección de los aptámeros.

Para terminar los ciclos de selección de aptámeros decidimos comprobar los resultados de nuestras rondas de selección mediante un gel de agarosa al 3% en el que se observan los resultados de diferentes rondas de selección. Así mismo se observa la presencia de aptámeros en todas las rondas mostradas y como característica observamos que existe una disminución gradual en el ancho de las bandas conforme avanzan los ciclos de selección, esto a pesar de que se utilizaron las mismas cantidades para todos los ciclos, lo que nos indica que aunque en cada ciclo se están amplificando los aptámeros purificados, se está disminuyendo la cantidad de los mismos. Esto también nos indicó que durante las distintas ondas de selección se obtuvo el efecto deseado al disminuir la cantidad de aptámeros seleccionados y únicamente conservamos los que mantuvieran una buena afinidad por nuestra bacteria blanco. A continuación en la Figura 14 se observan los resultados de los diferentes ciclos de selección de los aptámeros.

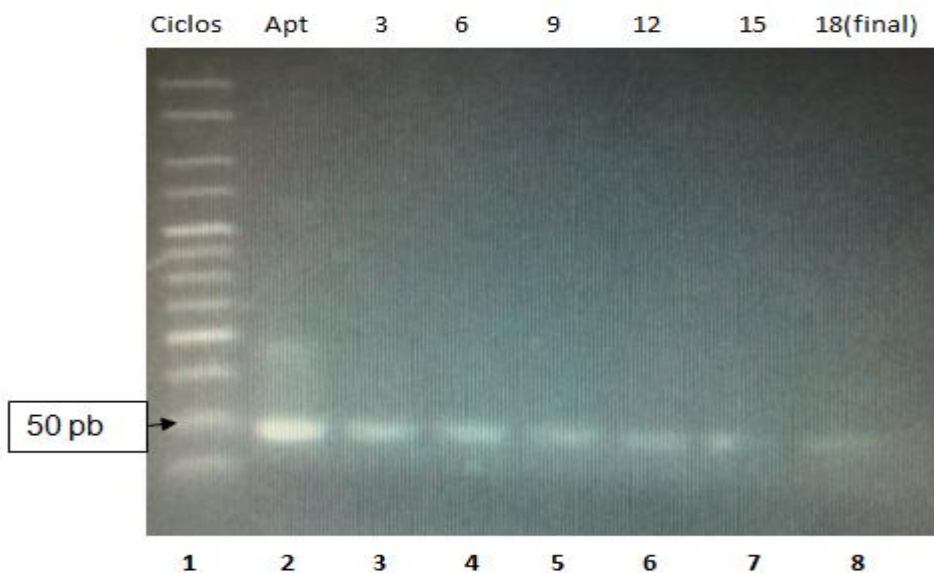


Figura14. Distintos ciclos de selección de aptámeros. Gel de agarosa al 3% en donde se muestran 6 rondas de selección del aptámero. En el primer carril se observa un marcador de 50 pares de bases, en el segundo carril se muestra la biblioteca de aptámeros y posteriormente los ciclos de purificación siendo el 18 el último.

9.2.- Prueba de la especificidad de los aptámeros seleccionados.

Una vez comprobado que se obtuvieron aptámeros durante las rondas de selección y para finalizar con nuestro primer objetivo decidimos comprobar la interacción específica del aptámero seleccionado después de todas las rondas de selección. Se utilizó también la biblioteca de aptámeros como control, la cual está marcada con 6FAM y tiene la capacidad de adherirse a cualquier bacteria; y el aptámero obtenido en el ciclo de selección nueve. Los tres distintos aptámeros fueron incubados con las bacterias blanco durante 30 min a 4 °C y a continuación se observaron las bacterias al microscopio de fluorescencia. Como control negativo utilizamos dos bacterias ajenas al proceso de selección estas fueron *Helicobacter pylori* y *Acitenobacter baumannii*.

9.2.1.- Biblioteca de aptámeros marcada con 6FAM como control.

Como control positivo decidimos utilizar nuestra biblioteca de aptámeros, esta tiene como característica la capacidad de unirse a cualquier microorganismo, como se mostro en la tabla 6. El primer forward fue modificado con 6FAM, para poder observar la interacción de los aptámeros con la bacteria por medio de microscopia de epifluorescencia. La incubación se realizó en buffer PBS 1X como se explica en la metodología y el tiempo fue de 30 min. a 4 °C. Todas las cepas bacterianas utilizadas durante el proceso de selección fueron incubadas con la biblioteca de aptámeros marcados con 6FAM. Como resultado se pudo observar que nuestra biblioteca se unió a todas nuestras bacterias, lo que nos indica la capacidad de unión que tienen los aptámeros a cualquier microorganismo. A continuación se muestran las microscopias de las diferentes bacterias marcadas con los aptámeros (Figura 15).

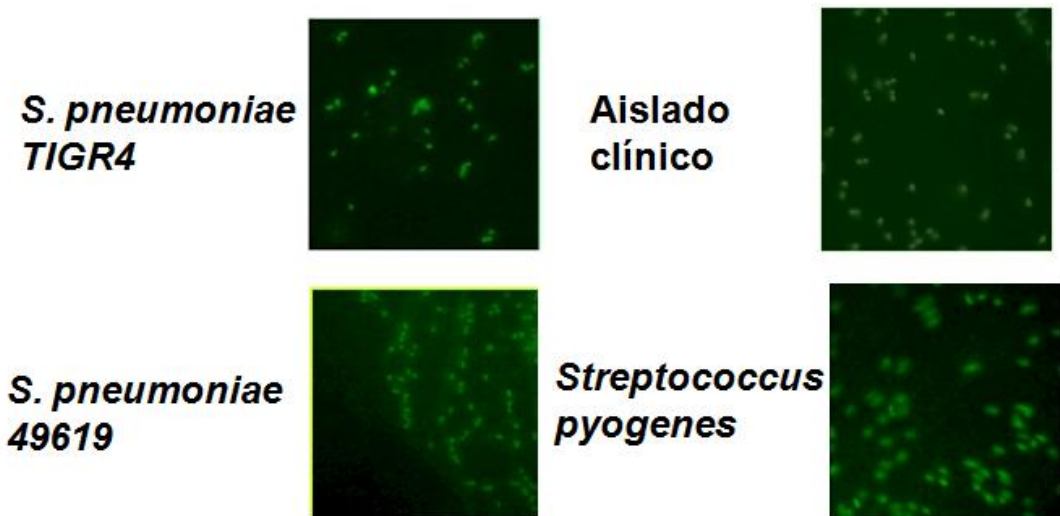
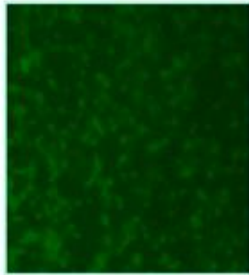
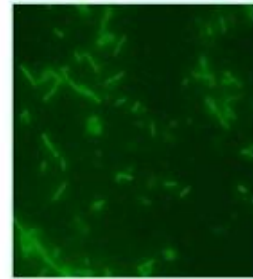


Figura 15. Continúa.

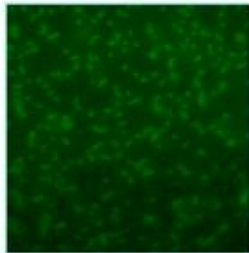
***Pseudomonas
aeruginosa***



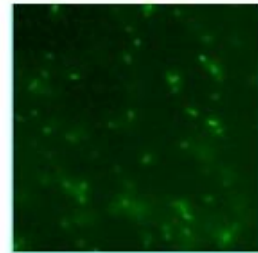
***Helicobacter
pylori***



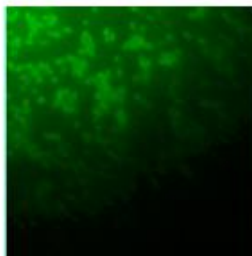
***Staphylococcus
aureus***



***Salmonella
spp.***



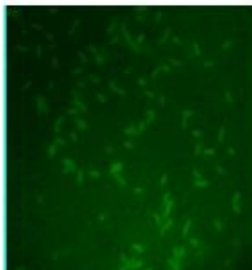
***Klebsiella
pneumoniae***



***Staphylococcus
epidermidis***



***Escherichia
coli***



***Acinetobacter
baumanii***

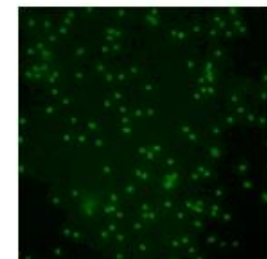
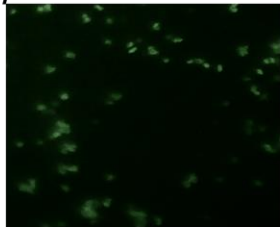


Figura 15. Microscopias de fluorescencia. Aptámeros marcados con fluoresceína se adhieren a diferentes bacterias.

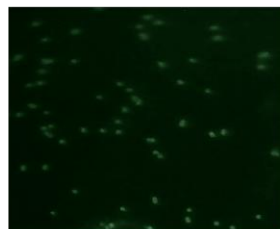
9.2.2.- Prueba de la especificidad del aptámero en el paso nueve del proceso de selección.

