

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



TÍTULO.

**“EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS
DE PLATA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y
VALIDACION DE UN METODO DIAGNÓSTICO”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA:

EFRAÍN RODRÍGUEZ AGUAYO

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ

Dra. NINA BOGDANCHIKOVA

TIJUANA, B.C., MÉXICO

MAYO, 2017

Tijuana Baja California, a 19 de abril del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

- Habiendo fungido como Director de tesis de la Tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y VALIDACION DE UN METODO DIAGNÓSTICO”** elaborada por el C. Efraín Rodríguez Aguayo, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE

HAReyes

Dr. Horacio Eusebio Almanza Reyes
Director de Tesis

C.c.p. Archivo

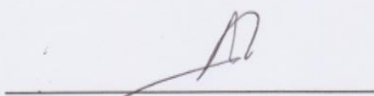
Tijuana Baja California, a 18 de abril del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la Tesis titulada **“EVALUACIÓN DE LAS
• NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y
VALIDACION DE UN METODO DIAGNÓSTICO”** elaborada por el C. Efraín
Rodríguez Aguayo, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos
establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Mtro. José Román Chávez Méndez
Sinodal

C.c.p. Archivo

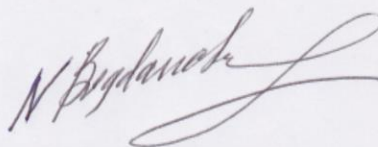
Tijuana Baja California, a 17 de abril del 2017.

**COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la Tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y VALIDACION DE UN METODO DIAGNÓSTICO"** elaborada por el C. Efraín Rodríguez Aguayo, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dra. Nina Bogdanchikova
Sinodal

C.c.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA



TÍTULO.

**“EVALUACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS
DE PLATA EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y
VALIDACION DE UN METODO DIAGNÓSTICO”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:
EFRAÍN RODRÍGUEZ AGUAYO**

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. HORACIO EUSEBIO ALMANZA REYES**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
Mtro. JOSÉ ROMÁN CHAVEZ MÉNDEZ
Dra. NINA BOGDANCHIKOVA**

TIJUANA, B.C., MÉXICO

MAYO, 2017

I.DEDICATORIA

Deseo dedicar mi tesis de maestría a mi padre y madre, debido a que sin su incansable e incondicional apoyo no hubiera sido posible la elaboración y presentación de este trabajo.

II. AGRADECIMIENTOS

Durante mis estudios de posgrado tuve el privilegio de conocer a admirables individuos de diferentes disciplinas, a mis compañeros de grupo y maestros agradezco el tiempo invertido en mí y las experiencias compartidas que hicieron posible el logro de esta meta.

Un especial agradecimiento a mi director de tesis y tutor el Dr. Horacio E. Almanza Reyes. Gracias doctor por su conocimiento transmitido, el apoyo incondicional e incansable, por las horas de dedicación que se ven reflejadas en la culminación de este trabajo de tesis.

Gracias al Mtro. José Román Chávez quien fungió como codirector de tesis y sinodal, un individuo admirable, dedicado y sabio más allá de sus años, gracias por compartir tu conocimiento y habilidades.

A la Dra. Nina Bogdanchikova agradezco todo el apoyo brindado, gracias a usted se pudo llevar a cabo la segunda parte experimental de este trabajo. Por su interés en la aplicación biológica de nanopartículas de plata y el conocimiento que nos compartió.

A la Dra. Diana Bueno agradezco el tiempo que dedico en mi formación, su apoyo y la confianza depositada en mí para heredarme su grupo de Biología Celular y ayudarme a encontrar el gusto por la enseñanza.

III. ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
a.C.	Antes de Cristo
ADN	Acido Desoxirribonucleico
B.C.	Baja California.
BAAR	Bacilo Acido-Alcohol Resistente
BCG	Bacillus Calmette Guérin
CDC	Centers for Disease Control (Centro para el control de enfermedades)
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d.C.	Después de Cristo
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfatados
FDA	Food and Drug Administration (Administracion de alimentos y drogas)
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
INDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
IS6110	Secuencia de inserción 6110
L-J	Löweinstein-Jensen
MDR-TB	Tuberculosis Multidrogorresistente
MGIT	Tubo indicador de crecimiento de Mycobacterium
mL	Mililitro
NaOH	Hidróxido de Sodio

ng	Nanogramos
NH₄Cl	Cloruro de amonio.
NK	Natural Killer (Asesino Natural)
nm	Nanómetro
NPs-Ag	Nanopartículas de plata
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguada con fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPD	Derivado proteico purificado
RPBI	Residuo Peligroso Biológico Infeccioso
RPM	Revoluciones por minuto
S	Svedberg
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TB	Tuberculosis
TDR-TB	Tuberculosis Totalmente Drogorresiste
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visible
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
XDR-TB	Tuberculosis Extensivamente Drogorresistente

IV. RESUMEN

Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* siguen siendo una de las enfermedades transmisibles que mayor problema causa a nivel mundial, según los datos reportados en el 2015 por la OMS(1). En nuestro país de acuerdo al “Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México” en el año 2015 se presentó una tasa de incidencia del 16.7 de tuberculosis en todas sus formas, mientras que en el Estado de Baja California se reportó una tasa de 54.1, tres veces mayor a la media nacional(2). Los atributos fisicoquímicos únicos de las nanopartículas de plata(NPs-Ag), hacen que éstas puedan producir condiciones químicas que inducen a un ambiente pro-oxidante causando un desequilibrio en el sistema energético dependiendo del potencial redox, provocando efectos sobre *Mycobacterium tuberculosis*, que van desde la producción de procesos inflamatorios y la destrucción de las micobacterias. Como primer objetivo en esta tesis de Maestría, se realizaron pruebas para caracterizar las diferentes concentraciones de las NPs-Ag por espectroscopia UV-Visible(UV-Vis) y por espectroscopia electrónica de transmisión(TEM). A continuación, se realizó un estudio analítico de tipo descriptivo de corte transversal observacional entre agosto del 2014 a agosto del 2016, para obtener y caracterizar 70 cepas diferentes con la amplificación de la región IS6110 por PCR, obtenidas tras su crecimiento en medio de cultivo Loweinstein Jensen obtenidas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Baja California. La Extracción del material genético se realizó utilizando Lisozima, SDS, proteinasa K y Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamilico 25:24:1. La estandarización de las PCR punto final se realizó con cebadores que amplifican la región IS6110(3). Los resultados obtenidos demostraron que la caracterización de las diferentes concentraciones de las NPs-Ag por UV-Vis, encontrando la banda característica a 420nm con una variación de absorbancia dependiente de la concentración de NPs-Ag. A través de la caracterización por TEM, se obtuvieron imágenes de las NPs-Ag que fueron analizadas con el propósito de determinar el tamaño promedio de 35nm $\pm$ 15nm, con una forma esferoidal. Para determinar la

efectividad de estas nanopartículas, y su viabilidad como agentes en el tratamiento de infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, las NPs-Ag fueron dispersadas en muestras de cultivo Middlebrook con la cepa de referencia H37Rv, después de una semana en exposición a las NPs-Ag, se sembraron los controles de crecimiento sin exposición a NPs-Ag y los cultivos expuestos en medio Loweinstein-Jensen para observar la viabilidad celular. Se determinó que las nanopartículas de plata Argovit™ presentan actividad antimicrobiana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv determinando que la concentración mínima bactericida (CMB) es de 100 mg/mL y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.1 mg/mL. Se estandarizo la técnica para el diagnóstico por PCR punto final con amplificación de la secuencia IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* con 68 cepas, obteniendo un resultado de sensibilidad de 98.59% por nuestro método.

V. ÍNDICE

CAPITULO I.....	21
1.1 Introducción	21
CAPITULO II.....	23
2.1. Antecedentes bibliográficos	23
2.1.1 Generalidades del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
2.1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
2.1.3 <i>Mycobacterium bovis</i>	25
2.1.4 <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	26
2.1.5 <i>Mycobacterium africanum</i>	26
2.1.6 <i>Mycobacterium microti</i>	27
2.1.7 <i>Mycobacterium canettii</i>	27
2.1.8 <i>Mycobacterium pinnipedii</i>	27
2.1.9 <i>Mycobacterium caprae</i>	28
2.1.10 Antecedentes históricos	28
2.1.11 Mecanismo de transmisión y patogénesis de la Tuberculosis.....	30
2.1.12 Epidemiología de la Tuberculosis.....	33
2.1.13 Diagnóstico clásico de la tuberculosis	35
2.1.14 Diagnóstico molecular de la tuberculosis	36
2.1.15 Tratamiento de la tuberculosis y farmacoresistencia	37
2.1.16 Medidas de bioseguridad en la manipulación de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y material genético extraído	39
2.1.17 Nanociencia y Nanotecnología	41
2.1.18 Antecedentes históricos de las nanopartículas de plata.....	41
2.1.19 Nanopartículas	44
2.1.20 Mecanismos de acción antibacteriana de las NPs-Ag	45
2.1.21 Aplicaciones y uso de las nanopartículas	48
2.1.22 Importancia de las nanopartículas de plata en la medicina moderna.....	49
2.1.23 Antecedentes de Nanopartículas de plata y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ...	51
2.2 Justificación y uso de los resultados	54
2.3 Planteamiento del problema	55

2.4 Hipótesis	55
2.5 Objetivos	56
2.5.1 Objetivos Generales	56
2.5.2 Objetivos Específicos	56
Capítulo III.....	57
3.1 Metodología.....	57
3.1.1 Descontaminación Petroff.....	57
3.1.2 Tinción de Ziehl-Neelsen en frío y conteo de BAAR	59
3.1.3 Elaboración de Medio de cultivo Loweinstein-Jensen.....	59
3.1.4 Cultivo de Mycobacterium spp. en medio Loweinstein-Jensen	60
3.1.5 Extracción de ADN de Mycobacterium spp.....	60
3.1.6 PCR punto final para amplificación de la secuencia IS6110.....	62
3.1.7 Determinación de actividad antituberculosis de NPs-Ag	63
3.1.8. Caracterización de las nanopartículas de plata	65
CAPITULO IV	66
4. Resultados	66
4.1. Caracterización de las nanopartículas de plata.....	66
4.2. Optimización de la reacción de PCR para amplificar la IS6110.....	69
4.2.1. Resultados de amplificación de muestras de cepas de Mycobacterium tuberculosis	70
4.3. Determinación de la actividad antituberculosis de las nanopartículas de plata	79
5.1 Discusión.....	81
5.1.1 Caracterización de las nanopartículas de plata.....	81
5.1.2 Optimización de la Reacción de PCR	81
5.1.3 Resultados de amplificación de aislados de Mycobacterium tuberculosis.....	83
5.1.4 Determinación de la actividad antituberculosis de las nanopartículas de plata	85
CAPITULO VI	88
6.1 Conclusiones.....	88
CAPITULO VII.	89
7.1. Bibliografía.....	89

CAPITULO VIII	97
Anexo I. Caracterización de Nanopartículas de Plata.....	97
Identificación por Espectroscopia UV-Visible de las nanopartículas de plata.....	97
Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.	98
Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.	99
Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5%, 10% y 20% por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM).	100
Anexo II. Fotografías de cultivos de nanopartículas de plata CMI y CMB.	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Especies del genero <i>Mycobacterium</i> que integran el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . (7).....	24
Tabla II. Grupo de fármacos antifímicos.	38
Tabla III. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.	62
Tabla IV. Protocolo de PCR utilizada para la amplificación de la secuencia IS6110.	63
Tabla V. Determinación de la CMI y CMB para evaluar el efecto antituberculosis de NPs-Ag.	64
Tabla VI. Relación entre carriles en gel de agarosa y muestra correspondiente. MP=Marcador de peso moléculas, CN=Control Negativo, CP=Control positivo.	71
Tabla VII. Resultado del cultivo de Lowestein-Jensen y la reacción de PCR. ..	77
Tabla VIII. Resultado del cultivo de Loweistein-Jensen y la reacción de PCR. 78	
Tabla IX. Determinación de la CMI para evaluar el efecto antituberculosis de NPs-Ag.	79
Tabla X. Determinación de CMB para evaluar efecto antituberculosis de NPs-Ag.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de la pared celular de micobacterias. Tomada de Kieser y colaboradores (6).	23
Figura 2. Patogénesis de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
Figura 3. Producción de nanopartículas de plata.	45
Figura 4. Mecanismos de acción antibacteriana de las nanopartículas de plata. Tomada de Elechiguerra y colaboradores (40).	46
Figura 5. Mecanismos de acción antifímico de las nanopartículas de plata. Se muestra en el ejemplo A, el control de TB no expuesto a Ag-NPs y en el ejemplo B, se muestra la TB expuesta a Ag-NPs. Tomada de Sekar y colaboradores (54).	53
Figura 6. Caracterización de nanopartículas de plata por espectrofotometría UV-VIS. Espectro de absorción para las nanopartículas de plata Argovit™ diluidas en agua desionizada. Las concentraciones de plata metálica se dan en µg/ml. Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores (56).	66
Figura 7. (A) Determinación del tamaño de las nanopartículas de plata mediante microscopia electrónica de transmisión. (B) Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata en la formulación de Argovit™. Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores (55).	67
Figura 8. Caracterización de nanopartículas de plata mediante FTIR. Espectro de ATR-FTIR de las nanopartículas de plata Argovit™ (verde). Comparándolas con un estándar de polivinilpirrolidona (en rojo). Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores. (55).	68
Figura 9. Se presenta el gel de agarosa al 1% con los controles de M. tuberculosis H37Rv a 20 ng/µL y 2 ng/µL con las bandas observadas siendo entre las bandas 200pb y 100pb del marcador de peso molecular, correspondientes con las bandas esperadas de la amplificación. El tercer carril es una muestra de ADN humano.	69
Figura 10. Se presenta gel de agarosa al 1% con las muestras de H37Rv a diferentes concentraciones de ADN genómico bacteriano y a un gradiente de temperatura, no se observa amplificación en el control negativo carril 1. En los carriles 2 al 12 se presentan las amplificaciones de la región IS6110.	70

Figura 11. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la primera corrida descrita en la tabla VI.	72
Figura 12. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la segunda corrida descrita en la tabla VI.	72
Figura 13. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la tercera corrida descrita en la tabla IV.	73
Figura 14. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la tercera corrida (muestra 11-16) descrita en la tabla IV.....	74
Figura 15. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la cuarta corrida descrita en la tabla IV.	74
Figura 16. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la quinta corrida descrita en la tabla IV.	75
Figura 17. Se presenta el gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1, el marcador de peso molecular, en el carril 2 la cepa de referencia <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, en los carriles dl 3 al 8 se presenta como control de reacción la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y en el carril 9 el aislado 66.....	76
Figura 18. Espectros de UV-Visible de Argovit de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata producidas por Vector –Vita Ltd.....	97
Figura 19. Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5% y 20%.	98
Figura 20. Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%.	99
Figura 21. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 0.3% del lote B001077.	100
Figura 22. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 3% del lote B001078.	101
Figura 23. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 5% del lote B001079.	103
Figura 24. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 10% del lote B001066.	104
Figura 25. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 20% del lote B001067.	105

Figura 26 Tubos de cultivo liquido 1.1-1.5 después de tres semanas de incubación. CMI.....	107
Figura 27 Tubos de cultivo liquido 2.1-2.5 después de tres semanas de incubación. CMI.....	108
Figura 28. Tubos de cultivo liquido 3.1-3.5 después de tres semanas de incubación. CMI.....	109
Figura 29 Tubos de cultivo liquido C.1-C.5 después de tres semanas de incubación. CMI.....	110
Figura 30 Control positivo con cepa de referencia y control negativo sin inocular.	111
Figura 31. Cultivos CMB tubos 1.1-1.5. Mycobacterium tuberculosis H37Rv.	112
Figura 32. Cultivos CMB tubos 2.1-2.5. Mycobacterium tuberculosis H37Rv y nanopartículas de plata.	112
Figura 33. Cultivos CMB tubos 3.1-3.5. Control solamente nanopartículas de plata.	113

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit con el lote B001077.	101
Gráfica 2. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078.	102
Gráfica 3. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079.	103
Gráfica 4. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit con el lote B001066.	105
Gráfica 5. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit con el lote B001067.	106

CAPITULO I

1.1 Introducción

Mycobacterium tuberculosis es una bacteria de interés clínico debido a su papel infeccioso en el desarrollo de la enfermedad conocida como tuberculosis pulmonar y extra pulmonar. Esta enfermedad infecciosa ha acompañado al ser humano a lo largo de su historia y hasta la fecha se nos presenta como una de las enfermedades bacterianas de mayor importancia e interés, sobre todo en países en vías de desarrollo donde las condiciones higiénicas favorecen la transmisión de este agente patógeno. A nivel mundial de acuerdo al reporte de 2016 de la Organización Mundial de la Salud de los alrededor de 7.3 billones de seres humanos que forman la población mundial alrededor de 10,400,000 forman parte de los casos incidentes de tuberculosis reportados en el año 2015(4). Para nuestro país el mismo reporte nos dice que en el año 2015 de los alrededor de 127 millones de mexicanos, su estimación dice que aproximadamente 27,000 serían casos incidentes para esta enfermedad de los cuales 3,000 son personas que presentan tuberculosis en co-infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana(4). Tuberculosis al igual que otras bacterias que son expuestas constantemente a agentes antimicrobianos como forma quimioterapéutica de combatir la infección que provocan tienen el potencial de desarrollar resistencia a los fármacos utilizados de primera línea, en tuberculosis para el reporte 2016 se reporta la incidencia para las cepas multidrogoresistentes en conjunto con aquellas cepas que son resistentes a rifampicina(4). A nivel mundial se reporta que de los casos nuevos con tuberculosis presentados en el año alrededor del 3.9% presentan resistencia a estos fármacos, esto nos habla de una incidencia de 580,000 casos a nivel mundial. Mientras que en nuestro país el estimado presentado por el reporte nos dice que en 2015 se tuvo una incidencia de 910 casos estimados de tuberculosis multidrogoresistente o resistente a rifampicina(4).

Como opción al tratamiento establecido con los antifímicos clásicos buscamos en este trabajo explorar el potencial que presentan las nanopartículas de plata en su papel de antimicrobiano como posibles agentes útiles en el tratamiento de la tuberculosis. Sobre todo, en paciente que presentan una forma de farmacoresistencia lo que dificulta el tratamiento habitual. Con este trabajo de tesis buscamos determinar la concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de plata sobre una cepa de referencia de *Mycobacterium tuberculosis*, la cepa H37Rv. Adicional a esto se determinará la sensibilidad y especificidad de un método de detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por vía de la biología molecular, utilizando una reacción en cadena de la polimerasa, amplificando la secuencia de inserción 6110.

CAPITULO II

2.1. Antecedentes bibliográficos

2.1.1 Generalidades del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Pertenecientes a la familia *Mycobacteriaceae*, las alrededor de 120 especies de bacterias del género *Mycobacterium*, tienen en común la característica de presentar ácidos micólicos en su pared celular. Estos ácidos grasos contienen de 70 a 90 carbonos en su cadena alifática. Esto le da una característica altamente hidrofobia a la pared celular. En la figura 1 se muestra de forma general la estructura de la pared celular de estas bacterias, con su capa de péptidoglucano similar a bacterias Gram positivas, pero con una capa adicional de ácidos micólicos. Tienen la propiedad de ser resistentes a la decoloración con alcohol-ácido, esto se aprovecha en diferentes técnicas de tinción, para visualizar estas células en muestras clínicas (5,6).

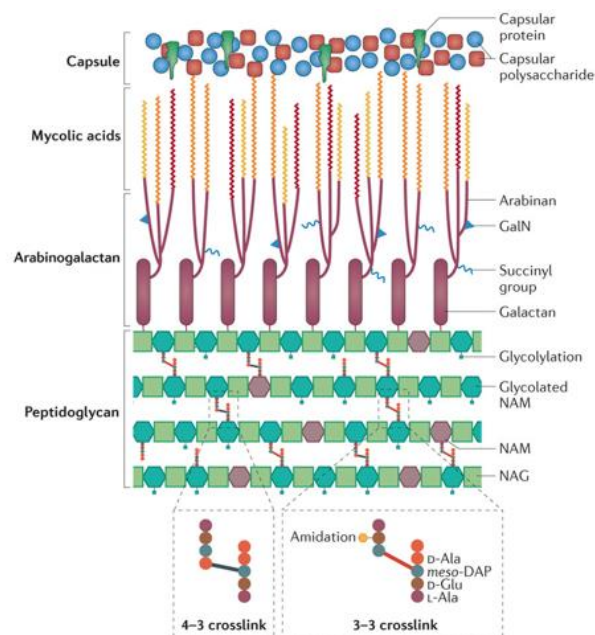


Figura 1. Estructura general de la pared celular de micobacterias. Tomada de Kieser y colaboradores (6).

Son bacterias aerobias, es decir, se desarrollan mejor en presencia del oxígeno. Tienen forma bacilar, cuando se observan al microscopio. Tienen un

tamaño de 0.2 a 0.6 μm por 1 a 10 μm . En el medio a base de huevo Löweinstein-Jensen, se observan colonias rugosas, opacas, de borde irregular, de color blanco a amarillento(5). El complejo *Mycobacterium tuberculosis* es un taxón donde se agrupan las bacterias de dicho género que tienen la capacidad de provocar tuberculosis en animales y humanos. Las diferentes especies y subespecies que integran dicho taxón forman un grupo homogéneo. Entre estas bacterias se observa una homología en más del 95% al 99.9% a nivel nucleótidos en sus genomas y comparten secuencias casi idénticas en la unidad 16s de su ARN (ácido ribonucleico) ribosomal. Debido a esta similitud tan alta entre bases nucleotídicas, se han desarrollado diversas técnicas basadas en distintos marcadores moleculares para distinguir entre diferentes cepas del mismo complejo, inclusive en la misma especie(5,7,8). En la siguiente tabla se muestran las diferentes especies de bacterias del género *Mycobacterium*. Todas ellas integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabla I. Especies del genero *Mycobacterium* que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (7)

Especie	Descubierta	Hospedero
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1882-Koch	Humano
<i>Mycobacterium bovis</i>	1970-Karlson y Lessel	Bovinos
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	1957-Guérin y Rosenthal	Desarrollado como vacuna
<i>Mycobacterium africanum</i>	1969-Castets y Sarrat	Humano
<i>Mycobacterium microti</i>	1957-Reed	Roedores
<i>Mycobacterium canettii</i>	1997-van Soolingen y colaboradores.	Humano
<i>Mycobacterium pinnipedii</i>	2003-Cousins y colaboradores.	Focas y leones marinos
<i>Mycobacterium caprae</i>	2003-Aranaz y colaboradores.	Cabras
<i>Mycobacterium orygis</i>	2012-van Ingen	Oryx

En la tabla se muestran las diferentes especies de bacterias del género *Mycobacterium* que integran el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

2.1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Esta especie es la principal responsable de la tuberculosis en los seres humanos, aunque también se tienen reportados casos en distintos animales, entre ellos bovinos, porcinos, felinos, caninos, aves. En la actualidad, gracias a los avances en medicina de los últimos dos siglos, esta enfermedad ha quedado en gran medida relegada a los estratos inferiores de la sociedad, personas sin acceso a servicios médicos, personas en los extremos de la vida, niños y ancianos, y personas inmunosuprimidas, especialmente los infectados con VIH(5,7). Esta última condición se tiene reportada en la literatura como una de las principales responsables de la evolución de tener la infección latente en el organismo a pasar a una infección activa, donde se tiene el mayor potencial para infectar a las personas que se encuentran en contacto con el enfermo. De esta misma especie se han caracterizado distintas cepas, de estas, una de las más importantes es la asiática o Beijing(5).

2.1.3 *Mycobacterium bovis*

M. bovis se tiene reportado como la causa más común de tuberculosis en el ganado, en especial a los pertenecientes a la familia *Bovidae*, aunque también se sabe puede provocar esta enfermedad en gatos, perros, puercos, aves, además de primates y seres humanos. Cuando se presenta en humanos la tuberculosis, con *M. bovis* como agente etiológico, la evolución clínica es muy similar a la infección por *M. tuberculosis* con la diferencia que la pirazinamida no funciona como antibiótico contra ella. Esta especie tiene la particularidad de crecer en el medio L-J si reemplaza el glicerol que se le añade cuando se prepara con piruvato como fuente de carbono.

Tiene la capacidad de desarrollarse en una atmósfera con concentración disminuida de oxígeno. Con la secuenciación del genoma de esta especie, y comparándola con la de *M. tuberculosis*, se encontró que es más pequeña, lo que sugiere que *M. bovis* evolucionó a partir de *M. tuberculosis*(5,7).

2.1.4 *Mycobacterium bovis* BCG

El BCG se comenzó a distribuir en 1924 a laboratorios a nivel mundial para desarrollarse como vacuna contra la tuberculosis. Comparte las características descritas para *M. bovis*, excepto que se encuentra atenuado, es decir, su virulencia o capacidad para infectar y desarrollar la enfermedad tuberculosis en el hospedero está disminuida. Se administra normalmente en recién nacidos, en áreas donde se considera endémica la tuberculosis y principalmente protege de contraer tuberculosis extrapulmonar(5,7).

2.1.5 *Mycobacterium africanum*

Descrita por primera vez en 1968 en Senegal, esta especie de micobacteria provoca tuberculosis en humanos en las regiones tropicales de África, donde se tiene reportado que es responsable hasta de la mitad de los casos de tuberculosis, se cree esto debido a una adaptación entre el patógeno y su hospedero. Sus características fisiológicas y las reacciones observadas en diferentes pruebas bioquímicas posicionan a esta especie evolutivamente entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esta desviación genética se ha confirmado por distintos patrones observados en diferentes pruebas de genotipado que serán descritas más adelante. De esta especie se han descrito dos subtipos, I y II. El subtipo II se ha clasificado como una cepa de *M. tuberculosis*, mientras que el subtipo I es más heterogéneo y se reconoce como una rama evolutiva separada dentro del complejo. Este subtipo fue dividido aún más en África Occidental I y II, de acuerdo a su prevalencia en dos zonas geográficamente distintas(5,7).

2.1.6 *Mycobacterium microti*

Se aisló por primera vez en ratones de campo y musarañas, por lo que se considera principalmente un patógeno de roedores. Se ha encontrado también en gatos, puercos, camellos, entre otros. Esta especie causa tuberculosis en especies pequeñas de roedores y lagomorfos. Más alarmante es que se tiene reportada esta tuberculosis en humanos inmunocompetentes, así como inmunosuprimidos. Se le han encontrado aplicaciones como vacuna en ganado, protegiendo también de *M. bovis*(5,7).

2.1.7 *Mycobacterium canettii*

Descrito por primera vez en África por el microbiólogo francés Georges Canetti de quien procede su nombre. En cultivo se diferencia mucho del resto de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, esta especie presenta colonias lisas y lustrosas. De acuerdo a diversos análisis genotípicos se ha determinado que es una de las especies que más han divergido evolutivamente y dependiendo de la fuente, se dice que pudo haberse distanciado evolutivamente de *M. tuberculosis*(7), o haber sido la especie que originó a todo el complejo *M. tuberculosis*(5). Se le ha encontrado causando linfadenitis y tuberculosis generalizada en individuos inmunocomprometidos. Y parecería ser un agente etiológico emergente en el cuerno de África (5,7).

2.1.8 *Mycobacterium pinnipedii*

Es una especie recientemente descubierta que parece tener una preferencia por infectar pinnípedos, se aisló por primera vez en focas. Para tener presencia ubicua, principalmente en el hemisferio sur, ya que se tienen reportados aislamientos en Australia, Sudamérica y Gran Bretaña. Aunque tiene cierta predilección por los mamíferos marinos, se ha encontrado en mamíferos terrestres, con aislamientos en animales como el tapir, conejos y ganado. Su

infección se manifiesta como lesiones granulomatosas en los nódulos linfáticos, aparato respiratorio y bazo(5,7).

2.1.9 Mycobacterium caprae

Conocido inicialmente como *M. bovis* subespecie *caprae*, se le atribuyen alrededor del 31% de las infecciones tuberculosas en humanos atribuidas a *M. bovis*. Es susceptible a pirazinamida, característica por la que puede ser identificado fenotípicamente. Las diferentes cepas de esta especie han sido encontradas en su mayoría en países europeos, principalmente en España. Se diferencia de otras especies del complejo en diversos polimorfismos en diversos genes comunes. Se ha aislado en diferentes especies de cápridos, así como animales en zoológicos y granjas(5,7). Por esta característica de encontrarse también en ganado, esta bacteria no es solo de interés médico sino también veterinario y en específico para la industria ganadera.

2.1.10 Antecedentes históricos

De acuerdo a Moreno Altamirano, <<Se conoce como enfermedad transmisible a aquella causada por un agente infeccioso específico>>(9). Como ya se mencionó, la tuberculosis es causada por una diversidad de bacterias relacionadas genética y fenotípicamente. Se cree que la tuberculosis ha acompañado al hombre desde tiempos prehistóricos. Se creía que se originó con el desarrollo de la agricultura hace unos 9000 años; de acuerdo a esta creencia, la tuberculosis habría estado con la humanidad desde que esta empezó a emigrar de África hacia partes de Asia y Europa(10). Los datos históricos más antiguos que hablan sobre enfermedades transmisibles como la tuberculosis datan del año 400 a. C., aunque sus manifestaciones clínicas y la manera en que se transmite se conocen desde el año 1000 a. C., durante la era hipocrática se le conoció como tisis. Mientras que alrededor del año 20 d. C. se le conocía como

tuberculum al nódulo pulmonar característico de esta enfermedad(9). El conocimiento que se tenía sobre esta enfermedad en el siglo XIX era virtualmente el mismo que en la época antigua, mientras los doctores recetaban el consumo de comida nutritiva y reposo a los pacientes infectados. No fue hasta el año de 1882 cuando el célebre microbiólogo alemán llamado Robert Koch, conocido por su trabajo con el carbunco y la identificación de *Bacillus anthracis*, que lo llevó a enunciar sus famosos postulados. Este científico asoció un microorganismo a esta enfermedad, que se comenzó a tener avances científicos en su tratamiento (11).

A partir del descubrimiento del agente etiológico, se continuó investigando por esta línea arribando al desarrollo de la tuberculina en 1890, que se utiliza en forma de derivado proteico purificado o PPD como prueba de tamizaje. Otro importante desarrollo durante esta época, específicamente en el año 1908, fue la vacuna del *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), del cual ya se habló en la sección anterior. Durante este mismo periodo de tiempo, en 1943, se comenzaron a emplear antifímicos, los cuales son antibióticos específicos para el tratamiento de la tuberculosis(11).

Con estos avances, la humanidad comenzó a hacer frente a una enfermedad que la acosaba y que estuvo presente desde sus orígenes, debido a la disminución en tasas de mortalidad durante el siglo siguiente a esta época de descubrimientos científicos, se comenzó a perder interés por seguir investigando sobre ella. No fue hasta la década de los noventa del siglo XX cuando se desató la pandemia del SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) y las coinfecciones con tuberculosis resistente en pacientes VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) positivos que se recuperó el interés en la investigación de la tuberculosis(11). Aunque al principio se tenía la creencia que el *M. tuberculosis* se originó a partir de *M. bovis*, estudios más recientes ligan estas dos especies a un ancestro común, lo que implica que el ganado

originalmente pudo haber sido contagiado por la especie que infecta a los humanos y haber evolucionado a partir de allí, o se trata de una evolución en paralelo desde un ancestro común. Este ancestro pudo haber evolucionado de otras especies del complejo *Mycobacterium*, posiblemente en la parte central del continente africano (10).

Esta teoría se sustenta aún más con el hecho de que las bacterias dentro del complejo *M. tuberculosis*, presentan muy poca recombinación genética, o intercambio de información cromosomal entre sus distintas cepas, por lo tanto, el ancestro común más reciente debería tener un cromosoma más grande que *M. tuberculosis*, debido a que es un organismo clonal, es decir, su progenie tiene la misma información genética, este no puede reparar deleciones en su genoma por recombinación de ADN (ácido desoxirribonucleico)(8).

2.1.11 Mecanismo de transmisión y patogénesis de la Tuberculosis

El agente etiológico de la tuberculosis, se puede transmitir entre diferentes hospederos, siendo la más habitual para *M. tuberculosis* la transmisión entre humanos, pero como ya mencionamos no solamente esta bacteria forma parte del complejo que puede provocar la tuberculosis en humanos, entonces también animales de diferentes especies pueden transmitir diferentes especies de micobacterias a seres humanos. Esta bacteria se puede transmitir de manera directa o indirecta, por medio de aerosoles emitidos por el hospedero infectado, estos aerosoles se encuentran cargados de la bacteria tuberculosa y pueden permanecer suspendidos en el ambiente, al ser inhalados por un hospedero sano son depositados en los alveolos pulmonares distales(12). *M. tuberculosis* se puede considerar una bacteria intracelular facultativa, ya que puede vivir en forma independiente, por ejemplo en diferentes medios de cultivo, pero puede y prefiere infectar células del organismo hospedero, teniendo preferencia por los macrófagos residentes de los alveolos pulmonares(12).

Como ocurre en la mayoría de las infecciones primero se observa una respuesta del sistema inmune innato, que involucra el reclutamiento de glóbulos blancos al sitio de infección. La respuesta adaptiva ocurre cuando se ponen en contacto células dendríticas con los antígenos bacterianos en los nódulos linfáticos locales. Esto lleva a la activación de linfocitos T efectores ingenuos, los cuales una vez activados desempeñarán sus funciones en el sitio de infección original. Estas células son las responsables de estimular a otros glóbulos blancos a ensamblar y formar parte del granuloma.

Este granuloma es una estructura altamente organizada y estratificada, compuesta de glóbulos blancos y fibroblastos. Una vez que los macrófagos son infectados estos comienzan a producir quimosinas y FNT- α , este proceso comienza a estimular la migración y reclutamiento de neutrófilos, linfocitos NK, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Estas células amplifican la respuesta inflamatoria local. Llevando a una respuesta celular específica que se liga a la producción de interferón gamma, que culmina con la formación del granuloma estable, este granuloma formará una especie de “prisión” donde será contenida la bacteria tuberculosa (10,12).

En la mayoría de los hospederos, mientras estos se mantengan inmunocompetentes estos granulomas permanecerán íntegros y la persona presentará una infección latente o subclínica, mientras un individuo tenga esta forma de la infección no será contagioso a otras personas ya que las bacterias se encuentran en el granuloma y no son expulsadas en aerosoles, que como ya mencionamos es necesario para la transmisión(10,12).

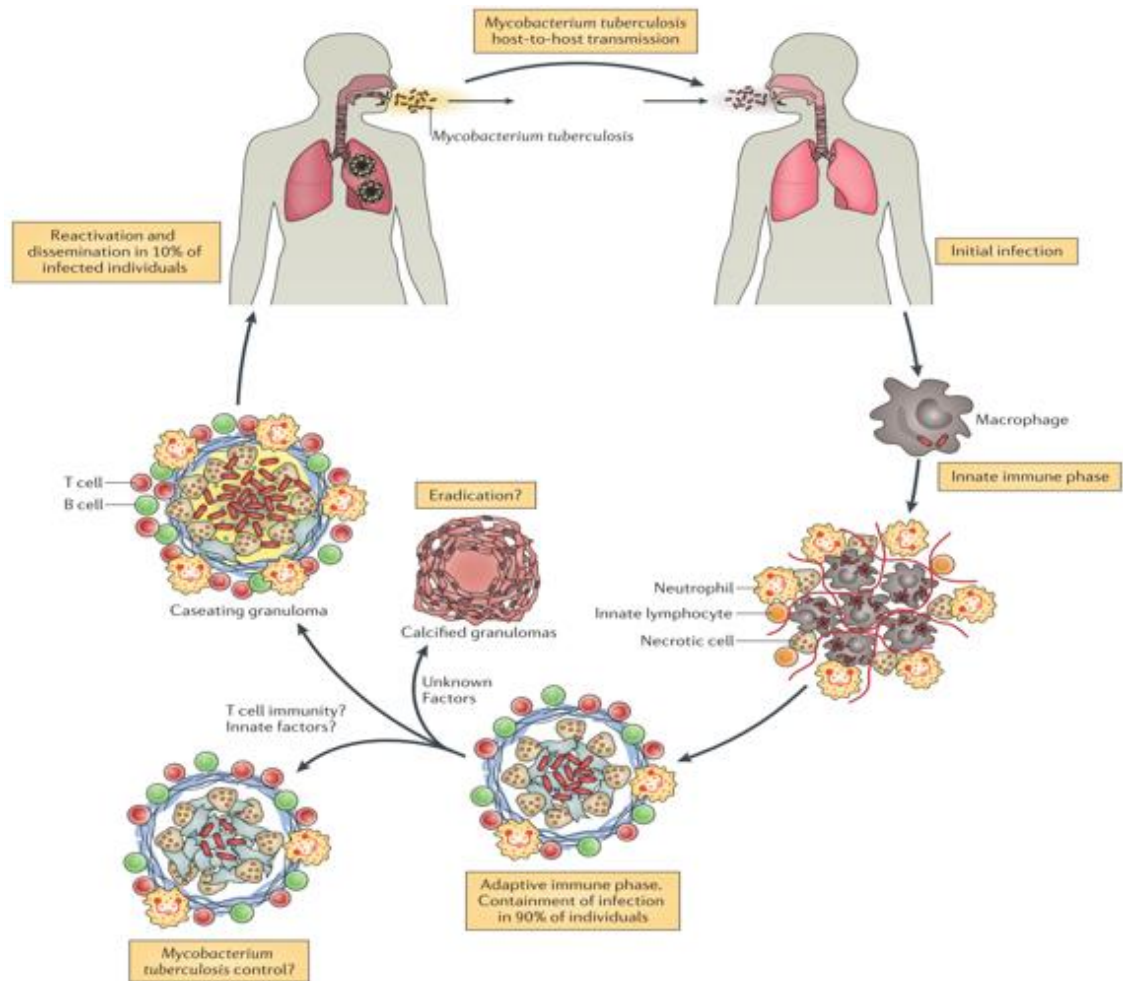


Figura 2. Patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*.

La infección se inicia por la inhalación de aerosoles que contienen a la bacteria. Los estadios iniciales de la infección se caracterizan por la respuesta de la inmunidad innata involucrada en el reclutamiento de células inflamatorias al pulmón. Seguido de la diseminación de bacterias a los nódulos linfáticos que se encuentran drenando, la presentación de antígenos bacterianos por células dendríticas lleva al cebado de células T y lleva a una expansión en células T antígeno específicas las cuales son reclutadas al pulmón. El reclutamiento de células T, B y macrófagos activados lleva a la creación de granulomas los cuales

pueden contener *Mycobacterium tuberculosis*. La mayoría de los individuos infectados permanecerán en el estadio de la infección latente, en la cual no se observan síntomas clínicos. Un porcentaje pequeño de estas personas progresarán a desarrollar la forma activa de la enfermedad, lo cual lleva a la liberación de *M. tuberculosis* de los granulomas que se erosionan en las vías aéreas. Cuando el individuo con infección activa se liberará aerosoles que pueden transmitir la enfermedad. Tomada de Nunes-Alvez y colaboradores (12).

2.1.12 Epidemiología de la Tuberculosis

A nivel mundial el organismo encargado del monitoreo en materia de salud es la Organización Mundial de la Salud (OMS por sus siglas). Este organismo tiene la función de recopilar información en materia de salud de los diferentes institutos y dependencias gubernamentales de cada país, así como brindar ayuda en caso de emergencias en materia de salud. Cada año este organismo saca un reporte del estado epidemiológico de la tuberculosis a nivel mundial.

El reporte de 2015 nos dice que la tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades transmisibles que causa un problema de salud a nivel global. De acuerdo a sus cifras de 2014, un total de 9.6 millones de personas adquirieron tuberculosis (5.4 millones de hombres, 3.2 millones de mujeres, y 1 millón de niños), mientras que un millón y medio de personas murieron de esta enfermedad, de los cuales cuatrocientos mil eran VIH positivos. Estos datos, en la opinión de la OMS, siguen siendo inaceptables puesto que la mayoría de las muertes atribuidas a esta enfermedad pueden ser prevenidas con el diagnóstico y el tratamiento adecuado. La tuberculosis es una enfermedad ubicua, y los datos que integran este reporte provienen de 202 países(1).

Globalmente se estima que el 3.5% de los casos incidentes y el 20.5% de los casos de reincidentes se debe a infección con una cepa multidrogorresistente, esto se estima en que se tuvieron cuatrocientos ochenta mil casos de tuberculosis

multirresistente para el año 2013. Del total de pacientes anteriores se estima que el 9% se encuentran infectados con una cepa drogoresistente(13).

Debido a estas cifras, la OMS considera que la confirmación con el laboratorio clínico es la clave para asegurar que los individuos que presentan signos y síntomas de tuberculosis puedan ser diagnosticados de manera correcta y, por lo tanto, su tratamiento sea el óptimo para intentar minimizar los casos reincidentes y las fallas terapéuticas por estar infectado con cepas resistentes a los antifímicos de primera línea(13). Otro punto epidemiológicamente relevante ya mencionado es el caso de las infecciones concomitantes de VIH y TB, mientras que a nivel mundial ya se describió la prevalencia de estos casos, a nivel local desconocemos las cifras; pero se tienen identificadas zonas donde este tipo de pacientes se congregan. De acuerdo al reporte de la OMS el primer paso para reducir la carga de TB asociada a VIH es realizando pruebas de tamizaje para identificar dentro de los pacientes con TB, los que pudieran estar infectados con VIH.