Después de comprobar la interacción de la biblioteca de aptámeros con las diferentes bacterias decidimos probar el aptámero resultado del ciclo nueve que es justamente la mitad del proceso de selección con la intención de conocer la capacidad de unión de los aptámeros a la mitad del experimento, éste fue probado utilizando los mismos parámetros que se utilizaron durante las microscopías anteriores, como resultado obtuvimos que el aptámero producto del ciclo de selección nueve únicamente se adhirió a la cepa *Salmonella spp.*,brindando una señal fluorescente al microscopio de menor intensidad que la observada en los controles. Es importante recordar que, como se muestra en la tabla 4, esta bacteria en el ciclo nueve aún no había pasado por el ciclo de selección. Por otra parte, aunque *K. pneumoniae* y *E. epidermidis* tampoco habían pasado por ningún ciclo de selección los aptámeros no mostraron la capacidad de unirse a estas dos bacterias, además también constatamos que aunque las otras dos diferentes cepas de *S. pneumoniae* tampoco habían pasado por ningún ciclo de selección los aptámeros lograron adherirse a las diferentes cepas de esta bacteria. Este resultado nos muestra la capacidad del proceso de selección de los aptámeros para purificar y generar secuencias que van aumentando su especificidad gradualmente a medida que avanzan los ciclos de selección. A continuación se observan las microscopías de estas interacciones, las microscopías en las que no se logró adhesión de la bacteria con los aptámeros, se tomó la microscopía en campo claro (Figura16).

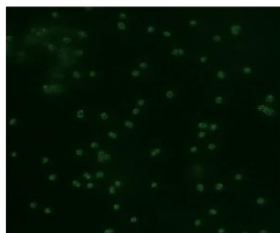
S. pneumoniae TIGR4



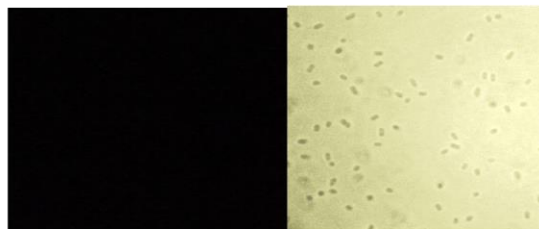
S. pneumoniae 49619



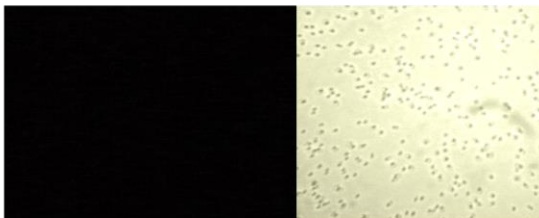
Aislado clínico



Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



Staphylococcus epidermidis

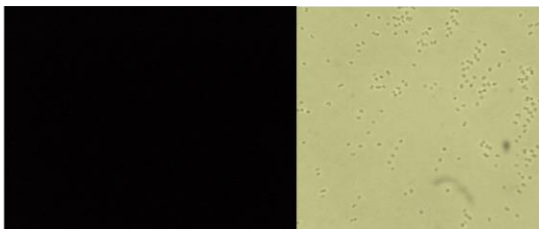


Figura 16. Continúa

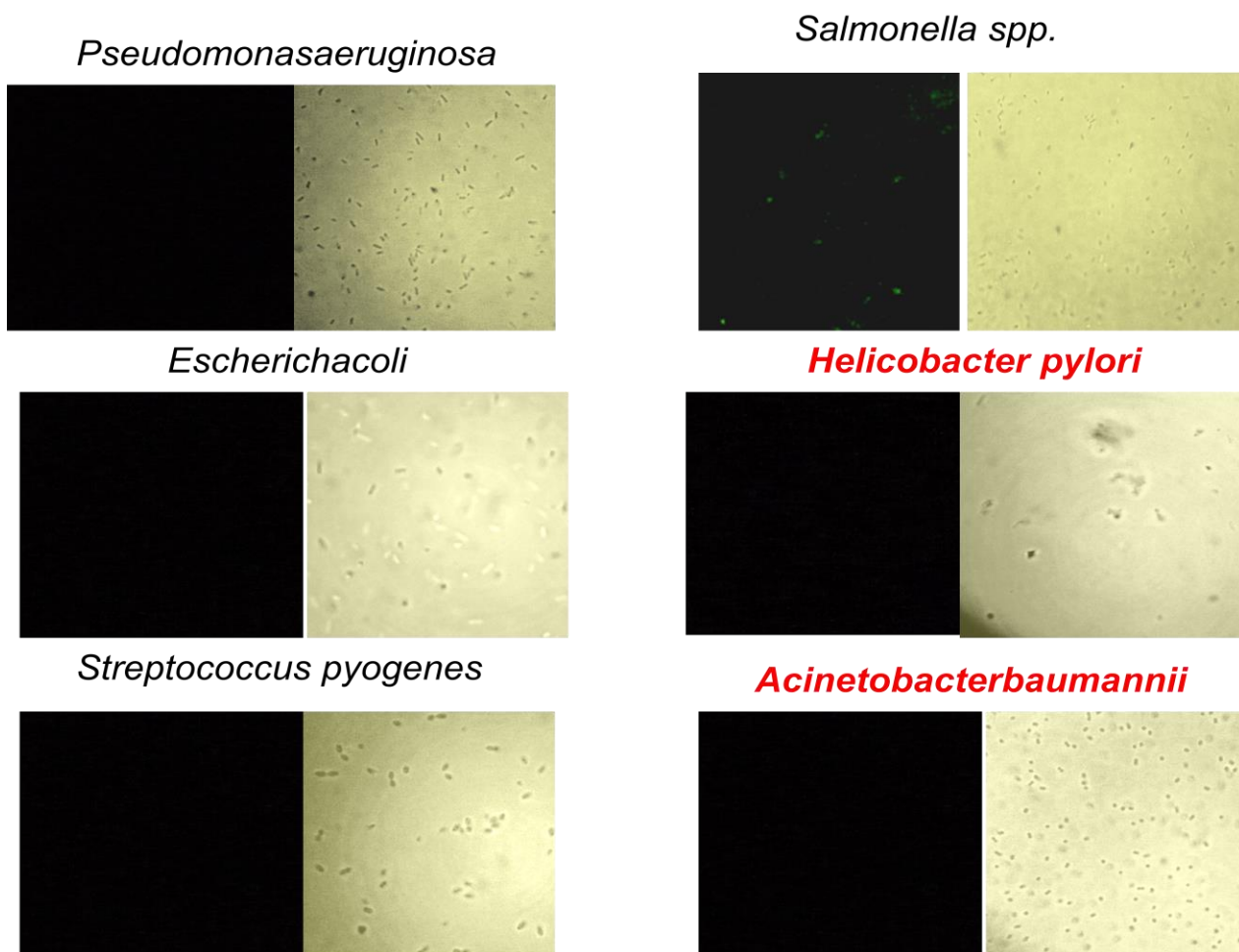
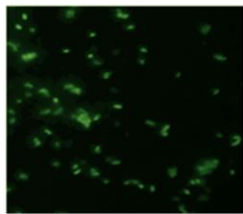


Figura 16. Microscopías de epifluorescencia. Aptámeros marcados con fluoresceína se adhieren a algunas bacterias durante en ciclo nueve del proceso de selección de aptámeros.

9.2.3.- Prueba de la especificidad del aptámero final.

Para comprobar la interacción específica de los aptámeros finales seleccionados con la bacteria blanco se realizó el mismo procedimiento, pero en esta ocasión utilizando el aptámero final que al igual que los dos anteriores éste fue marcado con 6FAM y puesto a interaccionar bajo las mismas condiciones. A continuación se muestran los resultados (Figura17).

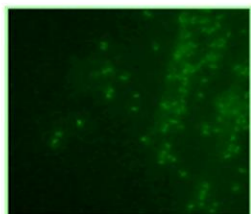
S. pneumoniae TIGR4



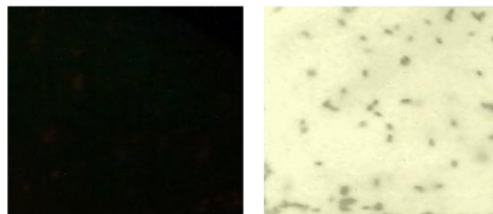
Staphylococcus epidermidis



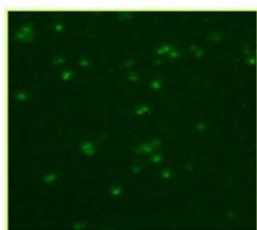
S. pneumoniae 49619



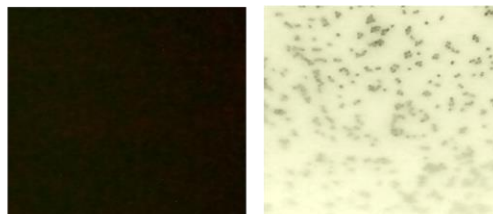
Pseudomonas aeruginosa



Aislado clínico



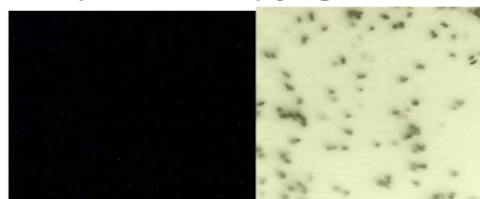
Staphylococcus aureus



Klebsiella pneumoniae



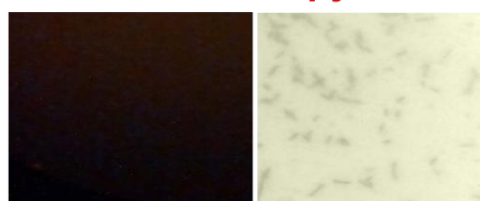
Streptococcus pyogenes



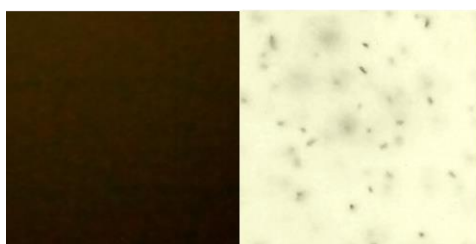
Escherichacoli



Helicobacter pylori



Salmonella spp.