Añadido a esto, la OMS recomienda que los pacientes que resulten positivos procedan a recibir terapia antiretrovial y, mientras que en el 2013 el 70% de los pacientes recibió este tratamiento, para el 2015 se espera que sea el 100%. (13) Se mejoró esta cifra para el reporte de 2015 a 77% aunque no se alcanzó el 100% esperado(1). En nuestro país, de acuerdo al Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México, el reporte publicado en 2012 nos dice en su introducción que <<se registra un avance significativo al haber logrado disminuir la mortalidad en 72.6 por ciento con relación a la tasa registrada en 1990 y reducir la incidencia en 33.2 por ciento con respecto a la más alta registrada en 1997, así como haber alcanzado 85.3 por ciento de éxito de tratamiento...>>(2), esto último se menciona para dar un sentido retrospectivo al análisis epidemiológico de estado en que se encuentra México.

2.1.13 Diagnóstico clásico de la tuberculosis

La organización Panamericana de la Salud, oficina regional de la Organización Mundial de la Salud, publica un manual en dos partes, para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis (14,15). Estos manuales dictan la pauta para el diagnóstico clásico de la tuberculosis. La primera parte nos habla sobre las normas y la guía técnica para realizar la baciloscopia, la segunda parte con las mismas características, pero para realizar el cultivo de *M. tuberculosis*. Estos métodos son el estándar de oro para el diagnóstico de tuberculosis(16).

En estos manuales se encuentran estandarizados los procesos para realizar ambas partes del diagnóstico de tuberculosis, así como, los procedimientos y fórmulas para las distintas soluciones y medios de cultivo utilizados para identificar y cultivar a nuestra bacteria. El diagnóstico de la tuberculosis sea pulmonar o extrapulmonar se puede realizar con los dos métodos mencionados anteriormente, la baciloscopia resulta económica y de fácil acceso sobre todo en localidades con dificultades económicas y dependerá de la habilidad que el analista tenga para leer e interpretar la muestra teñida. Mientras que el cultivo en medios líquidos o base de huevo resulta más complejo debido al procedimiento que se debe seguir para preparar el medio de cultivo y mantenerlo en las condiciones adecuadas durante el periodo de incubación.

A esto le sumamos el potencial que tiene este procedimiento de contaminar el área de laboratorio, por lo que requiere un área especial dentro del laboratorio para realizar los cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* y nos aleja un poco de la posibilidad de realizarlo en lugar con poco acceso a recursos. Aun así este cultivo se considera el estándar de oro para el diagnóstico de la tuberculosis en paciente (14,15). Tradicionalmente el cultivo se realiza en un medio a base de huevo de gallina, verde de malaquita y distintas sales, conocido comúnmente como medio Loweinstein-Jensen, este medio de color verde es el

indicado para observar la morfología colonial de nuestra bacteria tuberculosa, ya que se ven como colonias secas arenosas de color amarillo.

Pero también existen medios de cultivo líquido que se pueden utilizar para diagnosticar tuberculosis. Estos se basan en la turbidez del medio de cultivo con el crecimiento de la bacteria, uno de estos es el caldo Middlebrook 7H9 uno de los utilizado más comúnmente(15). Se han hecho modificaciones a estas técnicas clásicas, buscando detectar el crecimiento más rápidamente, acortando el tiempo de diagnóstico, uno de estos el medio fabricado por la compañía BBL conocido como medio MGIT consiste en tubos con medio de cultivo Middlebrook 7H9 y peptona, suplementado con ácido oleico, albumina bovina, dextrosa, catalasa y estearato de polioxietileno(17). Este tubo tiene en un su base silicón con cloruro pentahidratado de Tris-4,7-difenil-1,10-fenantrolina rutenio, este compuesto en contacto con el oxígeno no emite fluorescencia, pero una vez que el oxígeno va siendo utilizado por el microorganismo en crecimiento el compuesto comienza a emitir fluorescencia cuando se expone a radiación de un transiluminador a una longitud de onda de 365 nm o una lámpara de Woods(17).

2.1.14 Diagnóstico molecular de la tuberculosis

Como ya lo escribimos en la sección anterior, aunque el cultivo en medios de huevo o líquidos se considera el estándar de oro para la detección y diagnóstico de *M. tuberculosis* de muestras clínicas, inclusive aquellas que nos dan una baciloscopia negativa, este método diagnóstico puede tomar de dos semanas a meses en darnos resultados. Gracias a los avances en las últimas décadas en el desarrollo de tecnologías basadas en los principios y procesos de la biología molecular es que se han podido ir desarrollando métodos diagnósticos más rápidos, sensibles y específicos para una detección más temprana del bacilo tuberculoso.

La primera de estas tecnologías que revisaremos será la PCR o reacción en cadena de la polimerasa que es de utilidad cuando conocemos la secuencia del genoma y podemos diseñar sondas dirigidas a secuencias específicas en el material genético bacteriano que solo se encuentre presente en el género o especie de interés, en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* se pueden diseñar sondas para la secuencia de inserción 6110 (IS6110), y genes diversos como *devR*, *mtp40*, *rpo B*, así como el gen que codifica para el ARNr 16s. Se tiene reportado que algunas cepas en el sureste de Asia no presentan la secuencia de inserción 6110, aunque en promedio las demás cepas, se estima tienen de 10 a 16 copias de esta secuencia en el genoma bacteriano, esto debido a que es un elemento genético móvil. Para estas cepas se tiene reportado el *rpoB* como blanco alternativo (16).

2.1.15 Tratamiento de la tuberculosis y farmacoresistencia

Habitualmente los tratamientos para las infecciones bacterianas provocadas por bacterias que no son resistentes al tratamiento con antibióticos duran en promedio de una a dos semanas en paciente ambulatorios y son tratamientos con un solo fármaco antibiótico. Desde la década de los años 90 el régimen de tratamiento para la tuberculosis pulmonar se ha mantenido igual. Utilizando fármacos llamados de primera línea en régimen de tratamiento que dura alrededor de seis meses, los primeros dos meses del tratamiento al paciente se le administra isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Los cuatro meses restantes al paciente se le quita la pirazinamida del régimen. Este esquema es el idóneo y da buenos resultados mientras sea un paciente que se adhiere a su tratamiento y asumiendo que el microorganismo infectándolo es susceptible a los fármacos administrados (18,19).

Tabla II. Grupo de fármacos antifímicos.

Grupo de fármaco	Fármacos
Grupo 1: Fármacos de primera línea vía p.o.	Rifampicina, Rifabutina, Isoniazida, Etambutol y Pirazinamida.
Grupo 2: Agentes inyectables.	Estreptomicina, Kanamicina, Amikacina y Capreomicina.
Grupo 3: Flouroquinolonas.	Levofloxacino, Moxifloxacino, y Ofloxacino.
Grupo 4: Fármacos de segunda línea vía p.o.	Ácido paraaminosalicílico, cicloserina, terizidona y protionamida.

Representación de los diferentes grupos de fármacos utilizados como antifímicos, tomada de Monedero y colaboradores (20).

Se sabe que las bacterias por diversos mecanismos desarrollan resistencia a los agentes antimicrobianos que se utilizan en el tratamiento de las infecciones que provocan y *Mycobacterium tuberculosis* no es la excepción. Esto comenzó con la aparición de los medicamentos antifímicos que son los antibióticos con efecto sobre la bacteria que provoca la tuberculosis, primero se identificó resistencia contra estreptomicina y el ácido paraaminosalicílico, con la introducción de la isoniazida se comenzó a observar resistencia a este fármaco asociada a resistencia a los primeros dos fármacos mencionados (20). En el año 1963 se introduce un nuevo fármaco en la guerra contra la tuberculosis la rifampicina, y no fue la excepción a este fenómeno del desarrollo de resistencia y con el uso de este fármaco en la terapia de paciente. Al igual que como fue mencionado en el parrado anterior se comenzaron a identificar cepas de *M. tuberculosis* resistentes a ambos medicamentos y se designaron como cepas multidrogorresistentes (MDR-TB). Actualmente esta designación se usa para cepas que son resistentes a por lo menos a estos dos fármacos pero pudiendo ser resistentes a más de estos dos (4,19–22).

Añadiendo a la existencia de las cepas de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes, si una cepa bacteriana exhibe resistencia a cuatro tipos de antibióticos diferentes, aquí incluido ya rifampicina e izoniazida que componen a la MDR-TB más flouoroquinolonas y por lo menos un fármaco del grupo 4. Recibe la designación de extensivamente drogorresistente o XDR.(20,23) En el año 2003 se observó por primera vez en dos pacientes una cepa de tuberculosis resistente a todos los fármacos de primera y segunda línea, en ambos casos los pacientes murieron. Se probó la sensibilidad a los fármacos in vitro y la aplicación de estos fármacos en el régimen farmacológico llevo a fallo terapéutico, esta nueva forma de tuberculosis resistente a los fármacos utilizados habitualmente recibió la designación de tuberculosis totalmente drogorresistente (TDR-TB). (24,25). La existencia de la MDR-TB, XDR-TB y TDR-TB, lleva a la búsqueda de agentes farmacológicos que puedan ser utilizados en el tratamiento de esta enfermedad y donde creemos que es de importancia utilizar una forma farmacológica novedosa para determinar su efectividad ante este agente infeccioso y su potencial uso para combatir las infecciones provocadas por esta bacteria.

2.1.16 Medidas de bioseguridad en la manipulación de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y material genético extraído

De acuerdo a la descripción del manual de bioseguridad emitido por la OMS en su tercera edición, *Mycobacterium tuberculosis* entraría en la descripción del grupo de riesgo 3, alto riesgo al individuo bajo riesgo a la comunidad, ya que es un patógeno que puede causar una enfermedad seria en el individuo pero no se transmite entre individuos tan fácilmente debido a las características de su proceso infectivo y existe un tratamiento efectivo y medidas preventivas para él manejo que se les dio a las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo el mantenimiento de cepas y la extracción de material genético que incluye el uso

de un aparato para vortex y el potencial para generar aerosoles potencialmente infecciosos de estos procedimientos se necesitan las características de un laboratorio de bioseguridad nivel 3. Que incluyen buenas prácticas de microbiología, uso de equipo de protección personal, acceso controlado y el uso de una campana de flujo laminar para todas las actividades realizadas. Y aunque el manual establece que el grupo de riesgo no es necesariamente igual al nivel de seguridad en el laboratorio en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* si concuerdan (26).

Como equipo de protección personal para el patógeno manejado se utilizó un traje entero con gorro cerrado con cierre por la parte delantera, lentes de protección, guantes en todo momento que se esté dentro del área donde se maneja TB y mascara cubre bocas N95 que cumple con los estándares del Centro para Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en ingles) de los Estados Unidos de América. Para la desinfección de las áreas de trabajo incluyendo la parte interna de la campana de flujo laminar se utilizan soluciones acuosas de alcohol al 70%, el producto comercial “Lysol” según las indicaciones del fabricante y en el caso de la campana de flujo laminar se deja prendida su lámpara de luz ultravioleta (27).

De acuerdo a las actividades realizadas dentro del laboratorio el manual de la OMS para laboratorios de tuberculosis, nuestro laboratorio estaría dentro del grupo de alto riesgo. Ya que se manejan cultivos de *M. tuberculosis* y se manipulan para ensayos de resistencia y susceptibilidad a antimicrobianos, así como, para ensayos moleculares. Se siguen los lineamientos de esta guía ya que todo cultivo de TB y los ensayos moleculares previos al manejo del material genético extraído se hacen dentro de una campana de flujo laminar. Se hace notar que el material genético extraído ya por sí solo no es infeccioso(27). Nuestro laboratorio cuenta con las puertas dobles para la entrada al área de manejo de tuberculosis creando una antesala donde le personal puede ponerse

el material de protección personal previo al ingreso y posible contacto con el agente patógeno. En cuanto a la campana de flujo laminar en el área se cuenta con una campana de clase II tipo B lo que la hace ideal para este tipo de aplicación (27).

2.1.17 Nanociencia y Nanotecnología

El término “nanotecnología” fue usado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi, quien señala así la capacidad de manejar materiales a nivel manométrico. El rango de tamaño de mayor interés para la nanociencia y las nanotecnologías es de 100 nm o menos debido a que los materiales pueden realzar sus propiedades o adquirir otras formas diferentes. El ser humano ha usado las nanotecnologías durante siglos, por ejemplo, nanopartículas de plata. Dependiendo de su tamaño, las nanopartículas pueden parecer rojas, azules o doradas(28). La Nanotecnología es el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas complejos mediante el control de la forma, el tamaño y las propiedades de la materia a escala manométrica(28). Las aplicaciones de la nanotecnología van en aumento en distintos campos como la ingeniería, química, mecánica, electrónica, médica, etc., favorecen todas las actividades humanas. Una de ellas es la salud, que se presenta como un mercado potencial(29).

2.1.18 Antecedentes históricos de las nanopartículas de plata

De acuerdo a la revisión en la literatura, aun antes de conocerse la existencia de las bacterias, virus y demás microorganismos, y su papel como agentes etiológicos de enfermedades, la plata se utilizaba como agente desinfectante y para el almacenamiento de agua(30). Alejandro Magno en el año 335 a.C. utilizaba instrumentos de plata para almacenar y en las tomas de agua cuando sus ejércitos estaban en expediciones y conquistas. Así como Alejandro

Magno las civilizaciones del mediterráneo y Asia, también utilizaban contenedores de plata para evitar la putrefacción de líquidos, además del uso de hojas de plata para prevenir infecciones en heridas (30).

Las nanopartículas han existido por siglos, algunos ejemplos son las partículas de humo. En algunas civilizaciones antiguas ya se utilizaban por sus propiedades ópticas y medicinales. Las nanopartículas metálicas en particular se pueden citar en la cultura egipcia, la cual empleaba las nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener la salud. La civilización china, además de emplearlas con fines curativos las utilizaba como colorantes inorgánicos en porcelana. Un caso de gran interés es el vaso de Lycurgs, creado por los romanos en el siglo IV d.C. tiene una característica interesante, su color es verde si la luz es reflejada y cambia a rojo si la luz es transmitida a través de él. El análisis de este vaso muestra que está compuesto de una matriz de vidrio que contiene una pequeña cantidad de nanopartículas de oro y plata las cuales son responsables de éste fenómeno.

Aun cuando se tenían antecedentes del uso de nanopartículas, no fue sino hasta 1857 cuando se realiza un estudio sistemático de la síntesis y propiedades de coloides de oro. Y desde esa época hasta la fecha se han logrado grandes avances en el conocimiento de las nanopartículas y se han desarrollado métodos para su síntesis con la finalidad de poder diseñar la forma, tamaño, cubierta, composición, entre otras propiedades y con esto controlar su comportamiento. La modificación del tamaño de los materiales en nanopartículas les confiere un cambio de propiedades según se reduce el tamaño, es decir algunos incrementan su actividad eléctrica y calórica, mejorándola; otros incrementan su resistencia y también pueden presentar diferentes propiedades magnéticas e incluso pueden cambiar de color y reflejo de la luz cuando se modifica su tamaño.

Además presentan una mayor superficie en relación a su masa, propiedad que les confiere una mayor capacidad de interacción con otros materiales y una

mayor reactividad (31). La teoría del germen, gracias a grandes científicos como John Snow, Louis Pasteur, Robert Koch y sus postulados, se demostró esta teoría postuló que eran microorganismos los responsables de algunas enfermedades, Karl Crede, obstetra alemán encontró que al aplicar diluciones de nitrato de plata en forma ocular disminuía la incidencia de infecciones oftálmicas en neonatos de 10.8% a 2%. Debido a esto la aplicación de esta solución de plata se volvió obligatorio a nivel mundial desde Estados Unidos de América, como Europa incluyendo México. También William Halstead, contemporáneo de Karl Creed en el año 1889, que fue el primer jefe de cirugía del hospital John Hopkins utilizó hilo de plata para suturar hernias, esto debido a que encontró que era útil para controlar infecciones postoperación(30). La plata tiene muchas formas farmacéuticas diferentes en las que puede ser aplicada con el mismo fin terapéutico, especialmente ha sido utilizado para el tratamiento de quemaduras.

Moyer y colaboradores en 1965 fueron de los primeros en promover el uso tópico de preparaciones de nitrato de plata al 0.5% en quemaduras. Una de sus principales aportaciones fue que en los primeros 7 meses posteriores al uso de esta solución de plata no se encontró resistencia nueva en 1300 cultivos de heridas(30). Del año 1980 en adelante, se comenzaron a desarrollar telas y tejidos a base de plata para apósitos a utilizarse en heridas y quemaduras.

En este tiempo se comenzó a investigar las propiedades antimicrobianas del nylon cubierto de plata, y se demostró su efectividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Ya para el siglo XXI, el uso de la plata en medicina ha visto sus horizontes extendidos más allá de las quemaduras y heridas, se ha comenzado a utilizar en cateteres, tubos endotraqueales y sondas recubiertas con plata para evitar infecciones nosocomiales, ya que en los catéteres se ha encontrado una disminución hasta 5 veces menor comparados con los de uso habitual(30).

2.1.19 Nanopartículas

Gracias al gran desarrollo científico que se vio en el siglo pasado y que ha continuado hasta nuestros días, se han podido desarrollar nuevas técnicas de fabricación y manufactura, y por lo tanto se han descubierto e ingeniado nuevas aplicaciones que se le pueden dar a materiales ya conocidos desde tiempos inmemorables. Por ejemplo, la plata se utilizaba desde el año 1000 a.C. para potabilizar el agua y el nitrato de plata en forma sólida ya era utilizado para tratar diversas afecciones. Se tienen datos de que en el siglo XIX se utilizaba la plata para remover el tejido de granulación y estimular cicatrización del tejido(32).

Producto de este avance tecnológico es el desarrollo de una nueva disciplina científica conocida como Nanotecnología, que se ocupa de estudiar lo que se encuentra a escala nano, es decir, en una escala de 1×10^{-9} m, para poner esto en contexto un nanómetro sería lo mismo que dividir un metro en mil millones de segmentos iguales. Por lo tanto, cuando hablamos de nanopartículas nos referimos a entidades que tienen un tamaño en este orden dimensional, se pueden encontrar muchas definiciones de lo que es una nanopartícula dependiendo del autor consultado, la mayoría coinciden en que para clasificar una partícula como nanopartícula una de sus dimensiones tiene que ser menor a 100 nanómetros, si bien en lo que varían puede ser en el número de dimensiones que tienen que oscilar entre 1 y 100 nanómetros para ser clasificadas como tal, pudiendo ser una dimensión (32–34), o tres(35), las que se encuentren en este intervalo de tamaño. Sin tomar en cuenta la variedad de compuestos y elementos de los cuales pueden estar elaboradas las partículas y debido a la gran diversidad en (dimensiones y formas de fabricar cada una se debe caracterizar o tomar en cuenta como una entidad diferente, para su análisis y caracterización fisicoquímica, ya que potencialmente pudiera alterar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Con los cambios en tu tamaño y composición (35,36).

Varias formas químicas de plata (sulfadiazina argéntica, nitrato de plata, acetato de plata y otras sales) fueron utilizadas en el tratamiento de enfermedades mentales, epilepsia, adicción a la nicotina, gastroenteritis y enfermedades venéreas como la gonorrea y sífilis(37). La mayoría de los métodos de síntesis química de nanopartículas de plata se basan en reacciones de reducción de sales metálicas de plata(38).

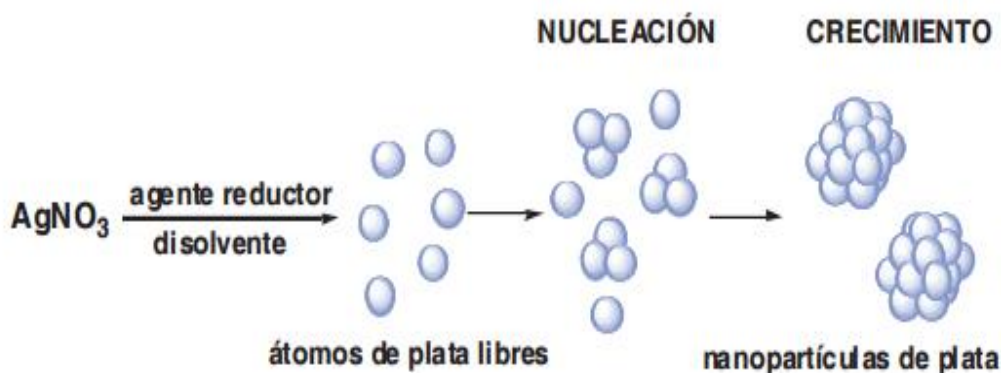


Figura 3. Producción de nanopartículas de plata.

Se presenta el mecanismo de formación para la producción de nanopartículas de plata a partir de la reducción química de la disolución de la sal AgNO_3 . Tomada de Gomez y colaboradores (39).