Acinetobacterbaumannii



Figura 17. Microscopias de epifluorescencia. Aptámeros marcados con fluoresceína se adhieren específicamente a *S. pneumoniae*.

9.2.4.- Resultados observados.

Microorganismo	Control	Ciclo 9	Aptámero final
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	✓	✓	✓
<i>S. pneumoniae</i> 49619	✓	✓	✓
<i>S. pneumoniae</i> aislado clínico	✓	✓	✓
<i>Salmonella</i> spp.	✓	✓	✗
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓	✗	✗
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✗	✗
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✗	✗
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	✓	✗	✗
<i>Escherichia coli</i>	✓	✗	✗
<i>Streptococcus pyogenes</i>	✓	✗	✗
<i>Helicobacter pylori</i>	✓	✗	✗
<i>Acinetobacter baumannii</i>	✓	✗	✗

Tabla 9. Resultados observados. Se marca con una paloma en color verde las bacterias a las que se adhirió el aptámero en sus diferentes ciclos, desde el control que es la biblioteca de aptámeros pasando por el ciclo 9 y por último el ciclo 18 con el aptámero final.

9.2.5.- Conclusiones sobre la especificidad de los aptámeros seleccionados.

De los resultados anteriores podemos concluir que al aptámero final únicamente se adhirió a la bacteria blanco y que como observamos en el aptámero resultado del ciclo nuevo vanderminuyendo gradualmente los aptámeros capaces de adherirse a otras bacterias y se seleccionan los que únicamente se adhieren a nuestro blanco. Es importante destacar que las bacterias utilizadas como control negativo *H. pylori* y *A. baumannii* no se unieron a los aptámeros finales, por lo que constatamos que estos aptámeros tienen la especificidad requerida para nuestro bio receptor bacteriano (Tabla 9).

9.3.- Acoplamiento de AuNP's-aptámeros a la *S. pneumoniae*.

Una vez obtenido un aptámero específico para nuestra bacteria blanco, hemos decidido utilizar nanopartículas de oro para conjugarlas a los aptámeros, ya que son fáciles de sintetizar y son estables. Para esta parte de nuestra investigación fue necesario presentar el antecedente que nos dice que la funcionalización altera las propiedades de absorción de AuNP's debido a: la

interacción entre el campo de los ligandos y la nube de electrones de superficie, ocasionando un desplazamiento de su espectro de absorción.⁵³ Teniendo este antecedente en cuenta utilizamos como base una AuNP's simple, la cual nos generó un espectro de absorbancia con un pico más alto en 520 nm, el cual se muestra en la Figura 18.

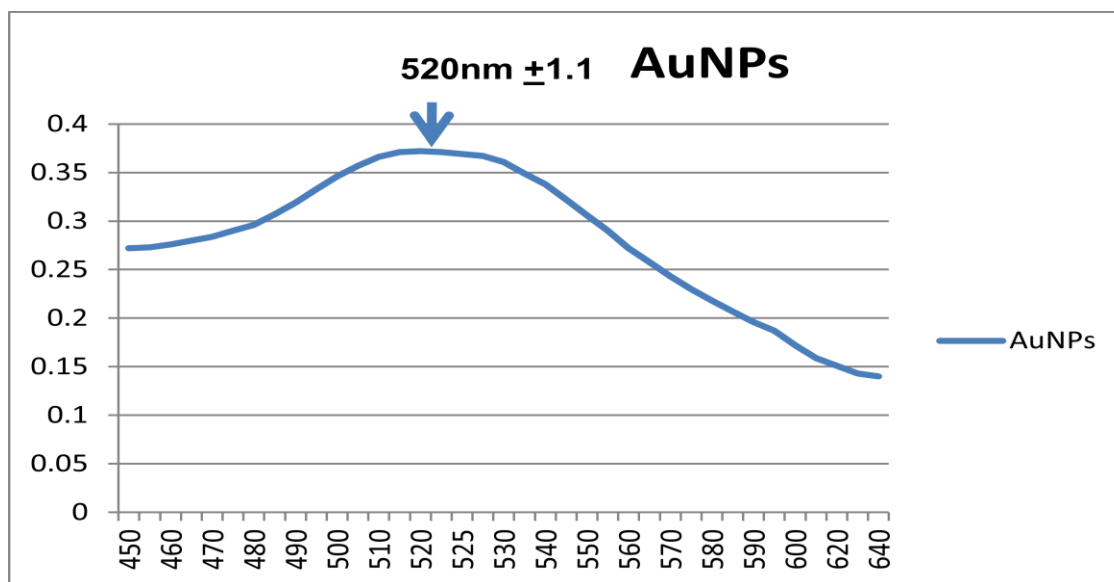


Figura 18. Espectro de absorbancia de AuNP's.

Posteriormente se sintetizaron AuNP's, pero esta vez fueron recubiertas con PEG tiolado y carboxilado. Dichas nanopartículas generaron un espectro de absorbancia desplazado. Como era de esperarse sí había una correcta funcionalización de nuestras nanopartículas(Figura 19).

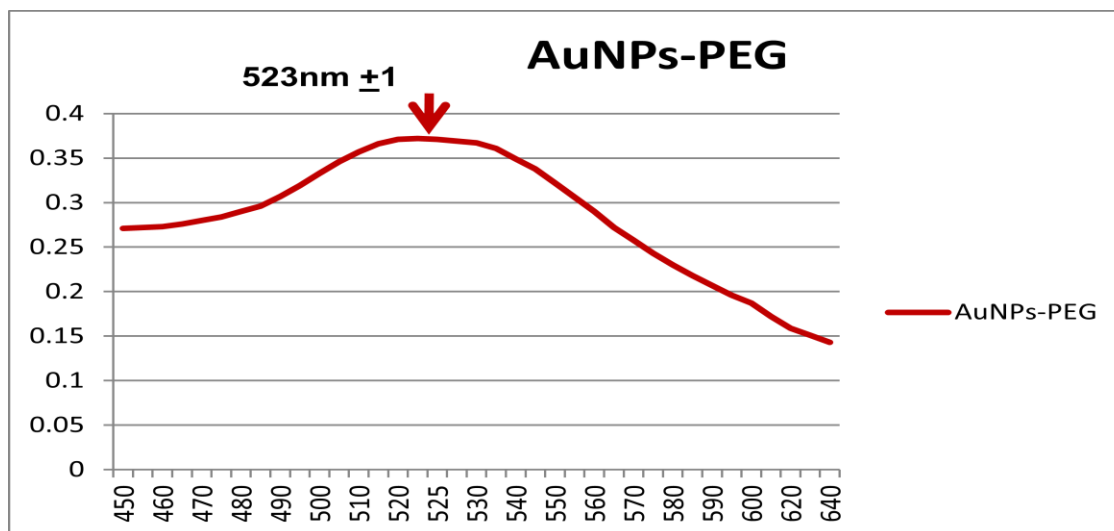


Figura 19. Espectro de absorbancia de AuNP's-PEG.

Para finalizar, nuestra nanopartícula pegilada fue funcionalizada utilizando los aptámeros finales, la funcionalización se realizó por medio de NaOH y posteriormente también se obtuvo el espectro de absorbancia de dichas nanopartículas(Figura 20).

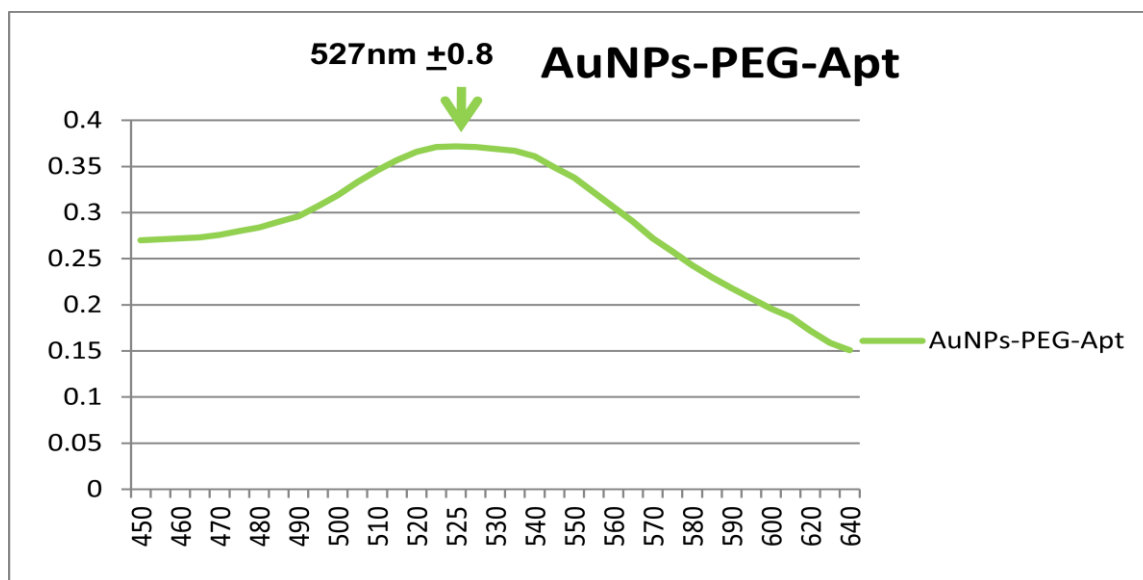


Figura 20. Espectro de absorbancia de AuNP's-PEG-Apt.

Para observar de forma clara el desplazamiento del espectro de absorbancia a medida que se funcionalizaban las nanopartículas hicimos un empalme de los tres gráficos anteriores en donde se muestra el efecto del desplazamiento de manera más clara (Figura 21).

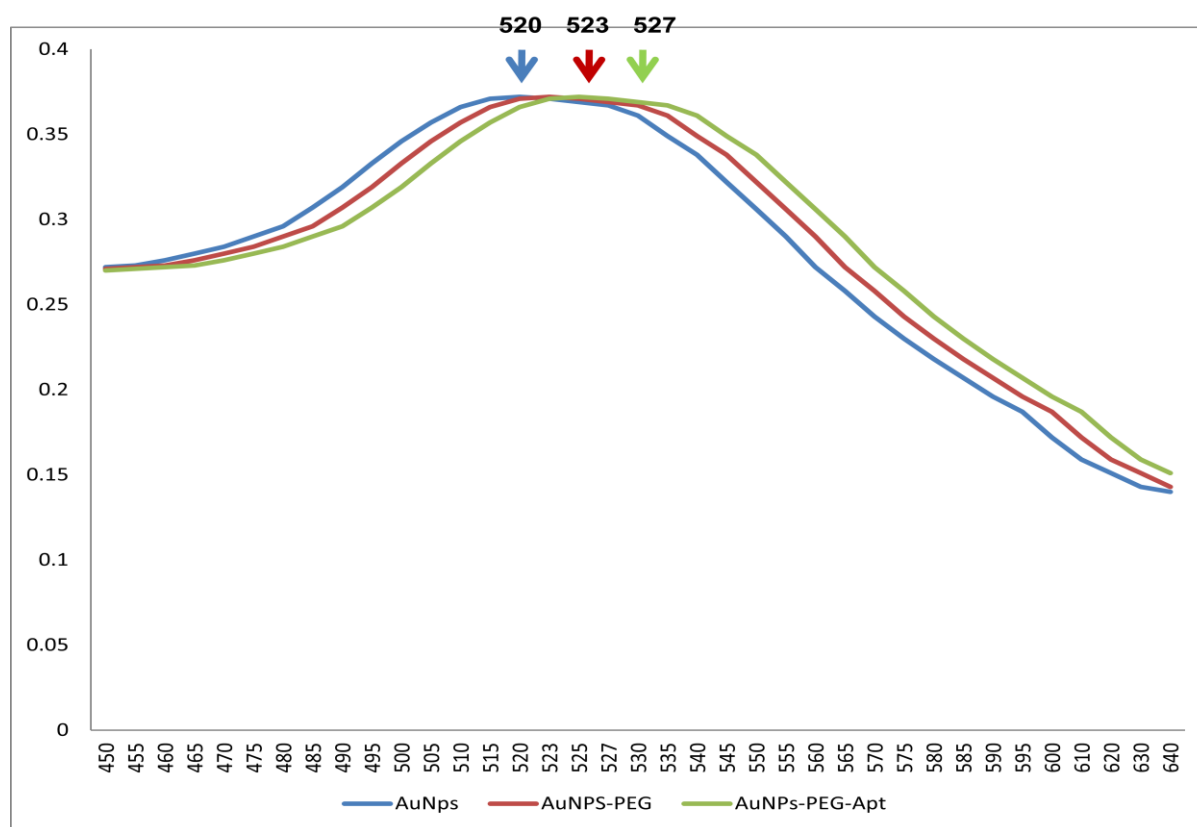


Figura 21. Desplazamiento del espectro de absorbancia.

En la gráfica de la Figura 21 se observan los puntos más altos de cada espectro y se puede apreciar un desplazamiento en la longitud de onda de cada nanopartícula a medida que su superficie es modificada. Al funcionalizar las nanopartículas con los aptámeros cuantificamos la cantidad de aptámeros antes de la unión con la nanopartícula y posterior a la unión con la nanopartícula, de esto la cuantificación inicial fue de 10ng/μl. Al final del procedimiento las nanopartículas fueron centrifugadas y se cuantificó el ssADN que permaneció en el sobrenadante obteniendo 7.3 ng/μl. De este resultado podemos concluir por el desplazamiento de la curva del espectro y por el ssDNA cuantificado antes y después de la adhesión que se está uniendo un 27% de aptámero a la nanopartícula.

Además de esto podemos concluir que la nanopartícula está caracterizada con los aptámeros finales, dado el desplazamiento del espectro de absorbancia el resultado de esta parte de nuestra investigación es satisfactorio y de esta forma damos como concluido nuestro segundo objetivo que es realizar el bio conjugado aptámeros-nanopartículas.

9.3.- Unión de AuNP's-aptámeros a la *S. pneumoniae*.

9.3.1.- Interacción de la AuNps-biblioteca de aptámeros a la *S. pneumoniae* como control.

Para comprobar la interacción de la nanopartícula Au-PEG-aptámero con nuestras bacterias blanco, nuestro tercer objetivo, inicialmente decidimos tomar como control un conjugado de las nanopartículas Au-PEG-aptámeros utilizando la biblioteca inicial de aptámeros que tiene la capacidad de unirse a cualquier microorganismo, estos aptámeros están marcados con 6FAM. Además de esto también marcamos las bacterias utilizando DAPI como control, 5 μl de bacterias a una densidad óptica de 0.1 fueron incubados durante 30 min. a 4°C con 5 μl de NP's Au-PEG-aptámero a una concentración de 10 μg/μl en buffer PBS 1X. Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas a 1500 g por 5 min, esto es para eliminar las nanopartículas que no se unieron a las bacterias para después lavarlas 3 veces con buffer PBS 1X, centrifugarlas y resuspenderlas, después de resuspenderlas las muestras fueron observadas por medio de un microscopio de fluorescencia Leica 2000 utilizando primero el campo claro, después el filtro azul (emisión 461nm) y por último el filtro verde (emisión 519nm). A continuación se muestran los resultados (Figura 22).