2.1.20 Mecanismos de acción antibacteriana de las NPs-Ag

La plata ha sido utilizada desde la antigüedad, principalmente para la desinfección del agua. A partir del siglo XVII se describe como producto medicinal y a finales del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En la década de los 20's la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica como agentes antibacterianos. Las nanopartículas de plata se pueden adherir a la membrana celular, alterando la permeabilidad celular y funciones respiratorias de la célula, no solo interactúan con la superficie de la membrana, si no que

penetran al interior de la bacteria. El efecto bactericida de las NPs-Ag puede ser un sinergismo de los siguientes mecanismos: 1) el material estabilizante y las NPs-Ag desestabilizan la membrana bacteriana y alteran su permeabilidad, provocando un daño irreversible. 2) Las NPs-Ag se internalizan en la bacteria con facilidad debido a su tamaño diminuto. 3) Las NPs-Ag en su trayecto van liberando iones de plata que funcionan como un reservorio del agente bactericida alterando el citoplasma. 4) Los iones de plata enlazan con grupos sulfhidrilos de biomoléculas y con compuestos fosforosulfurados como el ADN inactivando a la bacteria. Estos mecanismos pueden darse simultáneamente (39).

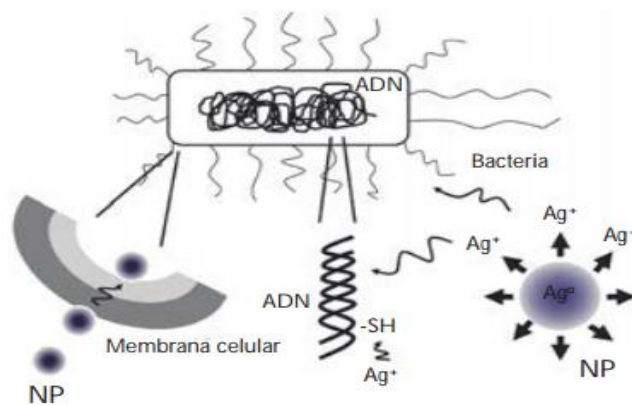


Figura 4. Mecanismos de acción antibacteriana de las nanopartículas de plata. Tomada de Elechiguerra y colaboradores (40).

En el 2005, Morones y colaboradores demostraron el efecto bactericida de las NPs-Ag (1 y 10 nm) sobre *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella typhi*(19). En ese mismo año, Elechiguerra y colaboradores evaluaron el efecto de las NPs-Ag contra el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y demostraron su interacción con el virus posiblemente por interacción con los residuos de sulfuro de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral, lo que impide su unión con la célula huésped (40).

En el año 2010 Lara y colaboradores investigaron el posible mecanismo de acción de las NPs-Ag en contra del VIH-1, y sus resultados fueron similares a los obtenidos por Elechiguerra y además concluyeron que debido a que las nanopartículas actúan en contra del virus en una etapa temprana del ciclo de replicación podrían evitar el desarrollo de resistencia del virus(40). El efecto bactericida de las NPs-Ag ha sido demostrado en diversos microorganismos como *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Vibrio colerae* observando una inhibición en la reproducción bacteriana penetración de las nanopartículas al núcleo y donde destruyen el ADN(41).

En el 2009 Asha Rani y colaboradores expusieron fibroblastos de pulmón humano y células de glioblastoma de origen humano a NPs-Ag, y observaron endocitosis de las nanopartículas y su presencia dentro de los núcleos y citoplasma de ambos tipos celulares en los cuales se observó inestabilidad cromosómica y mitótica, sin embargo las células de pulmón se recuperaron mientras que las células de glioblastoma cesaron su proliferación. Por lo anterior sugirieron que las células cancerosas podían ser susceptibles al daño por el estrés producido por las NPs-Ag(28). En el 2009 Ruden S. y colaboradores expusieron cultivos de diversos microorganismos a combinaciones de antimicrobianos con NPs-Ag y observaron efectos sinérgicos en la actividad antimicrobiana, en algunos casos la combinación mejoró la actividad intrínseca del antimicrobiano y en otros mejoró la permeabilidad hacia la membrana del microorganismo(42).

En un estudio realizado en el 2009 por Sheikpranbabu y colaboradores en células epiteliales de retina porcina expuestas a NPs-Ag, se demostró la inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la interleucina 1-beta que inducen la permeabilidad por la activación de la vía de cinasas. Por lo anterior sugieren su potencial terapéutico para enfermedades oculares como la

retinopatía diabética(43). Colleen M y colaboradores evaluaron el efecto de las NPs-Ag en contra de *Pseudomona aeruginosa* y la toxicidad en células de epiteliales de córnea, los resultados mostraron que las nanopartículas tuvieron actividad antimicrobiana y que pueden ser una estrategia para evitar la colonización de bacterias que puede ocurrir con el uso prolongado de lentes de contacto (44).

2.1.21 Aplicaciones y uso de las nanopartículas

Aunque las partículas de plata son el objeto de estudio en esta tesis y las más utilizadas en medicina en nuestros días, teniendo la mayor diversidad de aplicaciones, no son las únicas nanopartículas que existen actualmente en investigación y en el mercado. Actualmente uno de los usos que más ha tenido impacto en el área del diagnóstico clínico, es la aplicación de las nanopartículas de oro, para realizar inmunodiagnóstico a través de su acoplamiento con anticuerpos específicos para diferentes antígenos; otra de sus aplicaciones es como un agente denso en electrones en microscopia electrónica que facilite la observación de blancos específicos. También se pueden utilizar también como vehículos para medicamentos que potencialmente pudieran causar daño si se distribuyeran a otras partes del organismo, como es el caso del uso de agente citotóxicos empleados en el tratamiento del cáncer. Otro uso es en la terapia fototérmica, en donde nanopartículas con especificidad para un tejido absorben luz, liberando energía térmica calentando el área y destruyendo tumores. Se han utilizado también nanopartículas con propiedades magnéticas, como las elaboradas a partir de Manganeso u otros elementos, como agentes de contraste en las resonancias magnéticas nucleares en imagenología por su carácter no invasivo(36).

2.1.22 Importancia de las nanopartículas de plata en la medicina moderna

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los principales usos de la plata en el ámbito de la salud fue como agente potabilizador, por sus propiedades antimicrobianas. Aunque hasta hoy no se conoce bien del todo el mecanismo, se sabe que tiene que ver con la interacción entre las partículas de plata y enzimas respiratorias inhibiendo este proceso. Otra posible explicación es la manera en que la plata interactúa con el ADN, se sabe que para que la replicación se lleve a cabo el ADN debe estar relajado pero la plata actúa sobre esta biomolécula regresándola a un estado de condensación y llevando a la muerte celular, por lo tanto la plata actúa como agente antimicrobiano sobre las células procariotas, y se sabe que es altamente tóxico en bacterias tanto Gram positivas como negativas. Por ellos el uso de partículas de plata resulta de utilidad para el tratamiento de alguna infección que represente un problema de salud pública. Desde el descubrimiento de la penicilina, se han introducido al mercado una gran variedad de familias de compuestos bioquímicos con actividad antimicrobiana para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Una de las consecuencias de esto es el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de los agentes etiológicos de estas enfermedades, situación que se ha convertido en una preocupación grande para la comunidad médica actualmente. De aquí una de las aplicaciones más conocidas de las nanopartículas de plata, en su uso como antimicrobiano, ya que al ser un medicamento que ha tenido una aplicación clínica muy limitada hasta el momento, la diseminación de un mecanismo de resistencia a su efecto microbicida no es tan amplia como la resistencia que se ha identificado para la mayoría de los antibióticos que existen actualmente en el mercado (32,45). Una aplicación importante de las nanopartículas de plata es como agente desinfectante, como ya se expuso estas tienen un efecto tóxico sobre las células bacterianas, de ahí su importancia como desinfectante en superficies o ambientes donde se manejen alimentos, dado a que aparte de tener efecto sobre

las bacterias presentes en las superficies y ambiente, se ha descrito también un efecto antimicótico de los iones de plata, que se sabe se liberan de las nanopartículas de plata cuando se encuentran en solución(46). Posiblemente las nanopartículas de plata sean uno de los pocos agentes antimicrobianos de amplio espectro, ya se mencionó su efecto antibacteriano en los dos tipos de bacterias más amplios que se conocen, en donde caen la mayoría de los patógenos bacterianos para los seres humanos, así como un efecto antifúngico, pero dependiendo del tamaño de la nanopartícula de plata que se esté utilizando se ha observado que también tienen actividad sobre una gran variedad de viriones, confiriéndole también un efecto antiviral.

La acción de las partículas de plata sobre la partícula viral, depende del contenido de aminoácidos con los que pueda interactuar, esto por la capacidad de la plata de unirse covalentemente a los grupos tiol de la cisteína y metionina en las proteínas de cápside o proteínas de superficie del virión, impidiendo por diversos mecanismos su interacción con las células del hospedero y su proliferación una vez que han infectado las células del organismo. Bloqueando así el ciclo lítico de la infección viral. Este efecto ha sido demostrado y se ha utilizado en contra de virus como el de la inmunodeficiencia humana, el de la hepatitis B, influenza, herpes simple, entre otros(32). Una aplicación más de estas nanopartículas de relevancia para la medicina moderna es su inclusión en apósitos para heridas, estas partículas ejercen acciones diferentes sobre tejidos sanos y tejidos con algún trauma mecánico o térmico. Una ventaja de usar nanopartículas en lugar de los tratamientos con plata más habituales, como el de sulfadiazina de plata para el tratamiento de quemaduras, es la disminución del tiempo que le toma para sanar, a una herida en la cual fue aplicada la plata en forma de nanopartículas, esto se explica por la capacidad que tienen estas partículas de regular la liberación de citocinas y por ende regulando la respuesta inflamatoria del organismo hacia el trauma sufrido (47–49).

La desventaja del uso sistémico o tópico de la plata en pacientes que se ha observado cuando se les administra una forma farmacéutica de plata, es la aparición de un fenómeno conocido como argiria, que es transicional y depende de la dosis, esta desventaja es en su mayoría cosmética, caracterizada por la aparición de una coloración azul grisácea en su mayoría en labios y en la piel expuestas a la luz solar(50).

2.1.23 Antecedentes de Nanopartículas de plata y *Mycobacterium tuberculosis*

Algunos investigadores como Kreytsberg y colaboradores, sugieren que uno de los mecanismos de acción de las nanopartículas de plata es la adsorción a la superficie bacteriana de carga negativa, ya que los iones liberados de las nanopartículas de plata tendrían una carga positiva. La plata tiene propiedades catalíticas y es capaz de activar la cascada de oxígeno que conlleva la destrucción del citoplasma bacteriano. Los datos disponibles a este grupo de autores les sugieren que uno de estos mecanismos se debe a interacción con proteoglicanos, interrumpiendo la manera en que el oxígeno difunde al interior de la célula bacteriana. Recordemos que *Mycobacterium tuberculosis* es una bacteria aerobia estricta y requiere de oxígeno para sus actividades metabólicas (51).

De acuerdo a los resultados de este grupo de investigación se encontró que a una concentración de 5 mg/L se observa inhibición completa del crecimiento micobacteriano tres y media veces más que cuando se exponen a una de 25 mg/L y siete veces más que cuando son expuestas a una concentración de 50 mg/L. Observando que la concentración óptima para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* oscila entre 2.5 y 5 mg/L(51).

Uno de los experimentos realizados por este grupo utilizó preparaciones de nanopartículas de plata en combinación con algunos de los fármacos

administrados como de primera línea a pacientes con la forma pulmonar de tuberculosis. Estas preparaciones fueron administradas en ratas previamente infectadas con la bacteria. Se encontró que 100% del grupo control falleció mientras que sobrevivieron un 95% de las ratas a las que se les administraron nanopartículas de plata con isoniazida y un 35% a las que se les administraron nanopartículas de plata solas(51). El utilizar nanopartículas de plata como una alternativa terapéutica toma importancia en el tratamiento de cepas de *M. tuberculosis* MDR-TB y XDR-TB.

Debido a los mecanismos propuestos en los párrafos anteriores no solo podrían ser aprovechadas por sus propiedades antibacteriales por si solas, si no que por su acción debilitan la pared celular que como se sabe es mucho más gruesa en este género bacteriano y facilitarían la entrada de los medicamentos antifímicos teniendo un efecto sinérgico con estos(52).

En el año 2014 Larimer y colaboradores reportaron el aislamiento de una cepa de *Mycobacterium smegmatis* con la capacidad de resistir los efector antimicobacterianos de las nanopartículas de plata. Estas cepas resistentes también demostraron resistencia al fármaco isoniazida, proponiendo que la mutación responsable de la resistencia a las nanopartículas está ligada a cambios en el transporte a través de la membrana. Hace hincapié en que introducir estas nanopartículas en cantidad suficiente al medio ambiente pudiera en teoría inducir fenómenos de resistencia que pudieran extrapolarse a resistencia a antibióticos comunes(53).

En el año 2010 Seth y colaboradores realizaron ensayos de inhibición utilizando cepas multidrogorresistentes de pacientes en la India. Donde expusieron a estas bacterias en concentraciones crecientes de nanopartículas de plata, agregando 8, 20 y 40 µg en 5 mL (1.6, 5 y 8 µg/mL) de caldo Middlebrook. Encontrando inhibición completa a una concentración de 8 µg/mL en las 4 cepas utilizadas, con inhibición parcial en la cepa de referencia H37Rv. Reportaron

inhibición a esta concentración en cepas que resultaron resistentes a rifampicina e isoniazida a 2 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Mediante microscopía electrónica mostraron el efecto de las nanopartículas de plata sobre la célula bacteriana ilustradas aquí en la figura 4(54).

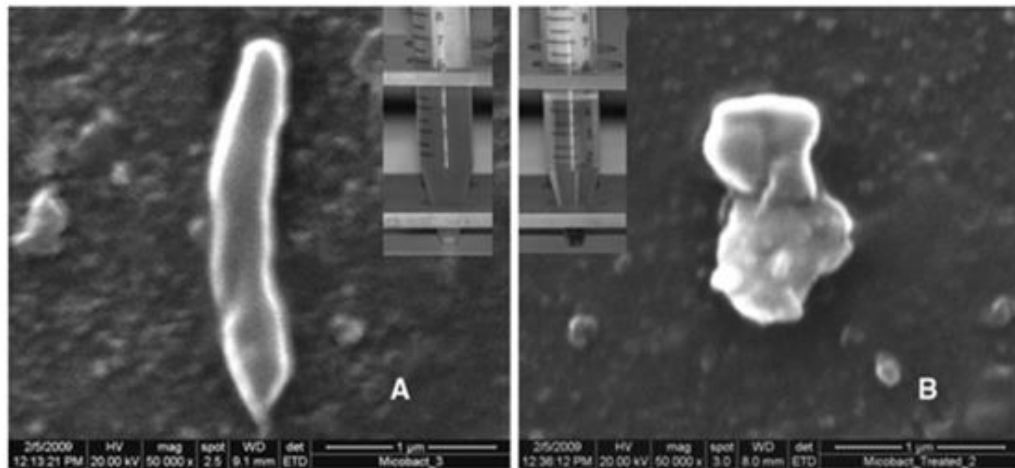


Figura 5. Mecanismos de acción antifímico de las nanopartículas de plata. Se muestra en el ejemplo A, el control de TB no expuesto a Ag-NPs y en el ejemplo B, se muestra la TB expuesta a Ag-NPs. Tomada de Sekar y colaboradores (54).

2.2 Justificación y uso de los resultados

Esta investigación busca evaluar la viabilidad de un método de diagnóstico molecular para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual hace mucho más rápida la identificación del patógeno, ya que en 6 horas potencialmente pudiera tener el paciente un resultado, comparado con el tiempo de semanas que puede demorar el resultado de un cultivo. Añadido a esto se planteó el fenómeno de farmacoresistencia el cual está presente y es cada día más habitual encontrar, por lo que buscamos con esta investigación determinar la concentración mínima inhibitoria que presentan las NPs-Ag por su potencial a ser utilizadas en el tratamiento de pacientes que presenten esta enfermedad. Por lo anterior, existe una gran necesidad de la industria farmacéutica en mejorar los tratamientos farmacológicos como la modificación de moléculas o compuestos para reducir la toxicidad, el costo y la seguridad en el tratamiento. La nanotecnología sugiere una posible solución al problema del desarrollo de nuevos fármacos debido a las características relacionadas con el tamaño, la estructura y el recubrimiento de las NPs-Ag, de esta forma realizar un uso clínico para mitigar el problema de tuberculosis. La valoración preliminar del efecto de las nanopartículas de plata contra la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* pueden tener actividad farmacológica para la generación de beneficios sociales y económicos para la comunidad a través del acercamiento a nuevas alternativas terapéuticas y diagnosticas en nuestra comunidad.

2.3 Planteamiento del problema

El reporte de la OMS del 2015 nos dice que la tuberculosis sigue siendo una de las enfermedades transmisibles que causa un problema de salud a nivel global. De acuerdo a sus cifras de 2014, un total de 9.6 millones de personas adquirieron tuberculosis (5.4 millones de hombres, 3.2 millones de mujeres, y 1 millón de niños), mientras que un millón y medio de personas murieron de esta enfermedad, de los cuales cuatrocientos mil eran VIH positivos. Estos datos, en la opinión de la OMS, siguen siendo inaceptables puesto que la mayoría de las muertes atribuidas a esta enfermedad pueden ser prevenidas con el diagnóstico y el tratamiento adecuado. La utilidad por seguir obteniendo conocimiento acerca del diagnóstico molecular y de las propiedades anti-tuberculosis de las NPs-Ag es de gran importancia, por la aparición de nuevas y más agresivas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, así como por la resistencia a los antibióticos que presenta.

2.4 Hipótesis

Hipótesis 1

Nuestro método diagnóstico molecular resultara efectivo en la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.

Hipótesis 2

Las nanopartículas de plata presentan propiedades anti-tuberculosis frente a la cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

2.5 Objetivos

2.5.1 Objetivos Generales

- Estandarizar la reacción de PCR utilizada para amplificar la secuencia IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Determinar si las NPs-Ag presentan actividad antituberculosis.

2.5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar por espectroscopia UV-Visible y TEM las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata.
- Estandarizar la técnica para realizar los medios L.J. y cultivar las diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Estandarizar las diferentes técnicas de biología molecular para la extracción de ADN y amplificación por PCR de la secuencia de IS6110 de las diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Determinar la potencial actividad antituberculosis de las nanopartículas de plata poniéndolas en contacto con la cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes concentraciones.

Capítulo III

3.1 Metodología

3.1.1 Descontaminación Petroff

En primera instancia se revisó que los frascos o contenedores con las muestras biológicas se encontraran debidamente rotulados con el nombre del paciente, apellido paterno y materno. Posterior a esto se corroboró, en el caso de la muestra de esputo, que dicha muestra fuera realmente flema o esputo y no saliva, y en las muestras de aspiración de ganglio linfático, que se encontraran en condiciones óptimas. Cuando hubo muestras seriadas se descontaminaron en un solo tubo cónico debidamente rotulado con el nombre del paciente. Teniendo esto en cuenta, se centrifugó solo la cantidad de muestras para las que tiene capacidad el equipo con el que se cuenta en el laboratorio, ya que el tiempo de contacto con el descontaminante debe ser mínimo (30 minutos).

El siguiente procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar y con el equipo de protección personal. Se abrieron los envases con el esputo, se agregó aproximadamente el mismo volumen de NaOH 4% y mezcló con un movimiento suave y rotatorio; en caso de ser muestras múltiples del mismo paciente y del mismo tipo, fue necesario transvasar lo contenido en el primer vaso al segundo y subsecuentemente al tercero, dependiendo del número de muestras. Se siguió agitando por movimiento rotario en cada pase buscando que el esputo se disgregara de las paredes del contenedor. Las muestras con el NaOH se pasaron a un tubo cónico de 15 mL y en caso de que el volumen fuera inferior a los 15 mL se terminó de llenar con la solución de NaOH 4%, se cerraron bien y se mezclaron por inversión.

Este procedimiento se realizó muestra por muestra y asegurándose que no se abrieran al mismo tiempo contenedores de muestras que provinieran de pacientes distintos al mismo tiempo. Después se debió dejar actuar el descontaminante por lo menos 5 minutos, tomando en cuenta el tiempo máximo y que el primer tubo preparado no pasara del límite de tiempo. Los tubos se pasaron a la centrifuga, verificando que los pares de tubo tuvieran un volumen similar y, en caso de haber estado trabajando con un número impar de muestras, se puso un tubo cónico con el mismo volumen de agua para balancear el tubo que queda como impar. Se centrifugó a 3000 RPM (revoluciones por minuto) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiraron los tubos verificando que no hubiera ocurrido algún derrame; en el caso de que se hubiera presentado uno, el material debió ser autoclavado, los tubos pasados de nuevo a la campana de flujo laminar con ayuda de una gradilla, con mucho cuidado de no resuspender el sedimento.