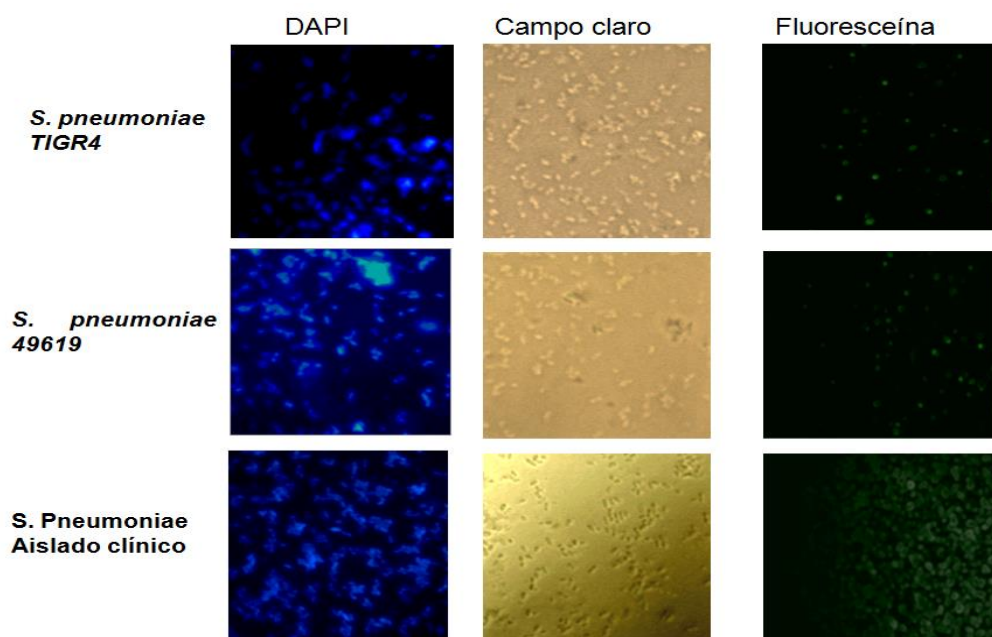


Figura 22. Continúa

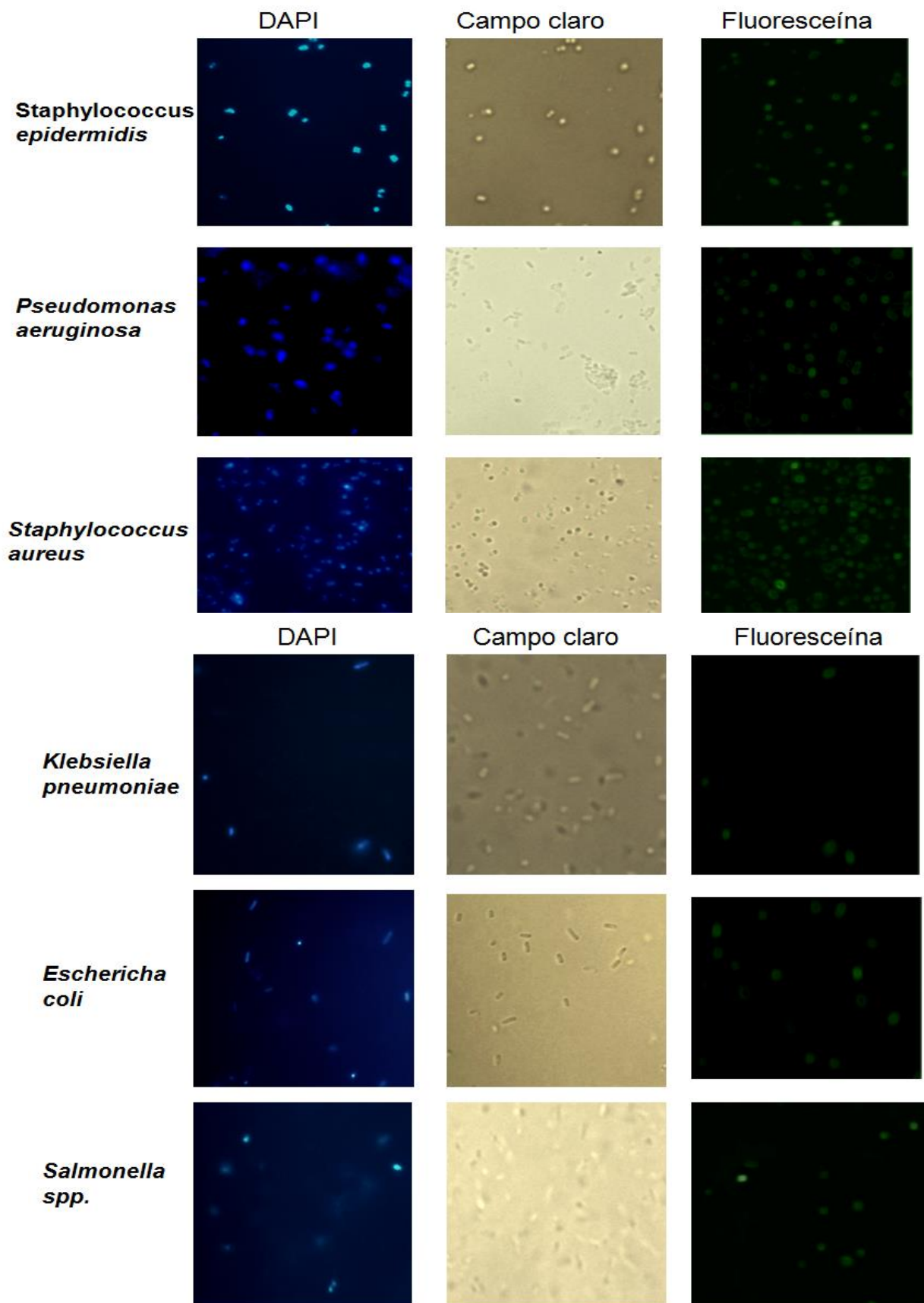


Figura 22. Continúa

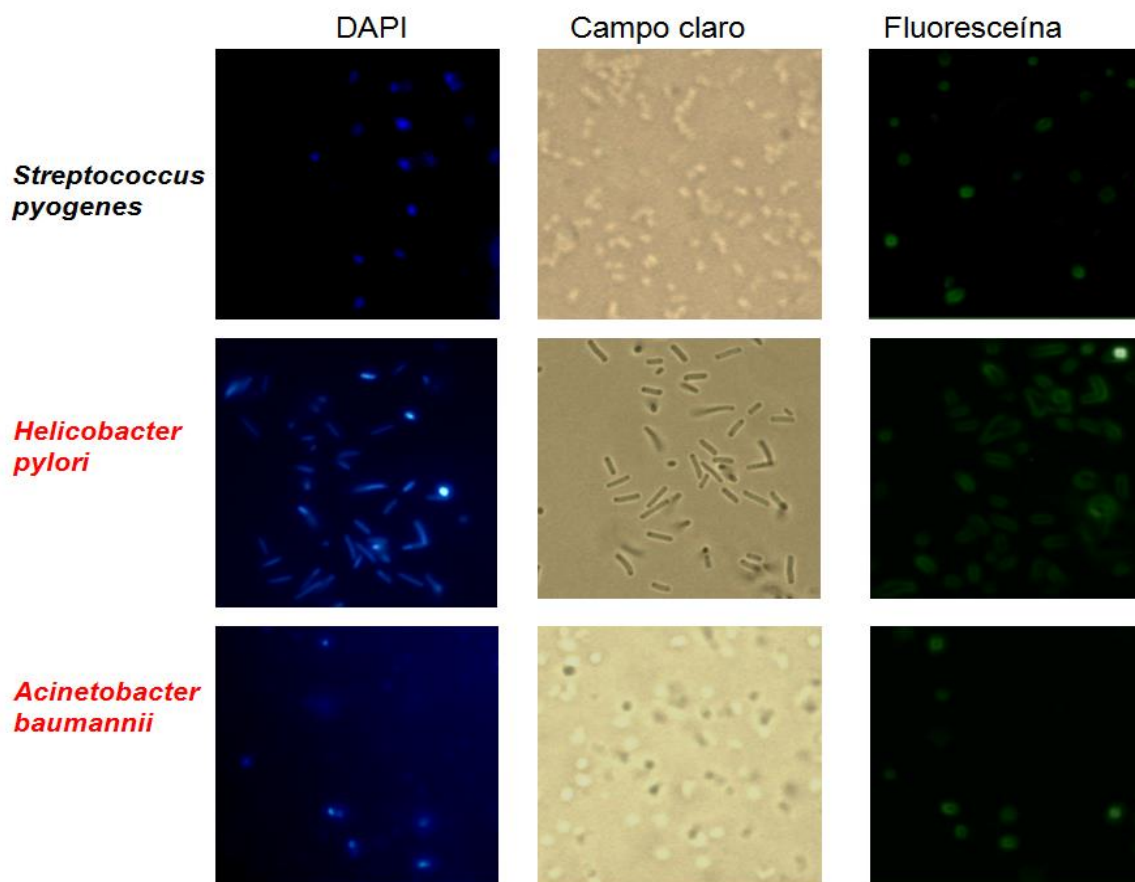


Figura 22. Microscopías de epifluorescencia biblioteca de aptámeros conjugada con AuNP's. Se muestra la biblioteca de aptámeros conjugada con AuNP's en interacción con las diferentes bacterias utilizadas para la selección, en la columna izquierda se observan las bacterias teñidas con DAPI, en la columna central se observa una microscopia en campo claro, mientras que en la columna de la derechas se muestra las apt-AuNP's marcadas con fluoresceína en la superficie bacteriana.

9.3.2.- Interacción específica de la AuNP's-aptámeros seleccionados a la *S. pneumoniae*.

Para comprobar la interacción de la nanopartícula Au-PEG-aptámero esta vez para el acoplamiento de la NP's-aptámero utilizamos los aptámeros seleccionados después de los 18 ciclos de selección, éstos fueron amplificados y purificados y la incubación de la nanopartícula con la bacteria se realizó con las mismas condiciones que se mencionan para las microscopías anteriores. A continuación se muestran los resultados (Figura 23).

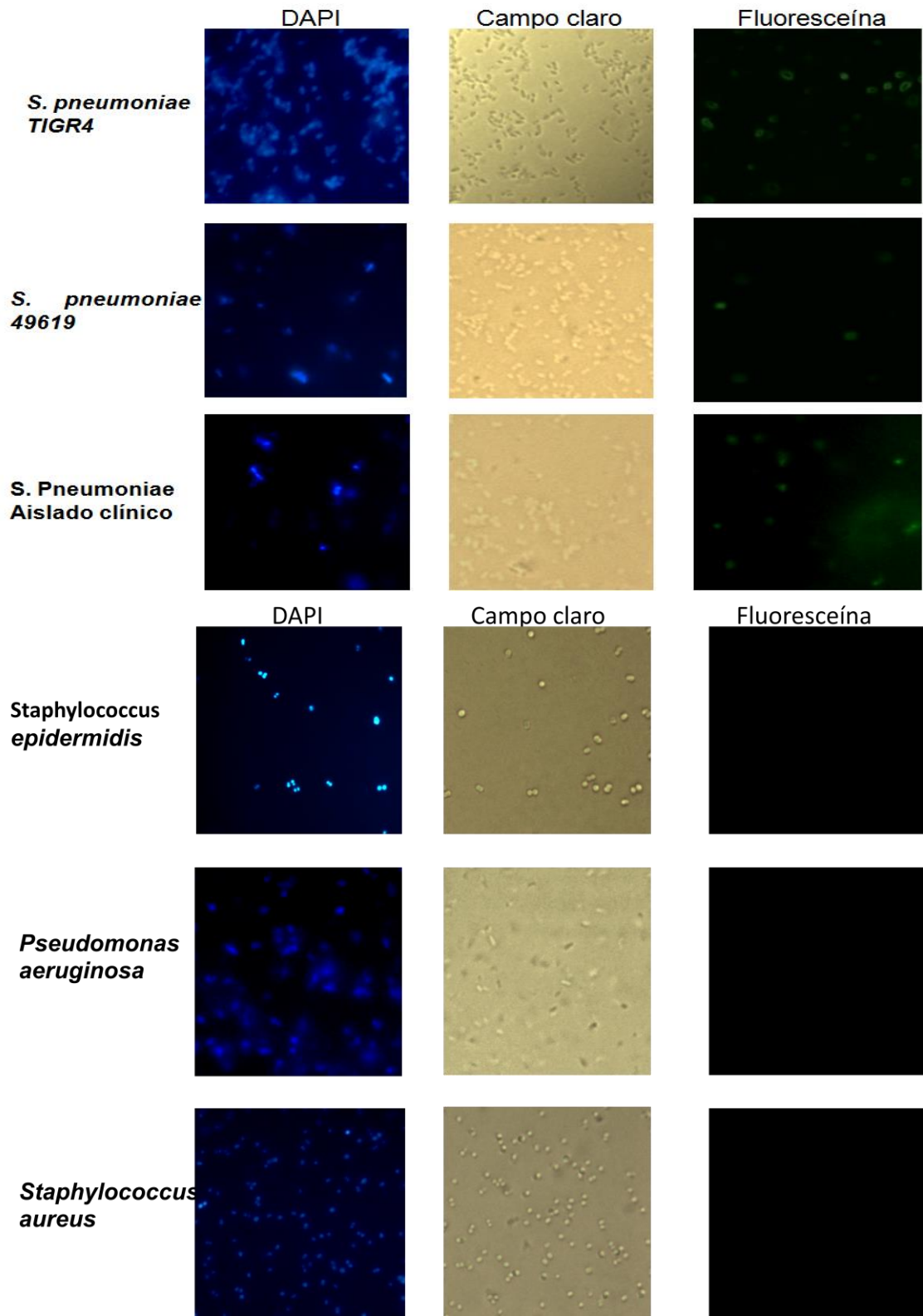


Figura 23. Continúa

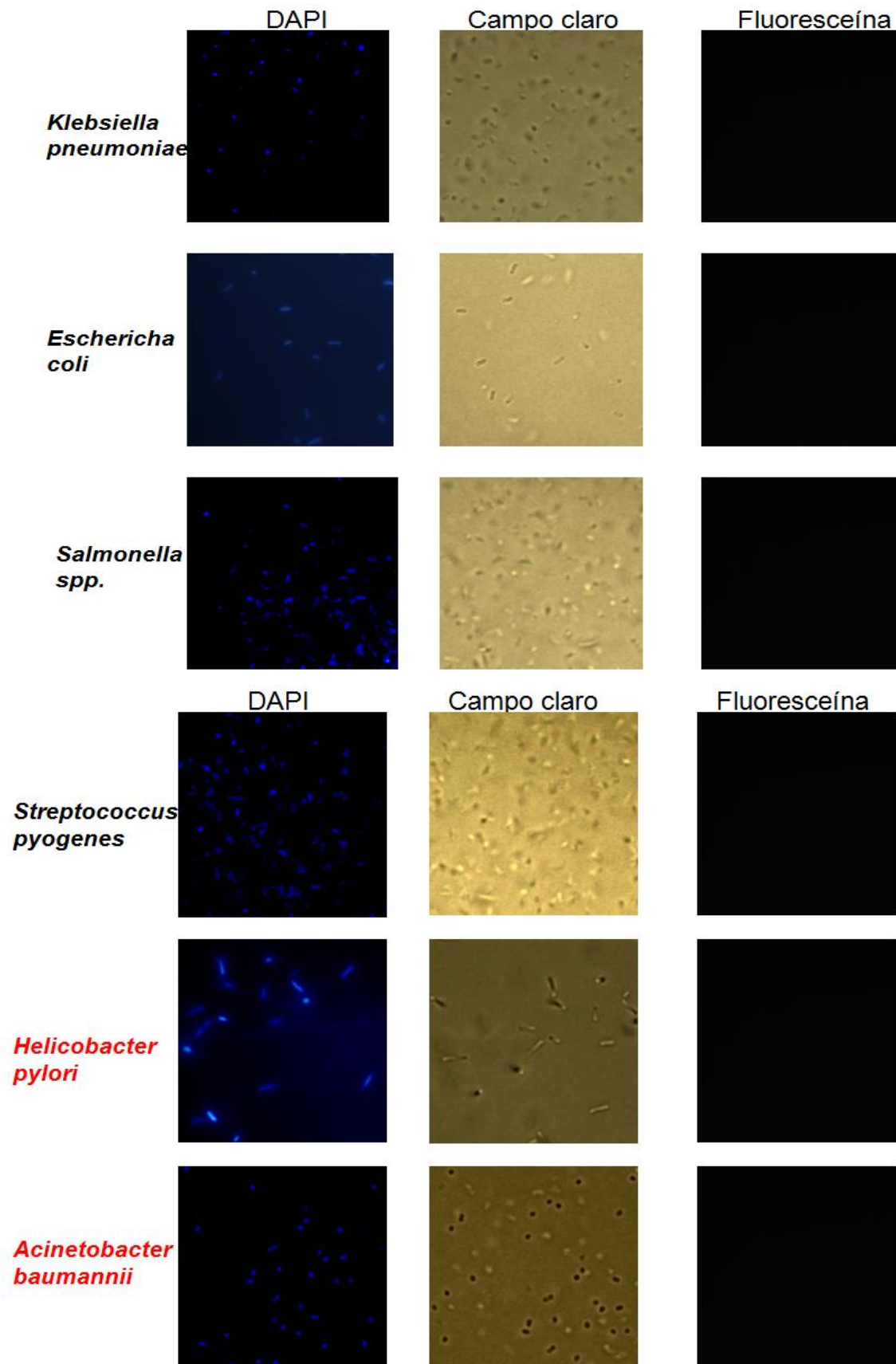


Figura 23. Microscopias de epifluorescencia del aptámero final conjugado con AuNP's. Se la interacción de la nanopartícula con las diferentes bacterias utilizadas para su selección, en la columna izquierda se observan las bacterias teñidas con DAPI, en la columna central se observa una microscopia en campo claro, mientras que en la columna de la derechas se muestra las apt-AuNP's marcadas con fluoresceína en la superficie bacteriana.

9.3.3.- Resumen de resultados observados.

Resultados observados

Microorganismo	Control	Aptámero final
<i>S. pneumoniae TIGR4</i>	✓	✓
<i>S. pneumoniae 49619</i>	✓	✓
<i>S. pneumoniae aislado clínico</i>	✓	✓
<i>Salmonella spp.</i>	✓	✗
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	✓	✗
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	✓	✗
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	✗
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	✓	✗
<i>Escherichia coli</i>	✓	✗
<i>Streptococcus pyogenes</i>	✓	✗
<i>Helicobacter pylori</i>	✓	✗
<i>Acinetobacter baumannii</i>	✓	✗

Tabla 10. Resumen de resultados observados. Las bacterias marcadas en rojo son las que no estuvieron en interacción con los aptámeros durante el proceso de selección.

En la Tabla 10 podemos observar los resultados de esta parte de la investigación. La capacidad selectiva de las nanopartículas conjugadas con los aptámeros, de una manera más clara observamos que nuestra nanopartícula a diferencia de los controles únicamente se unió a las bacterias blanco.

9.4.- Prueba de la AuNP's-aptámeros adherida a la bacteria a diferentes tiempos de incubación.

Una vez que comprobamos que nuestra nanopartícula era capaz de unirse únicamente a nuestras bacterias blanco decidimos probarla a diferentes tiempos de incubación utilizando 5, 15, 30 min, ya que consideramos que los métodos de

diagnóstico de *S. pneumoniae* son tardados y la intención de esta investigación es acortar ese tiempo de diagnóstico. De esta variación en los tiempos de incubación pudimos observar que se podían encontrar algunas bacterias marcadas desde los 5 min. y que la cantidad de bacterias marcadas aumentaban gradualmente en los tres tiempos analizados (Figura 24).