Se descartó el sobrenadante de los tubos centrifugados para evitar que se perdiera el sedimento, y posteriormente se retiró el sobrenadante con una pipeta desechable de plástico. Se agregó a los tubos con el sobrenadante solución amortiguadora de fosfatos hasta la marca de 15 mL, se cerró bien y mezcló por inversión. Una vez que se realizó este procedimiento para todas las muestras, se agitaron en vortex. Se centrifugó durante 15 minutos a 3000 RPM a temperatura ambiente. Se dejó que se detuviera completamente la centrífuga y que los tubos reposaran durante 5 minutos para evitar la liberación de aerosoles. El siguiente paso consistió en separar el sobrenadante de igual manera que se realizó anteriormente. Se agregó amortiguador de fosfatos hasta 5 mL o cubrir la muestra. Se cerró el tubo y resuspendió el sedimento por inversión o golpeteo cuidadosamente. En caso de realizar otro procedimiento inmediatamente después, la muestra ya descontaminada se debió mantener a temperatura ambiente; en caso de que se fuera a procesar otro día, fue necesario mantenerla dentro el tubo cónico en refrigeración.

3.1.2 Tinción de Ziehl-Neelsen en frío y conteo de BAAR

Se realizó un frotis con la muestra obtenida por descontaminación, se dejó secar dentro de la campana y se fijó con metanol para evitar la formación de aerosoles. Una vez seco el frotis, se colocó sobre el dispositivo para tinciones conectado a un contenedor rígido de color rojo para RPBI. Con una pipeta de plástico desechable se cubrió el frotis con carbol fucsina fenicada y se reposó durante 20 minutos. Se enjuagó con agua destilada con ayuda de una piseta. A continuación se pasó a la decoloración con alcohol ácido agregando por goteo, tratando de que el tiempo de contacto no rebasara 15 segundos, para frotis muy gruesos se puede extender un poco este tiempo hasta que el alcohol ácido se dejara de pintar del color de la carbol fucsina. Se lavó de nuevo con agua destilada con un flujo que cayera en la parte esmerilada del portaobjetos para evitar que se dañara el frotis con un flujo directo a la muestra. Después se tiñó con el azul de metileno como colorante de contraste dejando en contacto dos minutos y lavando de igual manera con agua destilada. Se colocó en posición vertical para permitir que fuera más fácil que se secara. Una vez que se secó el frotis, se observó al microscopio óptico, primero a x40 para buscar las zonas con mayor densidad de material y se pasó a revisar 100 campos a x100 con el objetivo de inmersión, reportando la cantidad de BAAR (Bacilos ácido-alcohol resistentes) en el frotis como negativo, escaso, moderado y abundante dependiendo de la apreciación del analista. Los BAAR se visualizan como bastoncillos rojo magenta sobre un campo azul.

3.1.3 Elaboración de Medio de cultivo Loweinstein-Jensen

Se le elaboro el medio a base de huevo Loweinstein-Jensen de acuerdo a las instrucciones del fabricante de la base. Se suspendieron 37.4 gramos del polvo base en 600 mL de agua purificada con 12 mL de glicerol. Se mezcló con agitador magnético hasta homogenizar al mismo tiempo que se calentó hasta

ebullición. Se esterilizo en autoclave por 15 minutos a 121°C y dejo enfriar. Se preparó un litro de suspensión de huevo de gallina, libre de antibiótico, con el cascaron previamente limpiado con etanol. La suspensión se homogeniza evitando la formación de burbujas de aire. Se mezcla el medio preparado previamente con la suspensión de huevo evitando la formación de burbujas. Esta mezcla se distribuye en tubos de ensayo de fondo plano con tapa de rosca previamente esterilizados en condiciones asépticas. Se coagularon los tubos a 85°C durante 45 minutos en posición inclinada formando un pico de flauta.

3.1.4 Cultivo de *Mycobacterium spp.* en medio Loweinstein-Jensen

Las muestras de esputo que salieron positivas en la búsqueda de BAAR así como las muestras con sospecha de tuberculosis extrapulmonar se cultivaron. Se tomó una asada de la muestra descontaminada, en caso de haber estado refrigerada se espero hasta que la muestra haya llegado a temperatura ambiente, entonces se mezcló por inversión y dejó reposar, se inoculó la muestra sobre el pico de flauta del tubo con medio Loweinstein-Jensen, el cual ya debía haber estado a temperatura ambiente y debidamente rotulado con los datos del paciente. Se metió en la incubadora a temperatura de 37° C, dejándolo de 2 a 4 semanas, revisando los cultivos semanalmente buscando crecimiento. Generalmente se presentó crecimiento a las 2 semanas en el caso de los cultivos positivos, pero se descartó crecimiento hasta las 4 semanas de incubación. Las colonias, dependiendo de la especie, varían en su morfología, ya sean rugosas con pigmentaciones amarillentas o butirosas y lisas con pigmentación amarilla.

3.1.5 Extracción de ADN de *Mycobacterium spp.*

Una vez que se tuvo el cultivo de *Mycobacterium spp.*, se tomaron las colonias de la superficie del tubo con un asa, tratando en mayor medida de evitar traer consigo el medio de cultivo y cosechar únicamente las colonias presentes

en el medio. Estas se colocaron en un tubo de tapón hermético debidamente rotulado con los datos del paciente, este recipiente ya debe tener 500 µL de solución PBS, en caso de que no se hubiera realizado la extracción el mismo día de la cosecha, se congelaron las muestras. Para realizar la extracción se comenzó por poner nuestras células de tuberculosis a 95°C en un termobloque durante 5 minutos, una vez concluido este tiempo se pasó a centrifugar en ultracentrífuga durante 2 minutos a 12,220 RPM, cuidando colocar los tubos cónicos pequeños con su par en volumen para balancear. El sobrenadante de este centrifugado se decantó con la ayuda de una micropipeta de 1000µL. Se resuspendió el precipitado celular o <<pellet>> en 500µL de solución PBS. Posteriormente se agregó 50µL de Lisozima y resuspendió el pellet con ayuda de un vortex. Estos resuspendidos celulares se incubaron durante una hora a 37° C. Pasada la hora se les agregó a los tubos 70µL de SDS al 10% y se les pasó por el vortex durante 10 segundos, a continuación se les agregó proteinasa K 3µL y se pasaron de nuevo por el vortex durante otros 10 segundos, estos tubos se incubaron en termobloque a 65°C durante 15 minutos. Para realizar la extracción del ADN se comenzó agregando 600µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico 25:24:1 a cada tubo con su respectiva muestra y poniendo en vortex aproximadamente 10 segundos en dos ocasiones, en esta mezcla se observó cómo se realiza un cambio entre ser transparente e incolora a ser una solución blanca opaca; un vez que se logró esto, se centrifugó a 13,000 RPM durante 2 minutos. Después de la centrifugación se pasaron nuevamente los tubos a la campana con mucho cuidado de no agitarlos para que no se mezclaran las fases.

Se observó una interface blanca entre la fase orgánica inferior y la fase acuosa superior, se tomó con mucho cuidado la fase acuosa superior con una micropipeta y se vertió en otro tubo rotulado, sin tocar la interface blanca. Se repitió el procedimiento de este párrafo para realizar una reextracción. A los tubos con la fase acuosa se les agregó 400µL de cloroformo, posteriormente se pasaron por vortex igual que en el paso anterior y se centrifugó durante 2 minutos

a 13,000 RPM y se separó de nuevo la fase acuosa superior de la misma manera. Se resuspendió el pellet en 700µL de alcohol etílico absoluto, el cual debe estar a -20°C; se pasó a centrifugar el tubo durante 8 minutos a 14,000 RPM, de igual manera se retiró el sobrenadante con una micropipeta para posteriormente repetir el paso anterior con las mismas cantidades, solo que con alcohol etílico al 75%. Una vez terminada la centrifugación y que se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 100µL de agua esterilizada y filtrada o agua grado biología molecular.

3.1.6 PCR punto final para amplificación de la secuencia IS6110

Por muestra se preparó una reacción de PCR con los reactivos y cantidades que aparecen en la siguiente tabla:

Tabla III. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR.

Reactivo	Cantidad (µL)
Agua grado molecular	7
dNTPs	0.5
Oligonucleotido Sentido (1:20)	0.5
Oligonucleotido Antisentido (1:20)	0.5
Amortiguador con Mg 20x	2
Muestra de ADN (aproximadamente 50ng)	1
ADNpol	1

Representación de las diferentes concentraciones para realizar la amplificación de la secuencia IS6110.

Así se obtuvo un volumen final de reacción de 12.5µL. El olinucleotido sentido tiene la secuencia 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3' y el olinucleotido antisentido tiene la secuencia 5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3'(16,55). Estas mezclas de reacción tanto la cepa de referencia, como las cepas problema se sometieron a los siguientes ciclos de PCR.

Tabla IV. Protocolo de PCR utilizada para la amplificación de la secuencia IS6110.

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Numero de ciclos
Desnaturalización	95	300	1 Ciclo
Desnaturalización	95	30	35 Ciclos
Hibridación	58	30	
Extensión	72	30	
Extensión	72	300	1 Ciclo

Se presentan las diferentes de fase temperatura de desnaturalización, hibridación y extensión para la reacción de PCR. *Termociclador utilizado fue el equipo MultiGeneMini

Los productos de PCR se revelaron en gel de Agarosa buscando la presencia de una banda de 125pb.

3.1.7 Determinación de actividad antituberculosis de NPs-Ag

Se prepararon los tubos indicadores de 4 mL, se les añadió 0.5 mL del OADC de manera aséptica en una campana de flujo laminar. A los cuales se les añadió 0.5 mL de suspensión bacteriana de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv al 0.5 de la escala de McFarland. La cual se preparó tomando colonias de la bacteria de medio Loweinstein-Jensen pasándolas a tubo cónico de 50 mL, el cual tiene 20 mL de PBS filtrado y perlas para desfibrinar. Esta suspensión se

homogenizó utilizando el vortex entre 2 a 5 minutos. Se corroboró y ajustó al 0.5 de la escala McFarland utilizando el estándar del nefelómetro. Esta suspensión se resembro en un tubo con el mismo medio de cultivo. Los tubos problema se prepararon como en el primer procedimiento con diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. Teniendo un volumen final de 5mL para esto se ajusta la concentración de los tubos preparados quitando el equivalente de medio a lo que se agregó de nanopartículas de plata de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla V. Determinación de la CMI y CMB para evaluar el efecto antituberculosis de NPs-Ag.

Nomenclatura en tubos	Concentración final	Volumen mL de solución stock (20% Nano partículas)	Volumen µL de solución stock (20% Nano partículas)	Concentración final de Nano partículas de plata (mg/ml)
x.1	10%	2.5	2500	100
x.2	1%	0.25	250	10
x.3	0.1%	0.025	25	1
x.4	0.01%	0.0025	2.5	0.1
x.5	0.001%	0.00025	0.25	0.01

Se presentan las diferentes concentraciones con las que se determinó el efecto de CIM de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* a las nanopartículas de plata.

Los tubos se prepararon en tres series, la primera se preparó como un control de crecimiento en el cual las nanopartículas de plata fueron sustituidas por PBS y solo se agregó el inóculo de *M. tuberculosis*. La siguiente serie fue de tubos problema en los cuales se inóculo con la cepa de *M. tuberculosis* y las nanopartículas de plata a las diferentes concentraciones. La siguiente serie fue

de solamente de las nanopartículas de plata a las diferentes diluciones con el inóculo de *M. tuberculosis* reemplazado por PBS con la finalidad de tener un punto de referencia para la turbidez que presenten los tubos con crecimiento positivo. Se determinará la CMI basándonos en la concentración de nanopartículas de plata más pequeña a la cual no se observe desarrollo de *M. tuberculosis*. A la semana de estar expuestas las bacterias a las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata se sembraron en medio de cultivo Loweinstein-Jensen para determinar la CMB de estas nanopartículas sobre la bacteria. Como controles adicionales a los de nanopartículas de plata, se preparó un tubo control de nuestra cepa sin nanopartículas de plata, y un tubo control negativo, que es un tubo indicador sin abrir. Se tomará como CMB a la concentración en la cual la cepa de *M. tuberculosis* no pueda volver a desarrollar colonias en el medio Loweinstein-Jensen después de estar expuestas una semana a las nanopartículas de plata.

3.1.8. Caracterización de las nanopartículas de plata

La caracterización de las nanopartículas de plata, técnicas de espectroscopia en el rango de ultravioleta y espectro visible, así como la microscopía electrónica fue llevada a cabo en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con sede en la ciudad de Ensenada, Baja California.

CAPITULO IV

4. Resultados

4.1. Caracterización de las nanopartículas de plata

Espectro UV-vis para las nanopartículas de plata Argovit™ a diferentes concentraciones, en la figura 6 se observan picos característicos a 420 nm.

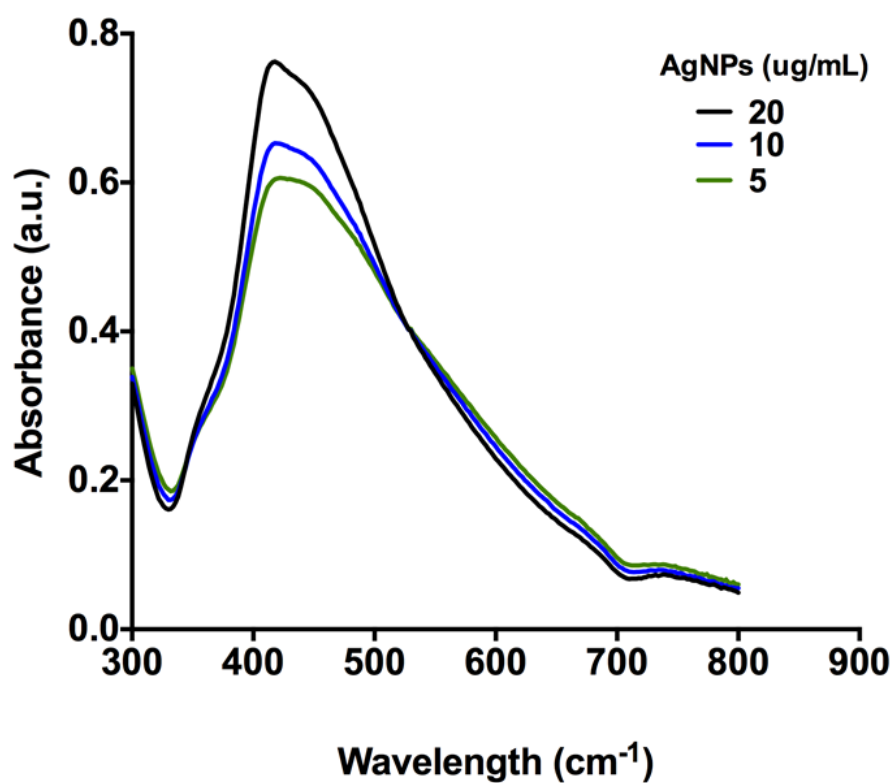


Figura 6. Caracterización de nanopartículas de plata por espectrofotometría UV-VIS. Espectro de absorción para las nanopartículas de plata Argovit™ diluidas en agua desionizada. Las concentraciones de plata metálica se dan en µg/ml. Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores (56).

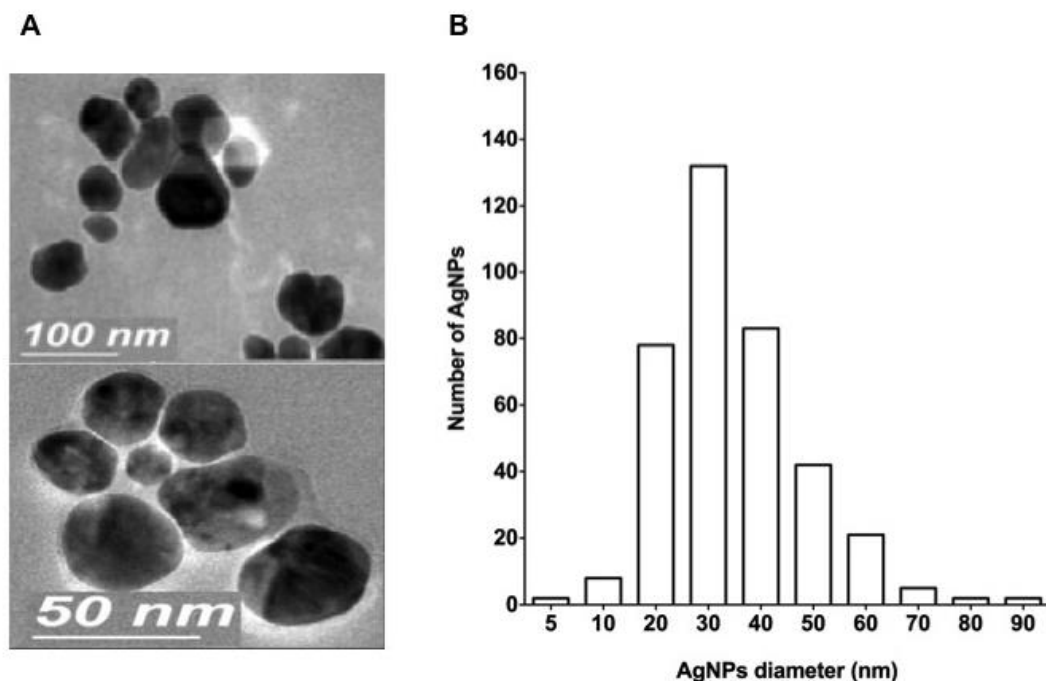


Figura 7. (A) Determinación del tamaño de las nanopartículas de plata mediante microscopía electrónica de transmisión. (B) Distribución de tamaño de las nanopartículas de plata en la formulación de Argovit™. Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores (55).

Las nanopartículas de plata Argovit™ se sometieron a análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 7 en la parte A se observan las nanopartículas que presentan una forma predominantemente esferoidal con un diámetro de alrededor de $35\text{nm} \pm 15$. En la parte B se muestra un histograma con el ancho de distribución de los diámetros de las nanopartículas de plata medidas para determinar el diámetro promedio.

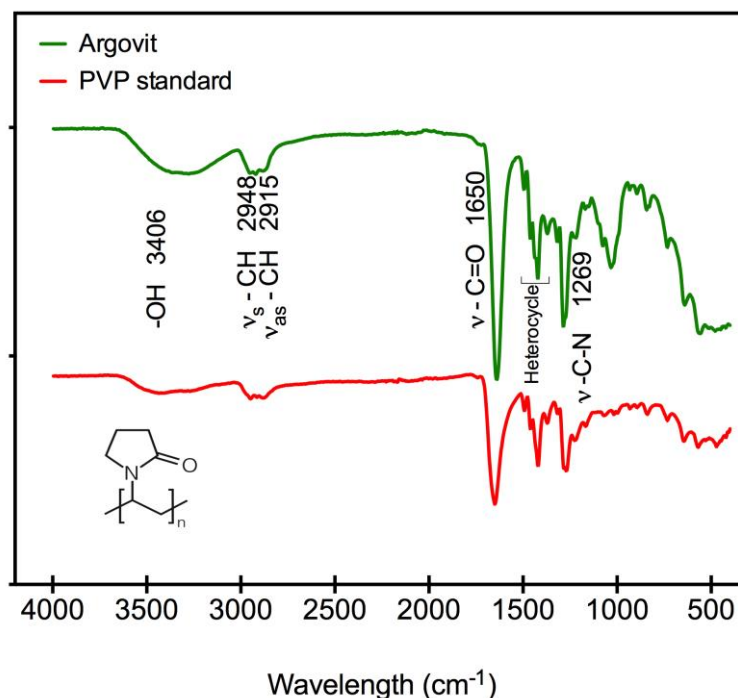


Figura 8. Caracterización de nanopartículas de plata mediante FTIR. Espectro de ATR-FTIR de las nanopartículas de plata Argovit™ (verde). Comparándolas con un estándar de polivinilpirrolidona (en rojo). Tomada de Juárez-Moreno y colaboradores. (55).

En la figura 8 Se muestra la espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizando reflectancia total atenuada (ATR). De las nanopartículas de plata Argovit™ y un estándar de polivinilpirrolidona, esto con la intención de demostrar que las partículas cumplen con las especificaciones del fabricante en cuanto a su descubrimiento. Se observan los mismos picos del heterociclo de la PVP entre el estándar y las nanopartículas. Este recubrimiento es importante para mantener constante el tamaño de la nanopartícula, la PVP es un polímero con compatibilidad biológica permitiéndoles tener su actividad antimicrobiana.

4.2. Optimización de la reacción de PCR para amplificar la IS6110

En la figura 9 se muestra el gel revelado de una corrida de la reacción de PCR para determinar el rango de concentración de ADN al cual se puede correr la reacción sin observarse inhibición, así como determinar si hay amplificación de genoma humano en caso de que pudieran arrastrarse en muestras clínicas celular epiteliales en el esputo. Se espera de la amplificación de nuestra reacción una banda de 123 pb lo que la coloca en la parte inferior del gel de agarosa entre las últimas dos bandas del marcador de peso molecular que corresponden a 100 y 200 pb respectivamente.

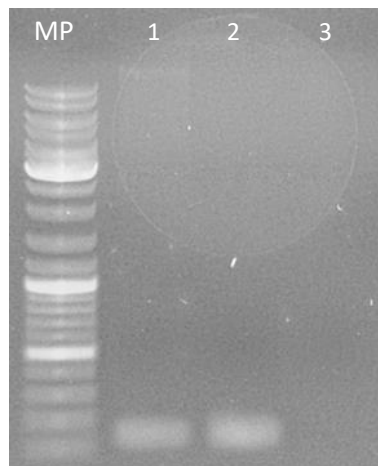


Figura 9. Se presenta el gel de agarosa al 1% con los controles de *M. tuberculosis* H37Rv a 20 ng/ μ L y 2 ng/ μ L con las bandas observadas siendo entre las bandas 200pb y 100pb del marcador de peso molecular, correspondientes con las bandas esperadas de la amplificación. El tercer carril es una muestra de ADN humano.

En el primer carril se observa el marcador de peso molecular siendo las dos bandas inferiores las correspondientes a 200 y 100 pares de bases, la primer banda que se observa se realizó la reacción con ADN a una concentración de 20ng/ μ L en la parte superior de la primera banda se observa una delgada banda que corresponde al ADN genómico de *M. tuberculosis*, en la segunda observamos una concentración de 2ng/ μ L y en el tercero se observa la ausencia

de banda cuando se corre la reacción con ADN genómico humano. En la figura 10 se muestra el gel revelado de la corrida previa a iniciar con los aislados con un gradiente de temperatura en la temperatura de hibridación que nos diera un mejor rendimiento, se realizó la corrida utilizando la misma muestra de ADN de *M. tuberculosis* H37Rv de 20 ng/μL, 2ng/μL y 0.2 ng/μL. Las letras en las muestras corresponden a las temperaturas en el gradiente en el termociclador. A 64°C, B 63°C, E 60.4°C, F 59.2°C y H 58°C.

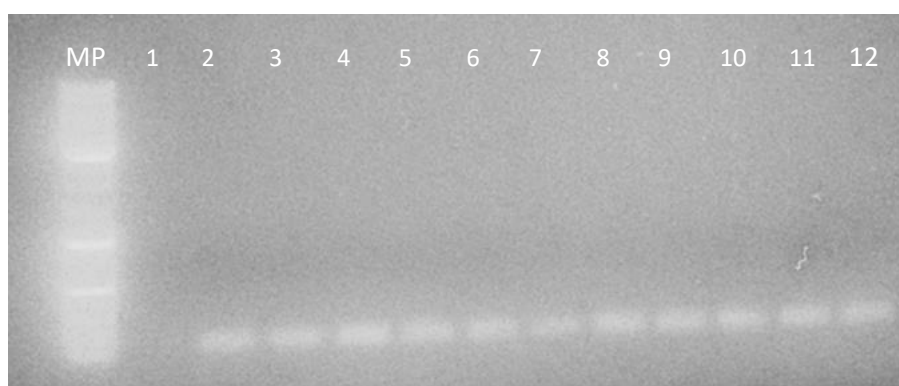


Figura 10. Se presenta gel de agarosa al 1% con las muestras de H37Rv a diferentes concentraciones de ADN genómico bacteriano y a un gradiente de temperatura, no se observa amplificación en el control negativo carril 1. En los carriles 2 al 12 se presentan las amplificaciones de la región IS6110.

Se observa amplificación a las tres concentraciones a las que se sometió nuestra muestra y a lo largo de todo el gradiente de concentración, elegimos en nuestro protocolo de PCR para las cepas experimentales establecer como temperatura de hibridación 58°C tratando de evitar amplificaciones inespecíficas que pudieran darse corriendo la muestra a temperaturas más grandes.

4.2.1. Resultados de amplificación de muestras de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

A continuación, se presentan los resultados del revelado de los geles de agarosa al 1% con transiluminador. Se utilizó ADN genómico de cepas de *M. tuberculosis* obtenidas del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Baja California

provenientes de muestras clínicas. Resembradas en medio Loweinstein-Jensen durante dos semanas, a las cuales se les extrajo el material genético de acuerdo a la metodología establecida y conservado en agua destilada a -20°C. Posteriormente se sometieron a una reacción de amplificación utilizando la técnica de PCR amplificando la secuencia de IS6110 específica para el género *Mycobacterium*.

Tabla VI. Relación entre carriles en gel de agarosa y muestra correspondiente.
MP=Marcador de peso moléculas, CN=Control Negativo, CP=Control positivo.

Carril	1ER CORRIDA	2DA CORRIDA	3ER CORRIDA	4TA CORRIDA	5TA CORRIDA
1	MP	MP	MP	MP	MP
2	CN	CN	CN	CN	CN
3	CP	CP	CP	CP	CP
4	Aislado 1	Aislado 17	Aislado 33	Aislado 43	Aislado 59
5	Aislado 2	Aislado 18	Aislado 34	Aislado 44	Aislado 60
6	Aislado 3	Aislado 19	Aislado 35	Aislado 45	Aislado 61
7	Aislado 4	Aislado 20	Aislado 36	Aislado 46	Aislado 62
8	Aislado 5	Aislado 21	Aislado 37	Aislado 47	Aislado 63
9	Aislado 6	Aislado 22	Aislado 38	Aislado 48	Aislado 64
10	Aislado 7	Aislado 23	Aislado 39	Aislado 49	Aislado 65
11	Aislado 8	Aislado 24	Aislado 40	Aislado 50	Aislado 66
12	Aislado 9	Aislado 25	Aislado 41	Aislado 51	Aislado 67
13	Aislado 10	Aislado 26	Aislado 42	Aislado 52	Aislado 68
14	Aislado 11	Aislado 27	Aislado 43	Aislado 53	Aislado 69
15	Aislado 12	Aislado 28	Aislado 44	Aislado 54	Aislado 70
16	Aislado 13	Aislado 29	Aislado 45	Aislado 55	Aislado 71
17	Aislado 14	Aislado 30	Aislado 46	Aislado 56	M. intracellulare I
18	Aislado 15	Aislado 31	Aislado 47	Aislado 57	M. intracellulare II
19	Aislado 16	Aislado 32	Aislado 48	Aislado 58	M. intracellulare III
20	CP	CP	CP	CP	CP

En la tabla VI se muestra los diferentes aislados de las cepas que se amplificaron por PCR, en donde se ordenan por grupos de 16 muestras, en presencia del controles positivo y negativo, en el control negativo se reemplazó

el volumen de muestra de ADN bacteriano con agua grado molecular, y como control positivo se utilizó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv.

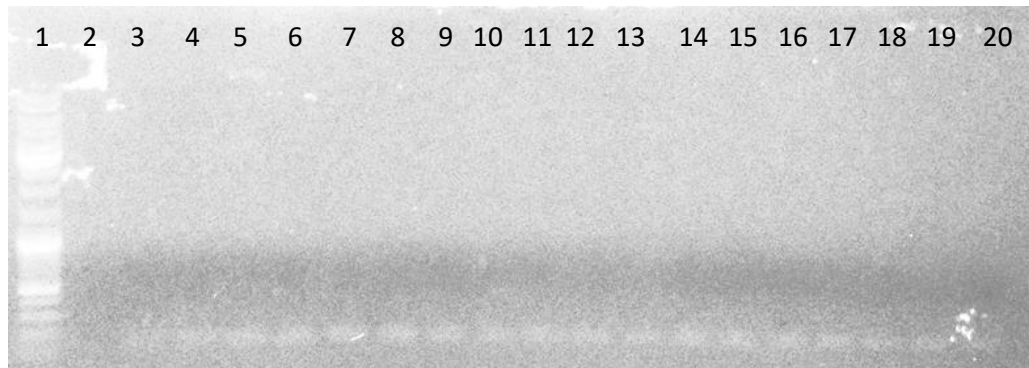


Figura 11. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la primera corrida descrita en la tabla VI.

En la figura 11 se observan los resultados de la primera corrida de PCR utilizando las cepas problema, se observa amplificación y bandas del mismo tamaño en todas cepas problema, llevándonos a inferir que se trata de amplificación de la IS6110.

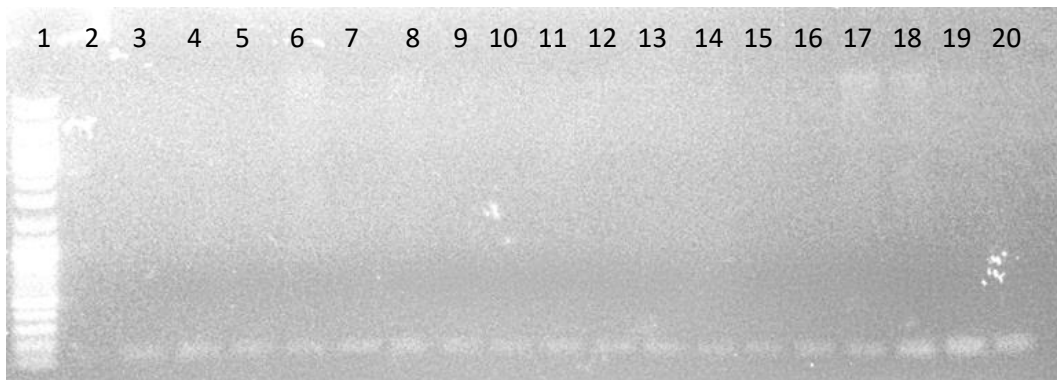


Figura 12. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la segunda corrida descrita en la tabla VI.

En la figura 12 se observa el gel de agarosa al 1% correspondiente a las cepas probadas en la segunda corrida de amplificación por PCR, se observa de

igual manera que en el primer gel de agarosa una banda similar en todas las cepas, así como en los controles positivos a los extremos de nuestras muestras. En la parte superior en los carriles 6, 17 y 18 se pudo observar que hay fluorescencia por encima del marcador de peso molecular esto corresponde a ADN genómico de la bacteria y se debe a que en esas muestras la concentración del ácido nucleico es alta. Pero aun así se lleva a cabo nuestra reacción sin problemas.



Figura 13. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la tercera corrida descrita en la tabla IV.

En la figura 13 se observa el gel de agarosa al 1% correspondiente a la tercera corrida de aislados en donde no se amplificaron las bandas después del carril 14, por los anteriores resultados obtenidos se volvieron a correr los mismos productos de la reacción de PCR.

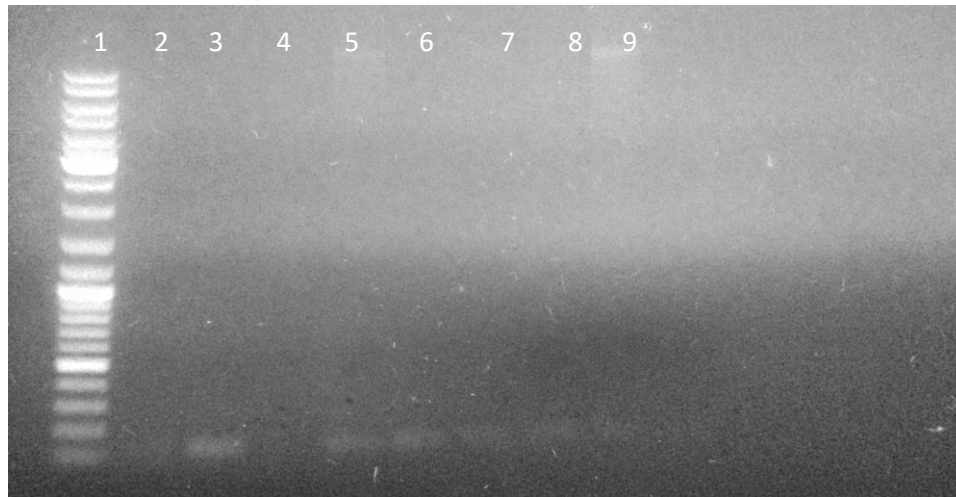


Figura 14. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la tercera corrida (muestra 11-16) descrita en la tabla IV.

En la figura 14 se observa el resultado del segundo gel de agarosa en el que se revelaron de nuevo las muestras repetidas de la tercera corrida.

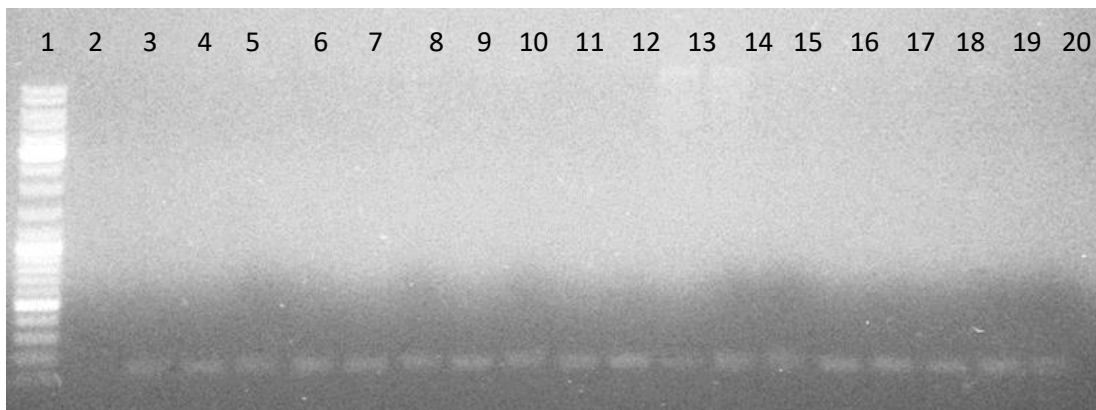


Figura 15. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la cuarta corrida descrita en la tabla IV.

En la figura 15 se observa el resultado de la cuarta corrida de las cepas problema de nuevo se observa el producto de PCR esperado de una reacción positiva a la amplificación de la IS6110, en esta reacción se observa en la

muestra 13 y 14 una banda en la parte superior correspondiente a ADN genómico.

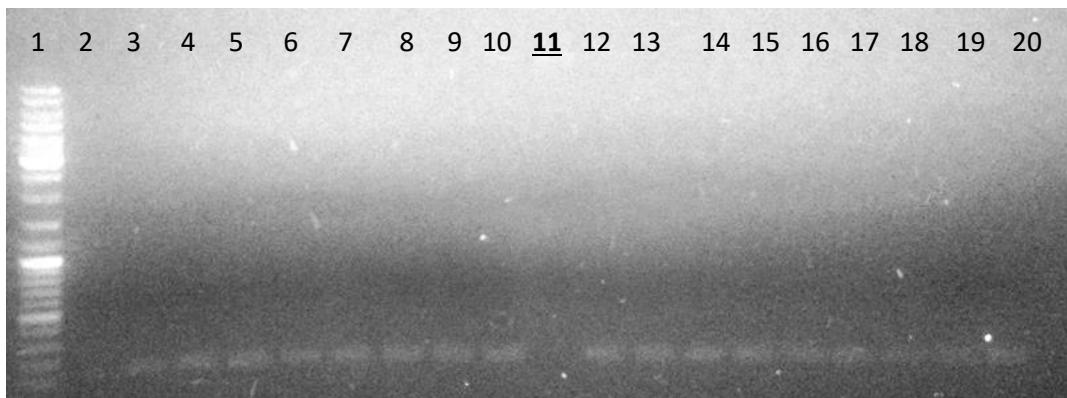


Figura 16. Se presenta gel de agarosa al 1% correspondiente a la quinta corrida descrita en la tabla IV.

En la figura 16 se observa el revelado del gel de agarosa correspondiente a las muestras de la quinta corrida de PCR, en este gel se observa que en el carril once que corresponde al Aislado 66 no hubo amplificación de la secuencia de inserción por lo que el paciente será repetido en la sexta corrida de reacciones de PCR junto con los controles negativos.

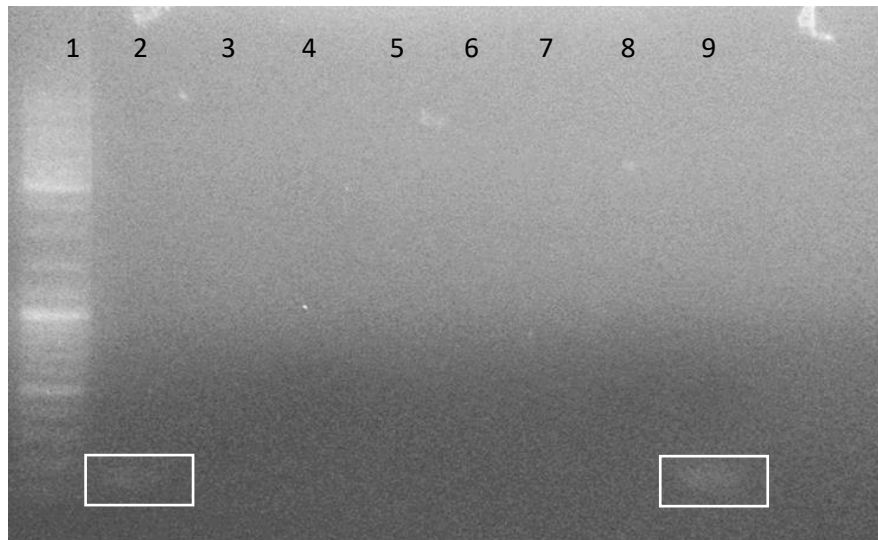


Figura 17. Se presenta el gel de agarosa al 1% donde se observa en el carril 1, el marcador de peso molecular, en el carril 2 la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, en los carriles dl 3 al 8 se presenta como control de reacción la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en el carril 9 el aislado 66.

En la figura 17 se muestran el revelado del gel de agarosa correspondiente a la sexta y última corrida de reacciones de PCR en el que se incluye como controles negativos para descartar amplificación inespecífica en otros organismos procariotas la amplificación de la IS6110 en seis muestras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. En el último carril se observa la banda de amplificación correspondiente al Aislado 66 negativa en la primera reacción de PCR que se le practicó.

Tabla VII. Resultado del cultivo de Lowestein-Jensen y la reacción de PCR.

Cepa	Cultivo L-J	IS6110	Cepa	Cultivo L-J	IS6110
Aislado 1	Positivo	Positivo	Aislado 21	Positivo	Positivo
Aislado 2	Positivo	Positivo	Aislado 22	Positivo	Positivo
Aislado 3	Positivo	Positivo	Aislado 23	Positivo	Positivo
Aislado 4	Positivo	Positivo	Aislado 24	Positivo	Positivo
Aislado 5	Positivo	Positivo	Aislado 25	Positivo	Positivo
Aislado 6	Positivo	Positivo	Aislado 26	Positivo	Positivo
Aislado 7	Positivo	Positivo	Aislado 27	Positivo	Positivo
Aislado 8	Positivo	Positivo	Aislado 28	Positivo	Positivo
Aislado 9	Positivo	Positivo	Aislado 29	Positivo	Positivo
Aislado 10	Positivo	Positivo	Aislado 30	Positivo	Positivo
Aislado 11	Positivo	Positivo	Aislado 31	Positivo	Positivo
Aislado 12	Positivo	Positivo	Aislado 32	Positivo	Positivo
Aislado 13	Positivo	Positivo	Aislado 33	Positivo	Positivo
Aislado 14	Positivo	Positivo	Aislado 34	Positivo	Positivo
Aislado 15	Positivo	Positivo	Aislado 35	Positivo	Positivo
Aislado 16	Positivo	Positivo	Aislado 36	Positivo	Positivo
Aislado 17	Positivo	Positivo	Aislado 37	Positivo	Positivo
Aislado 18	Positivo	Positivo	Aislado 38	Positivo	Positivo
Aislado 19	Positivo	Positivo	Aislado 39	Positivo	Positivo
Aislado 20	Positivo	Positivo	Aislado 40	Positivo	Positivo

Resultado comparativo entre Cultivo de Lowestein-Jensen y reacción de PCR para amplificación de IS6110. * Indica aislados que dieron un resultado dudoso en su primera corrida, pero se decidió confirmar su estado como positivos con un segundo análisis.

Tabla VIII. Resultado del cultivo de Loweistein-Jensen y la reacción de PCR.

Cepa	Cultivo L-J	IS6110	Cepa	Cultivo L-J	IS6110
Aislado 41	Positivo	Positivo	Aislado 61	Positivo	Positivo
Aislado 42	Positivo	Positivo	Aislado 62	Positivo	Positivo
Aislado 43	Positivo	Positivo*	Aislado 63	Positivo	Positivo
Aislado 44	Positivo	Positivo*	Aislado 64	Positivo	Positivo
Aislado 45	Positivo	Positivo	Aislado 65	Positivo	Positivo
Aislado 46	Positivo	Positivo*	Aislado 66	Positivo	Falso o negativo
Aislado 47	Positivo	Positivo*	Aislado 67	Positivo	Positivo
Aislado 48	Positivo	Positivo*	Aislado 68	Positivo	Positivo
Aislado 49	Positivo	Positivo	Aislado 69	Positivo	Positivo
Aislado 50	Positivo	Positivo	Aislado 70	Positivo	Positivo
Aislado 51	Positivo	Positivo	Aislado 71	Positivo	Positivo
Aislado 52	Positivo	Positivo	M. intracellulare I	Positivo	Positivo
Aislado 53	Positivo	Positivo	M. intracellulare II	Positivo	Positivo
Aislado 54	Positivo	Positivo	M. intracellulare III	Positivo	Positivo
Aislado 55	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo
Aislado 56	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo
Aislado 57	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo
Aislado 58	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo
Aislado 59	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo
Aislado 60	Positivo	Positivo	S. aureus	N/A	Negativo

Resultado comparativo entre Cultivo de Lowestein-Jensen y reacción de PCR para amplificación de IS6110. * Indica aislados que dieron un resultado dudoso en su primera corrida, pero se decidió confirmar su estado como positivos con un segundo análisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, desglosados en la tabla VII, se reportaron 71 muestras positivas en su primera reacción de PCR, repitiendo 6 de estas debido al error que se comentó en el análisis de resultados correspondiente a la tercera corrida y en la segunda reacción de PCR se observa una reacción positiva. En el aislado 66 se encuentra que en la primera reacción se observa una ausencia total de la banda correspondiente con esta muestra reportada como falso negativo.