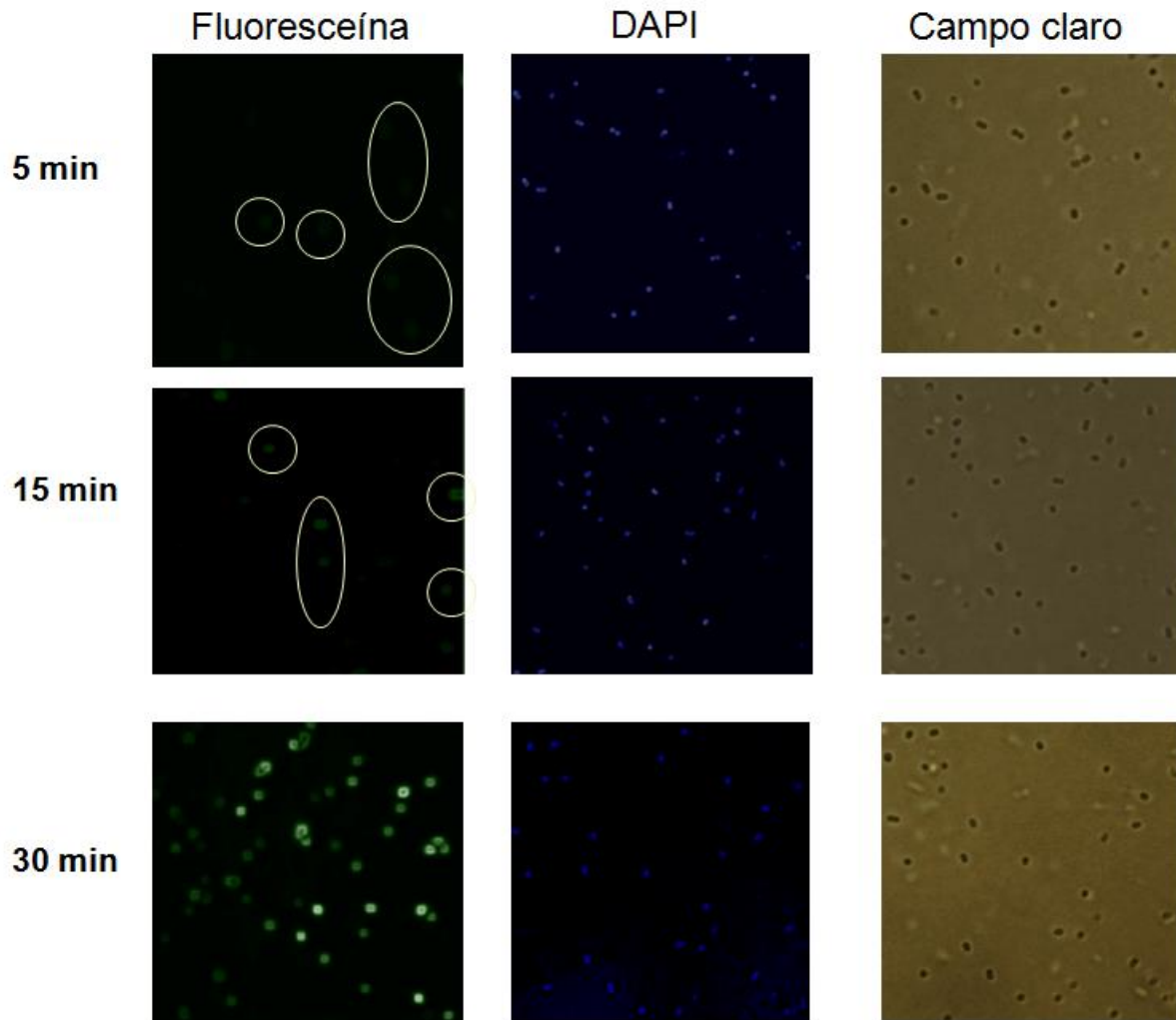


Figura 24. Microscopias de epifluorescencia aptámero final conjugado con AuNP's en distintos tiempos de interacción con la bacteria blanco. Se observa el conjugado apt-AuNP's en interacción con las bacterias blanco, en este experimento únicamente varia el tiempo de incubación de las apt-AuNP's en la columna izquierda se observan estas en interacción con su blanco, en la columna central se observan las bacterias teñidas con DAPI, mientras que en la columna de la derechas se muestra la microscopia en campo claro.

X. DISCUSIÓN.

Los métodos confiables para la detección rápida y selectiva de patógenos son fundamentales para garantizar la higiene de los alimentos que consumimos para diagnosticar las enfermedades bacterianas infecciosas con precisión y rapidez, especialmente en el diagnóstico clínico. Es deseable la detección de hasta una sola célula, ya que incluso una concentración muy baja de las bacterias puede conducir a la enfermedad. La necesidad de generar bio sensores más específicos, confiables y sensibles para los patógenos ha promovido la investigación sobre el potencial de las nanopartículas y su utilización en sistemas de biosensado. Algunas nanopartículas con propiedades ópticas, electroquímicas o magnéticas particulares pueden aumentar la velocidad y la detectabilidad de los métodos de diagnóstico. Además, la posibilidad de utilizarlos en una variedad de configuraciones distintas nos permite considerar su implementación como sistemas fundamentales para una nueva generación de dispositivos con novedosas características.

Por lo tanto, los nano materiales en la época actual han surgido como importantes componentes de diferentes dispositivos bio analíticos, ya que han demostrado una gran capacidad de detección. También en su mayoría resultan ser fáciles de sintetizar como las AuNP's, además de ser estables en el medio ambiente. Por estas características cada vez más investigadores han decidido direccionar sus campos de investigación hacia la nanotecnología, las propiedades específicas de los distintos nano materiales ofrecen distintas alternativas a los métodos clásicos de biosensado, también la combinación de diferentes nano materiales con diferentes características han incrementado la capacidad de acción de los nuevos conjugados para biosensores generando una amplia gama de métodos con buenas características para ser utilizados en el campo de los diagnósticos, aunado a esto algunos autores(27) predicen que el campo en desarrollo de los aptasensores dominará el mercado de los biosensores en poco tiempo, especializándose en el campo del diagnóstico biomédico y la atención clínica, lo que nos orilla como investigadores al desarrollo, investigación y comprensión de cada vez más sofisticados métodos de detección, a tal grado que podamos constatar un evento de unión molecular, lo que implicaría la generación de sensores de alto rendimiento capaces de detectar múltiples analitos en paralelo. Los aptasensores desempeñarán papeles cada vez más importantes en la farmacogenómica, el diagnóstico, el antidopaje, la ciencia forense y la bioseguridad. Conociendo estos antecedentes nos hemos dado a la tarea de implementar una nanopartícula con la capacidad de reconocer específicamente a *S. pneumoniae* como un bio receptor capaz de ser acoplado a un elemento transductor y así lograr un bio sensor de este patógeno. Es importante resaltar que a través de esta investigación hemos conjugado el desarrollo de nanotecnología con la implementación de aptasensores, para esto el primer paso en el desarrollo de nuestro bio receptor fue el de la selección de los aptámeros específicos contra *S. pneumoniae*, la especificidad de éstos la pudimos comprobar mediante microscopías de epifluorescencia en las que nuestros aptámeros seleccionados estaban marcados con fluoresceína y al

interaccionarlos con diferentes bacterias observamos que únicamente se unieron a la bacteria blanco. Una vez comprobada la interacción específica de nuestros aptámeros procedimos al desarrollo de una nanopartícula de oro, este tipo de nanopartícula fue elegida dada la estabilidad, su capacidad electroquímica y su facilidad para ser sintetizada, la manera en la que pudimos conjugar nuestra nanopartícula con los aptámeros fue mediante un recubrimiento de PEG tiolado que posteriormente fue tratado con NaOH para que pudiera darse la unión entre la nanopartícula y los aptámeros, la modificación de la superficie de la nanopartícula fue comprobada mediante el análisis de la curva de espectrofotometría en el que pudimos constatar que cuando realizábamos una modificación a nuestra nanopartícula ésta era desplazada, lo que nos indicó que realmente existía una modificación en ellas.

La última parte de nuestra investigación consistió en comprobar que la interacción de la nanopartícula acoplada con los aptámeros seleccionados fuera específica para *S. pneumoniae*. Para esto utilizamos dos fluorescencias, la primera fue la fluoresceína verde que se encontraba marcando los aptámeros que a su vez estaban recubriendo la superficie de las AuNP's, la segunda fluorescencia fue el DAPI, éste tiene como característica la capacidad de unirse a regiones enriquecida de adenina y timina en el genoma bacteriano, lo que nos da como resultado el marcado de la bacteria con un contraste azul, al hacer la interacción de la AuNP's-apt comprobamos que únicamente marcó a la bacteria blanco, lo que indica la especificidad de nuestro sistema para unirse a *S. pneumoniae*. A su vez también pudimos observar que esta tecnología es funcional como método diagnóstico, aunque podemos decir que para la utilización de este sistema como un bio sensor es necesario el desarrollo del elemento transductor, además de la comprobación de su correcto funcionamiento y aunque aun consideramos que esta investigación está en un punto básico de su desarrollo, pudimos completar los objetivos de nuestra investigación.

XI. CONCLUSIONES

Para hacer nuestras conclusiones más claras las hemos dividido en tres partes acordes a cada uno de nuestros objetivos;

Objetivo 1. "Seleccionar secuencias de aptámeros que se unan específicamente a la superficie de *S.pneumoniae*". Como resultado de las primeras microscopias (Figura 15) del aptámero seleccionado, podemos concluir que se logró adherir únicamente a las bacterias blanco mientras que no se adhirió a ninguna de las bacterias utilizadas para la contra selección, tampoco se adhirió a las dos bacterias que no fueron utilizadas durante el proceso de selección que fueron *H. pylori* y *A. baumannii*, esto nos indica la capacidad del proceso de selección de los aptámeros para purificar secuencias específicas de unión a un blanco deseado.

Objetivo 2. "Lograr la adhesión de aptámeros a la superficie de las nanopartículas de oro". Una vez seleccionados los aptámeros y comprobada su especificidad

realizamos la síntesis de la nanopartícula pegilada la cual al mantenerla en agitación en medio con (hidróxido de sodio) NaHO, los aptámeros lograron adherirse a la superficie de la nanopartícula, esto pudo ser comprobado por medio del desplazamiento de los tres diferentes espectros de absorbancia (Figura 21) y también por la cuantificación anterior y posterior a la agitación.

Objetivo 3. “Comprobar la interacción entre *S. pneumoniae* y las nanopartículas de oro conjugadas con los aptámeros”. Posteriormente, pudimos observar que el conjugado de AuNP's-PEG-aptámeros logró adherirse únicamente a las bacterias blanco (Figura 23), además después del análisis de los tiempos de incubación del conjugado con la bacteria pudimos observar que desde los primeros 5 minutos de interacción nuestra nanopartícula comenzó a marcar algunas bacterias blanco (Figura 24).

Como conclusión, observamos que el conjugado AuNP's-PEG-aptámero logró adherirse específicamente a las bacterias blanco, lo que le da una excelente capacidad de funcionar como un bio receptor, además al utilizar nuestro bio receptor acortaría bastante el tiempo de diagnóstico de *S. pneumoniae*, ya que pudimos constatar que nuestra nanopartícula fue capaz de lograr el reconocimiento de su blanco desde los primeros cinco minutos, esto demuestra que nuestro sistema es capaz de lograr un buen reconocimiento de la *S. pneumoniae*.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Mensa J, Gatell JM, Jiménez de Anta M, Prats G, Domínguez-Gil A. Guía de terapéutica antimicrobiana. 11.^a ed. Barcelona: Masson, 2001.
2. Instituto Nacional de Salud Colombia. Programa de Vigilancia de los serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual de procedimientos. 2004. Versión 4.33-99.
3. Trigo C. Bacteriología Básica. Ed. huellas SRL. 1998.
4. Suzuki N, Yuyama M, Maeda S, et al. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for *S. pneumoniae*. J. Med. Microbiol. 2006. 55: 709-714.
5. Tarja K, Identification of *Streptococcus pneumoniae*. Publications of the National Public Health Institute. A. 2006. 76 pages
6. Llull D, Lopez, R and Garcia E. Characteristic Signatures of the *lytA* Gene Provide a Basis for Rapid and Reliable Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* Infections. J. Clin. Microbiol. 2006. 44(4):1250-56.
7. Falcó FV, Infección por neumococo. Medicine. 2006. 9(50):3266-73.
8. Palavecino E. Puesta al día en el estudio de susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae*. Rev. Chil. Infectol. 2002.19(2):101-6.
9. Chan W, Lovgren M, and Tyrreell G. Utility of the Pneumoslide Test in Identification of *Streptococcus pneumoniae* in Blood Cultures and Its Relation to Capsular Serotype. J. Clin. Microbiol. 2009. 47(5):1559-1561.
10. Angélique Simon, Deckers Sylvain, Loo. Size, Composition and Shape-Dependent Toxicological Impact of Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes toward Bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 2009.43:8423–8429.
11. Xiaohua Ni, Mark Castanares, Amarnath Mukherjee. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. Curr Med Chem. 2011. 18(27): 4206–4214.
12. Kyle Strimbu and Jorge A. Tavel. What are Biomarkers?. Curr Opin HIV AIDS. 2010 November.5(6): 463–466.doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177.
13. Betty A. Forbes, et al. Diagnóstico Microbiológico. 2009. Editorial Médica Panamericana, S. A. 12^a Edición; pag.274.
14. M.C. Roco. Handbook on Nanoscience, Engineering and Technology, 2nd ed., Taylor and Francis, 2007, pages 1-26.