La sensibilidad de nuestra reacción de acuerdo a los resultados obtenidos y obedeciendo a la fórmula para sensibilidad.

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde VP serían los verdaderos positivos y FN los falsos negativos. Insertando los valores obtenidos de nuestros resultados.

$$Sensibilidad = \frac{70}{70 + 1}$$

Tenemos como resultado una sensibilidad del 98.59%.

4.3. Determinación de la actividad antituberculosis de las nanopartículas de plata

Se cultivó en medio Middlebrook suplementado la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv durante 7 días en presencia de diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, posteriormente se tomó un inóculo de estos medios y se resembró en medio Loweinstein-Jensen para determinar la viabilidad de las células bacterianas después de la exposición al agente antimicrobiano.

Tabla IX. Determinación de la CMI para evaluar el efecto antituberculosis de NPs-Ag.

Tubo	Resultado	Tubo	Resultado	Tubo	Resultado	Tubo	Resultado
1.1	C	2.1	SC	3.1	SC	C.1	SC
1.2	C	2.2	SC	3.2	SC	C.2	SC
1.3	C	2.3	SC	3.3	SC	C.3	SC
1.4	C	2.4	SC	3.4	SC	C.4	SC
1.5	C	2.5	C	3.5	SC	C.5	SC

En la tabla IX se muestran los resultados del experimento para determinar la concentración mínima inhibitoria de las NPs-Ag sobre *Mycobacterium*

tuberculosis. Donde la letra C significa crecimiento y SC sin crecimiento. De acuerdo a estos resultados se determina que la concentración mínima inhibitoria para nuestras NPs-Ag es de 0.1 mg/mL. Correspondiente al tubo 2.4 el ultimo tubo donde se observa inhibición del crecimiento bacteriano (véase Anexo II).

Tabla X. Determinación de CMB para evaluar efecto antituberculosis de NPs-Ag.

Tubo	Resultado	Tubo	Resultado	Tubo	Resultado
1.1	C	2.1	SC	3.1	SC
1.2	C	2.2	C	3.2	SC
1.3	C	2.3	C	3.3	SC
1.4	C	2.4	C	3.4	SC
1.5	C	2.5	C	3.5	SC

Después de estar expuestas siete días a nanopartículas de plata se realizó una resiembra del medio líquido de cultivo en medio Loweinstein-Jensen, esto con el fin de determinar a qué concentración las NPs-Ag no solo detienen el crecimiento si no que logren matar a las células de *M. tuberculosis*. Observamos que solo a la concentración más alta se observa una total muerte de nuestra bacteria. Por lo que la concentración mínima bactericida seria de 100 mg/mL (Véase Anexo II).

CAPITULO V

5.1 Discusión

5.1.1 Caracterización de las nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata Argovit™ utilizadas para realizar nuestros ensayos de inhibición microbiológicos presentaron un diámetro promedio de 35 nm y una morfología predominantemente esférica, encontrando que contienen por cada 200mg, 188 mg de PVP y 12 mg de plata metálica (56). De acuerdo a Kreytsberg y colaboradores en sus experimentos reportaron la utilización de nanopartículas de plata con un diámetro entre 5 y 50 nm (con una media muy parecida a las NPs-Ag con la que experimentamos), utilizando también la mezcla de NPs-Ag e isoniacida, concluyendo que su efecto antituberculoso fue dosis dependiente (51). Seth y colaboradores utilizaron nanopartículas de plata recubiertas con albumina de suero bovino y PVP respectivamente en ensayos para determinar su actividad antituberculosa. Al momento de caracterizar sus nanopartículas de plata recubiertas con PVP encontraron un tamaño promedio de 28.33 nm y la caracterización por espectrofotometría UV-VIS mostro un pico a 423nm (54), estas características fueron muy similares a las mostradas por las NPs-Ag Argovit™ que presentaron un tamaño promedio de 35 nm y el pico por espectrofotometría UV-VIS a los 420nm (56) y se demuestra que las diferentes NPs-Ag presentan actividad antituberculosis.

5.1.2 Optimización de la Reacción de PCR

En su artículo de revisión sobre la estandarización y control de calidad en análisis por PCR Hans-Joachim Burkardt, menciona algunas medidas para asegurar la integridad de un resultado positivo de una amplificación de PCR. Los resultados falsos positivos se deben a errores en técnica por parte del personal que labora en el laboratorio, en nuestro caso esto se minimiza debido a que la

variabilidad inter-operador es nula debido a que una sola persona llevo a cabo todas las metodologías en la fase experimental, si se quisiera entrenar personal nuevo deberían establecerse procedimientos normalizados de operación para minimizar esta fuente de error asegurándose que el entrenamiento sea el adecuado. Señala que otro problema es la amplificación inespecífica en protocolos de PCR no optimizados, para nuestro procedimiento buscamos la temperatura de hibridación teórica, pero se corrió un gradiente de temperatura a diferentes concentraciones de ADN de referencia para evitar esta fuente de error determinando que en un rango de temperatura de 64 a 58 °C como temperatura de hibridación en el protocolo no se veía amplificación inespecífica ya que todas las reacciones realizadas en este rango mostraron amplificación. Para evitar problemas de amplificación inespecífica o falsos positivos por amplificación se sugiere trabajar en áreas diferentes, por lo que nuestros reactivos y muestras se almacenan a temperatura de -20°C alejados del área donde se realiza la preparación de muestras para amplificación, se esterilizan las micropipetas y se utilizan puntillas con filtro para evitar contaminación cruzada entre el control positivo y los aislados (57).

Se utilizó la forma más simple de control negativo sugerido, agua grado molecular sirviendo dos propósitos, asegurándonos que el agua grado molecular que se utilizó no estuviera contaminada con material genético ya que en volumen ocupa la proporción más grande de la mezcla de reacción, asegurarnos que el resto de los reactivos no se hayan contaminado por corridas anteriores y asegurarnos que no están hibridando entre los cebadores y produciendo productos inespecíficos por si solos (57). Una vez pasado por este proceso y mostrando una amplificación constante de nuestro control positivo, y ausencia de amplificación en controles negativos de agua y ADN humano se procedió al procesamiento de los aislados de *Mycobacterium tuberculosis*.

5.1.3 Resultados de amplificación de aislados de *Mycobacterium tuberculosis*

Después de realizar las resiembras de los aislados cedidos por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Baja California, procedimos a realizar la extracción del material genético de los aislados recibidos, esto con el propósito de amplificar la cantidad de celular y por lo tanto de material genético obtenido y asegurar la calidad de nuestra optimización inicial de la reacción de PCR. La extracción del ADN se realiza en un tiempo promedio de dos horas, posteriormente se somete al proceso de PCR que dura alrededor de una hora y el revelado del gel de agarosa, obtenemos un resultado entre 4 a 5 horas. La estandarización de la reacción de PCR se utilizara para apoyar el diagnóstico de tuberculosis que se realiza por medio de baciloscopia de forma rutinaria.

Con este trabajo experimental se estandarizo la reacción de PCR, utilizando la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, de acuerdo a las muestras aisladas solo se reportó un resultado falso negativo. Por lo que se propone como forma de control de calidad, cuando se quiera correr esta marcha analítica para determinar la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en una muestra clínica de esputo o algún fluido biológico, es importante la cuantificación del ADN (longitud de onda de 260 y 280 nm). Cada reacción de PCR deberá ser procesada con un duplicado que contenga como testigo positivo ADN de la cepa de referencia H37Rv y el ADN problema proveniente de la muestra biológica (como control positivo de la reacción), así como un control negativo de reacción (agua destilada).

De acuerdo a nuestros resultados la sensibilidad de nuestra prueba fue de 98.59%, se esperaría que esto pudiera aumentar, al aumentar el tamaño de muestra, dentro de las recomendaciones para investigaciones futuras se recomienda realizar un estudio ciego como lo realizaron Noordhoek y colaboradores con 30 laboratorios en Europa, en el que se envían muestras de fluidos biológicos contaminados artificialmente con *M. tuberculosis* como forma de control de calidad externo, posiblemente esto podría poner a prueba nuestra reacción de PCR para comprobar la sensibilidad y la especificidad del método de reacción(58).

Una ventaja de nuestra reacción de PCR es que al estar dirigida a la secuencia de inserción 6110, esta secuencia se presenta de forma repetida a lo largo del género *Mycobacterium*, no solamente detectamos a nivel de especie, también detectamos el género bacteriano que puede correlacionarse con la clínica del paciente y se puede determinar si tiene tuberculosis independientemente de la especie, como ejemplo se logró la amplificación de tres cepas de *Mycobacterium intracellulare*. La secuencia de inserción se encuentra reportada en la literatura por diferentes grupos como McHugh y colaboradores y Kent y colaboradores (59,60).

Se propone esta metodología diagnóstica en apoyo al estándar de oro que es el cultivo L-J, debido a que acorta el tiempo de diagnóstico del género *Mycobacterium*, ayudando al médico a tomar una decisión en cuando al tratamiento del paciente e iniciarlo la terapia tres semanas antes de la confirmación por el cultivo. Una desventaja del método de diagnóstico molecular es que por su mecanismo no se puede detectar o diferenciar entre la presencia de microorganismos vivos o muertos esto solamente no lo podría indicar el cultivo.

5.1.4 Determinación de la actividad antituberculosis de las nanopartículas de plata

En estos experimentos se utilizó a la cepa de referencia H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* para determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de las nanopartículas de plata Argovit™. Se realizó en conjunto utilizando el medio líquido de cultivo para la determinación del CMI, para obtener las cepas expuestas siete días a las nanopartículas de plata y realizar la resiembra en el medio solido Loweinstein-Jensen. Al momento de realizar los cultivos líquidos para determinación de CMI se utilizó un control positivo de H37Rv de acuerdo a la metodología del fabricante y se observó crecimiento en el fondo en forma de escamas puntiformes de color blanco, el tubo se observó turbio en comparación con el control negativo que fue un medio procesado de igual manera sin inóculo, una característica interesante y particular es que al momento de agitar el medio se observa la formación de un vórtice de color blanco.

En los tubos con las bacterias solas, del 1.1 al 1.5, se observó el crecimiento característico descrito en el párrafo anterior. En todos los tubos, recordando que en estos tubos se reemplazó parte del medio de cultivo por el mismo volumen de PBS para igualar las condiciones de los tubos que se les quito medio de cultivo para ser reemplazado por nanopartículas de plata y obtener las diluciones adecuadas. En los tubos problema en los que se sembraron bacterias y se expusieron a distintas concentraciones de nanopartículas de plata, en el 2.1 debido a la concentración de nanopartículas de plata no se pudo determinar crecimiento por enturbiamiento del medio, pero no se observó el crecimiento característico al fondo del tubo. En el tubo 2.2 se observó la misma situación que en el tubo anterior. En el tubo 2.3 se sigue observando el medio turbio el cual se comparó con su par 3.3 que solo tenía nanopartículas de plata y la turbidez se observó igual sin crecimiento en el fondo.

El tubo 2.4 presento la misma situación con la diferencia de que la turbidez es menor, pero de igual manera se comparó con su par y se determinó junto con el fondo que no había crecimiento. En el tubo 2.5 se observó crecimiento característico en el fondo del tubo y la formación del vórtice blanco cuando se agito el medio se determinó que en este tubo presento crecimiento, por lo anterior la concentración mínima inhibitoria (CMI) es de 0.1 mg/mL o 0.006 mg/mL de plata metálica lo correspondiente la concentración en el tubo 2.4. De acuerdo a Kreytsberg y colaboradores cuando ellos realizaron experimentos para determinar la inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* obtuvieron como resultado que la máxima eficacia en inhibición la obtuvieron en un rango de 0.0025 a 0.005 mg/mL, resultado que coincide con el obtenido por nosotros si tomamos en cuenta solo la concentración de plata metálica, esto debido a que en su artículo no mencionan si sus nanopartículas de plata tenían recubrimiento alguno (61).

En los ensayos para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* se sembraron del caldo de cultivo del ensayo de concentración mínima inhibitoria en medio solido Loweinsten-Jensen después de 7 días de exposición con las nanopartículas de plata a las diferentes concentraciones. En los tubos de 1.1 a 1.5 se observó después de dos semanas en cultivo a 35°C colonias características de *M. tuberculosis*, observándose colonias de color amarillo de morfología típica de la cepa H37Rv, con un diámetro de alrededor de 2-3 milímetros, algunas colonias presentaron formas puntiformes de morfología similar en cuanto a color y características a lo largo de todo el pico de flauta del tubo de cultivo. En el tubo 2.1 no se observaron colonias en todo el pico de flauta del tubo. En el 2.2 se observan escasas colonias, solo se observan alrededor de 5 colonias puntiformes en todo el tubo, en los tubos 1.2 se observa inhibición considerable del crecimiento, aunque con una pequeña parte de bacterias que lograron sobrevivir.

En los tubos 2.3 se observa crecimiento con la misma morfología que el tubo 2.2. En los tubos 2.4 se observan alrededor de 10 colonias con diámetro menor a 1 milímetro. En los tubos 2.5 se observan colonias muy similares en morfología colonial al tubo 2.4, pequeñas comparadas con el crecimiento que se observa en los tubos 1.5, en mayor cantidad y creciendo a lo largo de todo el pico de flauta. Con estos resultados determinamos que la concentración mínima bactericida es de 100 mg/mL, correspondiente la primera dilución (se observó que no hubo crecimiento de las bacterias), esto corresponde a 6 mg/mL de plata metálica.

CAPITULO VI

6.1 Conclusiones

-Los resultados de la caracterización por espectroscopia UV-Vis y microscopia electrónica de transmisión pudieron correlacionarse adecuadamente en relación al tamaño y morfología de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata.

-Las nanopartículas de plata utilizadas en esta investigación presentaban un rango de diámetro promedio de 35 nm, con una forma esferoidal en las diferentes concentraciones y las de mayor tamaño tuvieron un diámetro promedio de $35 \pm 15 \text{ nm}$ (20%).

-Se logró estandarizar la técnica de cultivo de Loweinsten-Jensen para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

-Se estandarizo la técnica para el diagnóstico por PCR punto final de *Mycobacterium tuberculosis* amplificando la IS6110 logrando un resultado de sensibilidad del 98.59%.

-Se determinó que las nanopartículas de plata Argovit™ presentan actividad antimicrobiana frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv determinando que la concentración mínima bactericida (CMB) es de 100 mg/mL y una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.1 mg/mL.

CAPITULO VII.

7.1. Bibliografía

1. WHO. WHO Global tuberculosis report 2015. Vol. 1, WHO. 2015.
2. Epidemiologica SN de V. Perfil Epidemiologico de la Tuberculosis en Mexico. 2012.
3. Makeshkumar V, Madhavan R, Narayanan S. Polymerase chain reaction targeting insertion sequence for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Indian J Med Res. 2014;139(January):161–6.
4. WHO. Global tuberculosis report 2016. 2016.
5. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M PM. Manual of Clinical Microbiology. Murray P, editor. ASM Press; 2007.
6. Kieser KJ, Rubin EJ. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. Nat Rev Microbiol. 2014;12(August):550–62.
7. Rodriguez-campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Research in Veterinary Science Overview and phylogeny of Mycobacterium tuberculosis complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. Res Vet Sci [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;97:S5–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.02.009>
8. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon S V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2009;7(7):537–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2165>
9. Altamirano LM. Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la tuberculosis. Rev del Inst Nac Enfermedades Respir. 2004;17(2):117–25.
10. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? Nat Rev Microbiol

- [Internet]. 2007;5(1):39–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160001>
11. Fogel N. Tuberculosis: A disease without boundaries. Tuberculosis [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;95(5):527–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.05.017>
 12. Nunes-Alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2016 Apr 21];12(4):289–99. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3230>
 13. WHO. Global tuberculosis report 2014. 2014.
 14. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I Baciloscopia. Tuberculosis. 2008;64.
 15. Organización Panamericana de la salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. parte 2 Cultivo. Tuberculosis. 2008;114.
 16. Meghdadi H, Khosravi AD, Ghadiri AA, Sina AH, Alami A. Detection of Mycobacterium tuberculosis in extrapulmonary biopsy samples using PCR targeting IS6110, rpoB, and nested-rpoB PCR Cloning. Front Microbiol. 2015;6(July):1–9.
 17. BD BBL MGIT. 2015. p. 1–5.
 18. Bass JBJ, Farer LS, Hopewell PC, O'Brien R, Jacobs RF, Ruben F, et al. Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. Am J Respir Crit Care Med. United States; 1994 May;149(5):1359–74.

19. Dartois V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2014;12(3):159–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487820>
20. Monedero I, Caminero JA. MDR-/XDR-TB management: what it was, current standards and what is ahead. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2009 Mar 25;3:133+. Available from: <http://148.231.10.114:2136/ps/i.do?p=AONE&sw=w&u=uabc1&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA224409334&asid=60ee2ec1e4d0ccb28c0fecf55e783a8f>
21. American T, Teacher B. Drug-resistant Tuberculosis. *Am Biol Teach* [Internet]. 2014;76(6):386–94. Available from: <http://abt.ucpress.edu/cgi/doi/10.1525/abt.2014.76.6.6>
22. Kendall EA, Azman AS, Cobelens FG, Dowdy DW. MDR-TB treatment as prevention: The projected population-level impact of expanded treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(3):e0172748. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0172748>
23. Zhang H, Li D, Zhao L, Fleming J, Lin N, Wang T, et al. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance. *Nat Genet* [Internet]. 2013;45(10):1255–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995137>
24. Parida SK, Axelsson-Robertson R, Rao M V, Singh N, Master I, Lutckii A, et al. Totally drug-resistant tuberculosis and adjunct therapies. *J Intern Med*. 2015;277(4):388–405.
25. Migliori GB, De Iaco G, Besozzi G, Centis R, Cirillo DM. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull. Sweden*; 2007 May;12(5):E070517.1.

26. WHO. Laboratory biosafety manual Third edition World Health Organization. World Heal Organ [Internet]. 2004;1–178. Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=qVHfjFINjzwC&oi=fnd&pg=PP9&dq=Laboratory+biosafety+manual&ots=Qw_FLuZChi&sig=xgd8x9nOBNLIDE5wsH-WAZP6Kw0
27. WHO. Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual. 2013. 50 p.
28. Uribe GM, López JLR. La nanociencia y la nanotecnología: una revolución en curso. Rev Perfiles Latinoam [Internet]. 2007;14(29):161–86. Available from: <http://perfilesla.flacso.edu.mx/index.php/perfilesla/article/view/209>
29. Echevarría-Castillo F. Retos de este siglo: Nanotecnología y salud. Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter. 2013;29(1):3–15.
30. Barillo DJ, Marx DE. ScienceDirect Silver in medicine : A brief history BC 335 to. Burns [Internet]. Elsevier Ltd and International Society of Burns Injuries; 2014;40:S3–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.009>
31. Gutiérrez CEW. Las NANOPARTÍCULAS : pequeñas estructuras con gran potencial ¿Por qué el interés en estos materiales? ¿Qué aplicaciones tienen? Contacto Nucl [Internet]. 2005;24–9. Available from: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/39NANOPARTICULAS.pdf>
32. Khandelwal N, Kaur G, Kumar N, Tiwari A. Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new hope for antivirals. Dig J Nanomater Biostructures. 2014;9(1):175–86.
33. Shaluei F, Hedayati A, Jahanbakhshi A, Kolangi H, Fotovat M. Effect of subacute exposure to silver nanoparticle on some hematological and plasma biochemical indices in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*).