15. Debnath Bhattacharyya, Shashank Singh. Nanotechnology, Big things from a Tiny World: a Review. International Journal of u- and e- Service, Science and Technology. Vol. 2, No. 3, September, 2009.
16. National Nanotechnology Initiative. <http://www.nano.gov>.
17. Gonalo Doria, João Conde, Bruno Veigas. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. Sensors 2012, 12, 1657-1687.
18. Omid C. Farokhzad. Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for Cancer Targeting. Expert Opin Drug Deliv. 2006 May; 3(3): 311-24.
19. White RR, Sullenger BA, Rusconi CP. Developing aptamers into therapeutics. J Clin Invest. 2000; 106: 929–934.
20. Fitzwater T, Polisky B. A SELEX primer. Methods Enzymol. 1996; 267: 275–301.
21. Drolet DW, et al. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) Comb Chem High Throughput Screen. 1999; 2: 271–278.
22. Brian J. Hicke and Andrew W. Stephens. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. J Clin Invest. 2000 Oct 15; 106(8): 923–928.
23. Vant-Hull B. Payano-Baez A. Davis RH, et al. The mathematics of SELEX against complex targets. J Mol Biol. 1998; 278: 579–597.
24. Morris KN. Jensen KB. Julin CM, et al. High affinity ligands from invitro selection: complex targets. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 2902–2907.
25. Homann M. Goring HU. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. Nucleic Acids Res. 1999; 27: 2006–2014.
26. OMS. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, Manual de procedimientos. 2004; pag. 42.
27. Kyung-Mi Song, Seonghwan Lee and Changill Ban. Aptamers and Their Biological Applications. Sensors 2012, 12, 612-631.
28. www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LABS-manual-vigilancia-serotipos.pdf.
29. <http://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt08-id-characterization-streppneumo.pdf>

30. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Procedimientos en Microbiología Clínica. Emic 2010.
32. Kontiainen, S., and A. Sivonen. 1987. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:422–424.
33. Aguilar, S. I., M. J. Frias, L. Santos, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez. 2006. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. Microb. Drug Resist. 12:239–245.
34. Borek, A. P., D. C. Dressel, J. Hussong, and L. R. Peterson. 1997. Evolving clinical problems with *Streptococcus pneumoniae*: increasing resistance to antimicrobial agents, and failure of traditional optochin identification in Chicago, Illinois, between 1993 and 1996. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 29:209–214.
35. Munoz, R., A. Fenoll, D. Vicioso, and J. Casal. 1990. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13:63–66.
36. Gunter Mayer. The Chemical Biology of Aptamers. Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 2672–2689.
37. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, et al. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1991; 5: 2255-60.
38. Coffey TJ, Enright M C, Daniels M, et al. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol 1998; 27: 73-
39. Coffey TG, Daniels M, Enright M C, and Spratt BG. Serotype 14 variant of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinant replacements of the *cpsA-pbp1a* region. Microbiology 1999; 145: 2023-31.
40. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin Infect Dis 1992; 4: 801-9.
41. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995; 33; 2759-62.
42. Scott J AG, Hall A J, Dagan R. Serogroup-specific epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*: associations with age, sex and geography in 7,000 episodes of invasive disease. Clin Infect Dis 1996; 22: 973-81.
43. PREADO J. VALERIA. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus*

pneumoniae: Basic microbiological aspects. Rev. chil. infectol. 2001; 18(Suppl 1): 6-9.

44. Frías J, Gomis M, Prieto J, Mensa J, Bouza E, García-Rodríguez JA, et al. Tratamiento antibiótico empírico inicial de la neumonía adquirida en la comunidad. Rev Esp Quimioterap 1998; 11: 255-261.

45. Schaad UB, McCracken GH, Looock CA, Thomas ML. Pharmacokinetics and bacteriologic efficacy of moxalactam, cefotaxime, cefoperazone, androcephin in experimental bacterial meningitis. J Infect Dis 1981; 143: 156-163.

46. Craig WA, Andes D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in otitis media. Pediatr Infect Dis J 1996; 15: 255-259.

47. Joaquín Ruiz, Encarna Simarro. Resistencias y tratamiento de *Streptococcus pneumoniae*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001;19:191-5.

48. Masaki Nagata, Osamu Ueda, Takeo Shobuike, Tetsuro Muratani, Yosuke Aoki, Hiroshi Miyamoto. Emergence of Optochin Resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Japan. Open Journal of Medical Microbiology. 2012, 2, 8-15

49. Boulnois, G. J. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 1992. 138:249-259.

50. Luciana Gualdi et al. Regulation of neuraminidase expression in *Streptococcus pneumoniae*. BMC Microbiology. 2012. 12:200.

51. Roco M.C., R.S. Williams. Nanotechnology research directions: Vision for the Next Decade. IWGN Workshop Report 1999. Washington, D.C.: National Science and Technology Council. Available. 1999.

52. Siegel, R., E. Hu, and M.C. Roco. Nanostructure science and technology. Washington, D.C.: National Science and Technology Council. eds. 1999.

53. Fernández-López C, Mateo-Mateo C, Alvarez-Puebla RA, Pérez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM. Highly controlled silica coating of PEG-capped metal nanoparticles and preparation of SERS-encoded particles. Langmuir. 2009 Dec 15;25(24):13894-9. doi: 10.1021/la9016454.

54. Sergio Marín Mancebo. Syntesis and applications of nanoparticle in biosensing systems. Grupo de sensores y bio sensores. Bellaterra, Barcelona, España. 2009.

55. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nat Rev

Microbiol. 2008 Apr;6(4):288-301.

56. J.A. Martíneza y F. Sánchez. Mecanismo de acción de los antibióticos. Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Clínic. Barcelona. España. Agencia de Salud Pública. Barcelona. España. 2007.

57. Mao X, Phillips JA, Xu H, Tan W, Zeng L, Liu G. Aptamer-Nanoparticle Strip Biosensor for Rapid and Sensitive Detection of Cancer Cells. *Analytical chemistry*. 2009;81(24):10013.

58. Yi-Chung Chang, Chia-Ying Yang, Ruei-Lin Sun, Yi-Feng Cheng, Wei-Chen Kao & Pan-Chyr Yang. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Scientific Reports* 3, Article number: 1863 (2013).

59. Huang, Y.F.; Sefah, K.; Bamrungsap, S.; Chang, H.T.; Tan, W. Selective photothermal therapy for mixed cancer cells using aptamer-conjugated nanorods. *Langmuir* 2008, 24, 11860–11865.

60. Stasiak, P.; Sznitowska, M.; Ehrhardt, C.; Luczyk-Juzwa, M.; Grieb, P. In vivo assessment of parenteral formulations of oligo (3-hydroxybutyric acid) conjugates with the model compound ibuprofen. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2010, 11, 1636–1641.

61. Zion, T.C.; Lancaster, T.M. Polynucleotide aptamers-based cross-linked materials and uses thereof. U.S. Patent Application No. 13/145,531, 20 July 2011.

62. Dobler, R.K.; Maki, W.C. Mars health care delivery systems: Aptamers provide critical technology. 12th NASA Symposium of VLISA Design, Coeur d'Alene, ID, USA, 4–5 October, 2005.

63. Farkas, I.; Baranyi, L.; Ishikawa, Y.; Okada, N.; Bohata, C.; Budai, D.; Fukuda, A.; Imai, M.; Okada, H. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J. Physiol.* 2002, 539, 537–545.

64. Dominguez, M.; Moreno, I.; Aispurua, C.; Torano, A. Early mechanisms of *Leishmania*. infection in human blood. *Microbes Infect.* 2003, 5, 507–513.

65. Tian, L.; Heyduk, T. Bivalent ligands with long nanometer-scale flexible linkers. *Biochemistry* 2009, 48, 264–275.

66. Patel, M.P.; Patel, R.R.; Patel, J.K. Chitosan mediated targeted drug delivery system: A review. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2010, 13, 536–557.

67. Bowman, K.; Leong, K.W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int. J. Nanomedicine* 2006, 1, 117–128.
68. Hollenstein, M. Expanding the catalytic repertoire of DNAzymes by modified nucleosides. *Chimia Int. J. Chem.* 2011, 65, 770–775.
69. Robert Bogue,.Nanosensors: a review of recent research, *Sensor Review*, Vol. 29 Iss: 4, (2009).pp.310 - 315