- Hum Exp Toxicol [Internet]. 2013;32(12):1270–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23632006>
34. Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. PLoS One. 2014;9(7).
 35. Gaiser BK, Fernandes TF, Jepson MA, Lead JR, Tyler CR, Baalousha M, et al. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. Environ Toxicol Chem. 2012;31(1):144–54.
 36. Gasparyan V. Preparation and application of various nanoparticles in biology and medicine. Nanotechnol Dev. 2013;3(1):6–11.
 37. Irache JM. Nanomedicina: Nanopartículas con aplicaciones médicas. An Sist Sanit Navar. 2008;31(1):7–10.
 38. Monge M. Nanopartículas de plata : métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. Investig Quim. 2009;(August):33–41.
 39. Gómez GL. Nanopartículas de plata : tecnología para su obtención , caracterización y actividad biológica. Investig en Discapac [Internet]. 2013;2(1):18–22. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir131c.pdf>
 40. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara HH, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. J Nanobiotechnology [Internet]. 2005;3:6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1190212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 41. Lara HH, Ayala-Núñez N V, Ixtapan-Turrent L, Rodríguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. J Nanobiotechnology [Internet]. 2010;8(1):1. Available from:

<http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-8-1>

42. Ruden S, Hilpert K, Berditsch M, Wadhwani P, Ulrich AS. Synergistic interaction between silver nanoparticles and membrane-permeabilizing antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3538–40.
43. Sheikpranbabu S, Kalishwaralal K, Venkataraman D, Eom SH, Park J, Gurunathan S. Silver nanoparticles inhibit VEGF-and IL-1 β -induced vascular permeability via Src dependent pathway in porcine retinal endothelial cells. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2009;7:8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2776000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Santoro CM, Duchsherer NL, Grainger DW. Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*. 2007;3(2):55–65.
45. Losasso C, Belluco S, Cibir V, Zavagnin P, Mičetić I, Gallochio F, et al. Antibacterial activity of silver nanoparticles: Sensitivity of different *Salmonella* serovars. *Front Microbiol*. 2014;5(MAY):263–72.
46. Zarei M, Jamnejad A, Khajehali E. Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;7(1).
47. Lima R De, Seabra B, Durán N. Silver nanoparticles : a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. 2012;(January):867–79.
48. Tian J, Wong KKY, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2007;2(1):129–36.

49. Wong KKY, Cheung SOF, Huang L, Niu J, Tao C, Ho CM, et al. Further evidence of the anti-inflammatory effects of silver nanoparticles. *ChemMedChem*. 2009;4(7):1129–35.
50. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2010;40(4):328–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20128631>
51. Kreytsberg GN, Gracheva IE, Kibrik BS, Golikov I V. Antituberculous effect of silver nanoparticles. *J Phys Conf Ser* [Internet]. 2011;291(1):12030. Available from: <http://stacks.iop.org/1742-6596/291/i=1/a=012030>
52. Costa-Gouveia J, Aínsa JA, Brodin P, Lucía A. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discov Today*. 2017;22(3).
53. Larimer C, Islam MS, Ojha A, Nettleship I. Mutation of environmental mycobacteria to resist silver nanoparticles also confers resistance to a common antibiotic. *BioMetals*. 2014;27(4):695–702.
54. Seth D, Roy S, Saheli C. Nature-inspired Novel Drug Design Paradigm Using Nanosilver: Efficacy on Multi-Drug-Resistant Clinical Isolates of Tuberculosis. 2011;715–26.
55. Sekar B, Selvaraj L, Alexis A, Ravi S, Arunagiri K, Rathinavel L. The utility of IS6110 sequence based polymerase chain reaction in comparison to conventional methods in the diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis . *Indian JMedMicrobiol* . 2008;26(0255–0857 (Print)):352–5.
56. Juarez-Moreno K, Mejía-Ruiz CH, Díaz F, Reyna-Verdugo H, Re AD, Vazquez-Felix EF, et al. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus*

- vannamei. Chemosphere [Internet]. 2017;169:716–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27918999>%5Cn<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653516315892>
57. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med. 2000;38(2):87–91.
 58. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AM. Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol. 1996;34(10):2522–5.
 59. Kent L, Mchugh T, Billington O, Dale J, Gillespie S. Demonstration of Homology Between Is6110 of Mycobacterium-Tuberculosis and Dnas of Other Mycobacterium Spp (Vol 33, Pg 2290, 1995). 1995;33(9):2290–3. Available from: <http://discovery.ucl.ac.uk/409237/>
 60. McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1769–71.
 61. Kreysberg GN, Gracheva IE, Kibrik BS, Golikov I V. Antituberculous effect of silver nanoparticles. J Phys Conf Ser [Internet]. 2011;291(1):12030. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/291/1/012030>

CAPITULO VIII

Anexo I. Caracterización de Nanopartículas de Plata

Identificación por Espectroscopia UV-Visible de las nanopartículas de plata

Con el fin de observar la absorción en la región ultravioleta-visible (UV-Vis) del espectro electromagnético de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5%, 20% y 40% de Argovit producidas por Vector –Vita Ltd, se realizó con un espectrofotómetro Varían, modelo CARY-300, utilizando como blanco una solución de nitrato de plata 1.0 % p/v a pH 7.0. En la figura 18 se muestra la caracterización de la estabilidad de los materiales con nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Visible en diferentes concentraciones. En donde se presentan los espectros de UV-Visible de las diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata (Argovit) producidas por Vector –Vita Ltd.

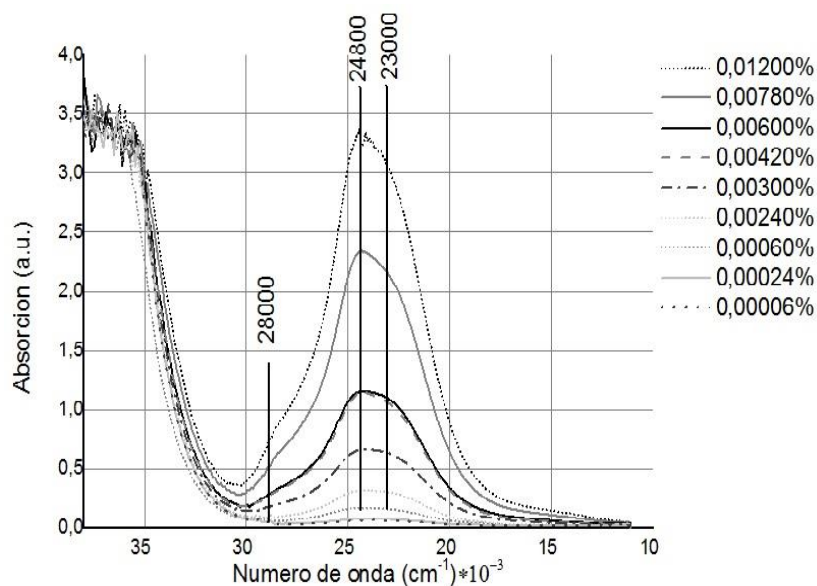


Figura 18. Espectros de UV-Visible de Argovit de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata producidas por Vector –Vita Ltd.

Los picos se presentaron en intervalos de energía alrededor de $25,000\text{ cm}^{-1}$ corresponden a nanopartículas de plata con diámetro más de 1 nm y $< 26,000\text{ cm}^{-1}$ corresponden a cúmulos de plata con diámetro $< 1\text{ nm}$ (neutrales, o cargadas positivamente), que contienen alrededor de 2- 30 átomos de plata. Las bandas con máximo de absorción alrededor de $40,000\text{ cm}^{-1}$ corresponden a los cationes de plata Ag^{+1} .

Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.

En la figura 19 se presentan los espectros de UV-Visible de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%. En el espectros de Argovit se observan la banda más intensa a $24,800$ es (la banda típica para nanopartículas de plata con diámetro $> 1\text{ nm}$); un hombro a $23,000\text{ cm}^{-1}$, (se interpreta como nanopartículas de plata con diámetro $> 1\text{ nm}$), el hombro ligeramente notable a $28,000\text{ cm}^{-1}$ (cúmulos de plata de con diámetro $< 1\text{ nm}$ neutrales, o cargadas positivamente).

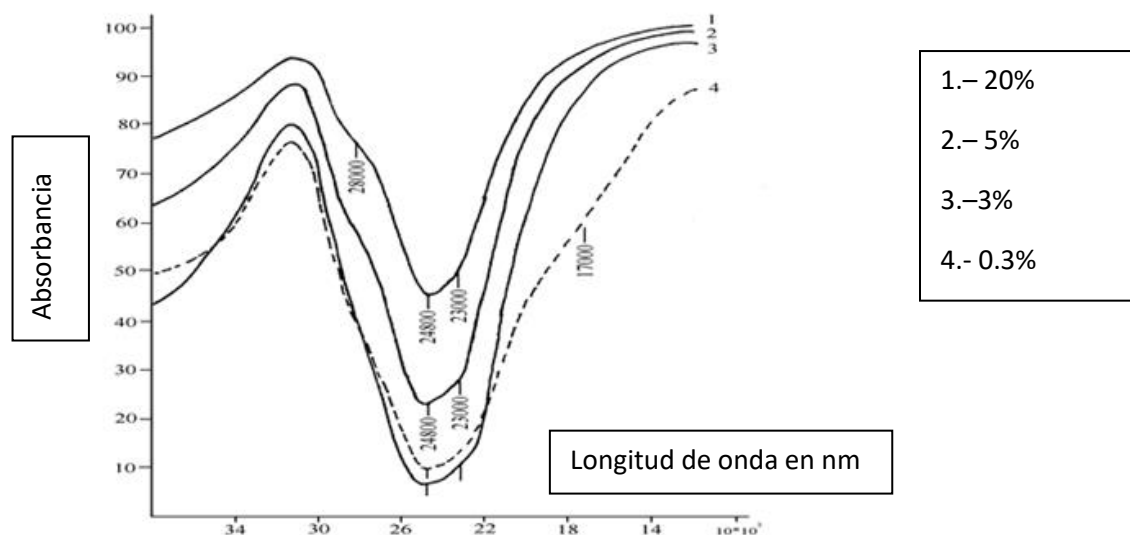


Figura 19. Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

El aumento de concentración de las nanopartículas de plata de 0.3% hasta 20% de plata metálica de Argovit, aumenta la intensidad del espectro, pero no resulta al cambio considerablemente la forma del espectro e intensidad relativa de los 3 tipos de bandas. Esto indica que el estado electrónico de nanopartículas y cúmulos de plata no se cambió con la variación de concentración de Argovit en los intervalos estudiados.

Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20% por espectroscopia UV-Visible.

En la figura 20 se presentan los espectros de UV-Visible de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%. En los espectros de Argovit se observan la banda más intensiva a 24,800 y un hombro a 23,000 cm^{-1} , el hombro ligeramente notable a 28,000 cm^{-1} .

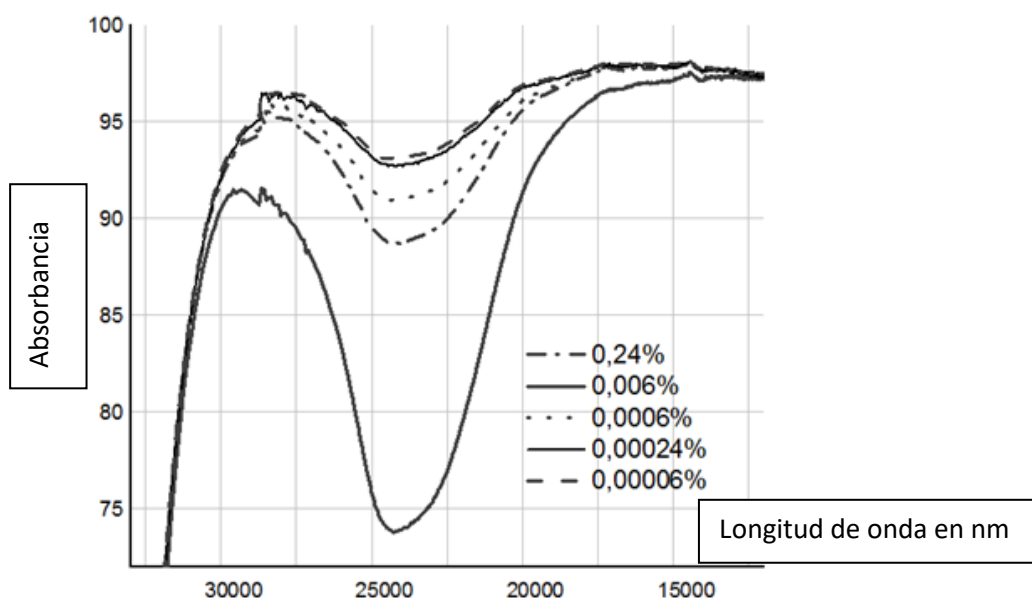


Figura 20. Espectros de UV-Visible de Argovit de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5% y 20%.

El aumento de concentración de las nanopartículas de plata de 0.3% hasta 20%, aumenta la intensidad del espectro, pero no resulto al cambio considerablemente la forma del espectro e intensidad relativa de los 3 tipos de bandas.

Resultados de la caracterización de las nanopartículas de plata (Argovit) al 0.3%, 3%, 5%, 10% y 20% por espectroscopia electrónica de transmisión (TEM).

En la figura 21 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.03% de Argovit con el lote B001077. Totalmente se contó 263 partículas. El valor promedio del tamaño es: $38.3 \pm 11.5 \text{ nm}$.

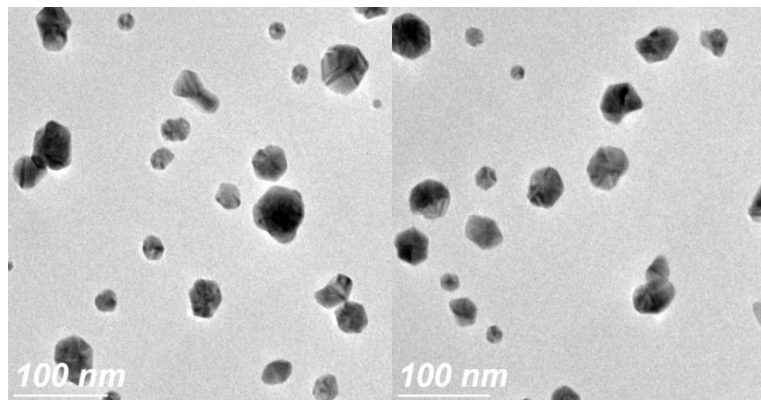
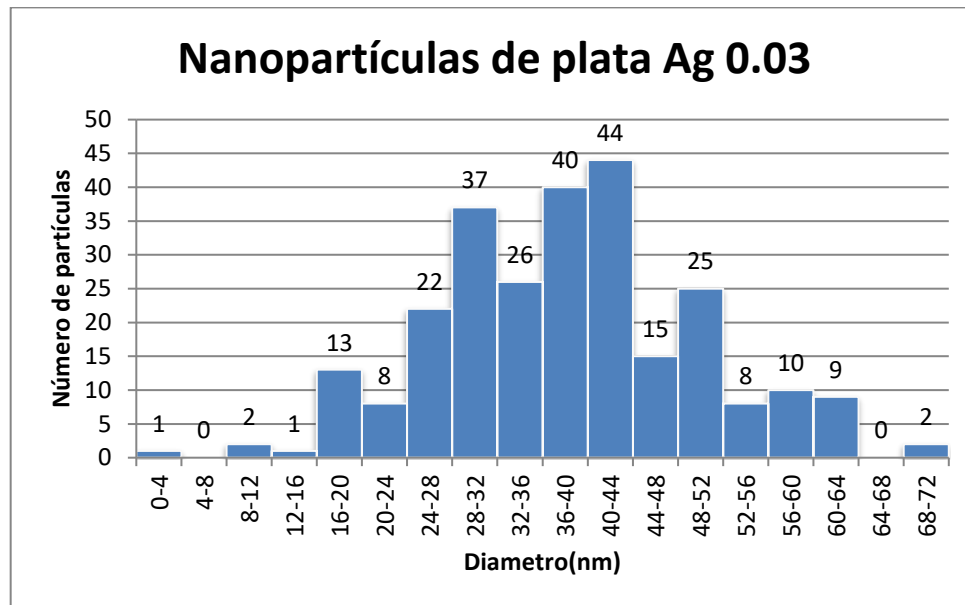


Figura 21. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 0.3% del lote B001077.

En la gráfica 21 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit. Totalmente se contó 263 partículas. El valor promedio del tamaño es: $38.3 \pm 11.5 \text{ nm}$.



Gráfica 1. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 0.3% de Argovit con el lote B001077.

En la figura 22 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078. Totalmente se contó 244 partículas. El valor promedio del tamaño es: $36.0 \pm 12 \text{ nm}$.

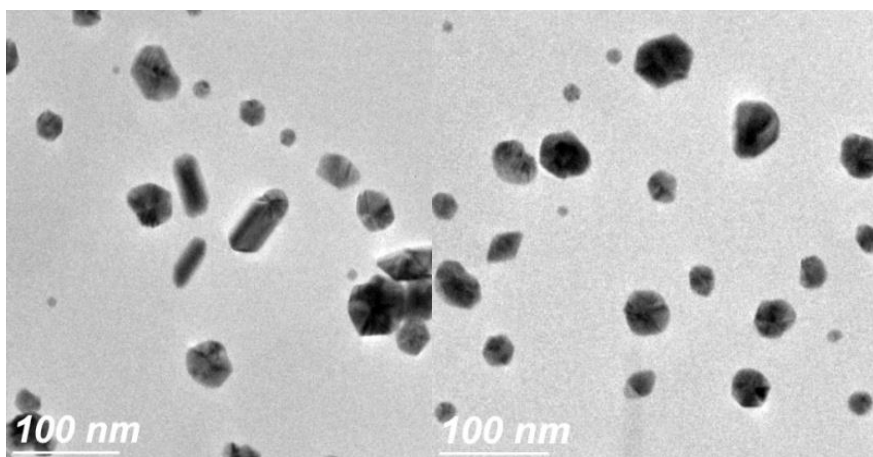
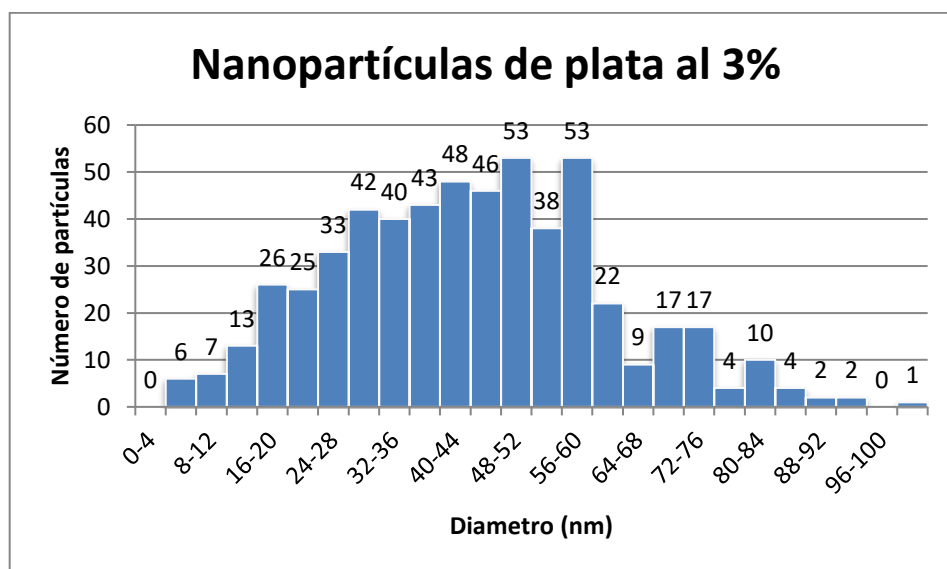


Figura 22. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 3% del lote B001078.

En la gráfica 2 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit. Totalmente se contó 244 partículas. El valor promedio del tamaño es: $36.0 \pm 12 \text{ nm}$.



Gráfica 2. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 3% de Argovit con el lote B001078.

En la figura 23 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079. Totalmente se contó 223 partículas. El valor promedio del tamaño es: $34.0 \pm 12.5 \text{ nm}$.

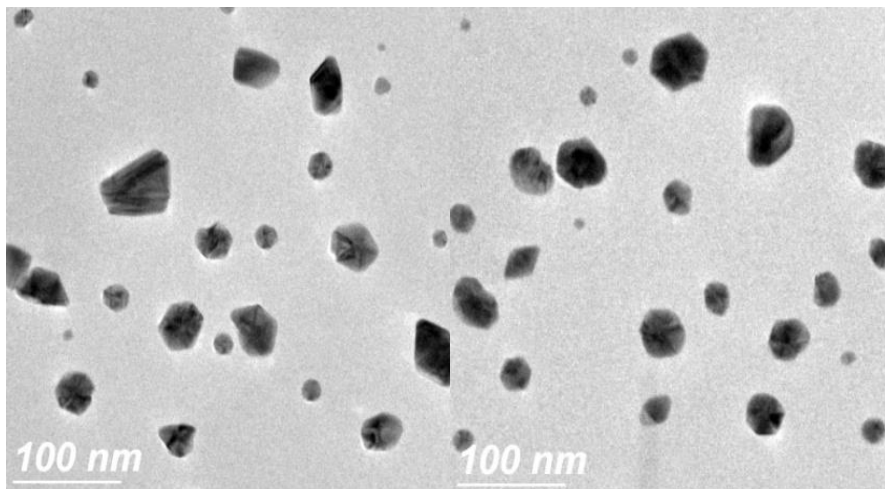
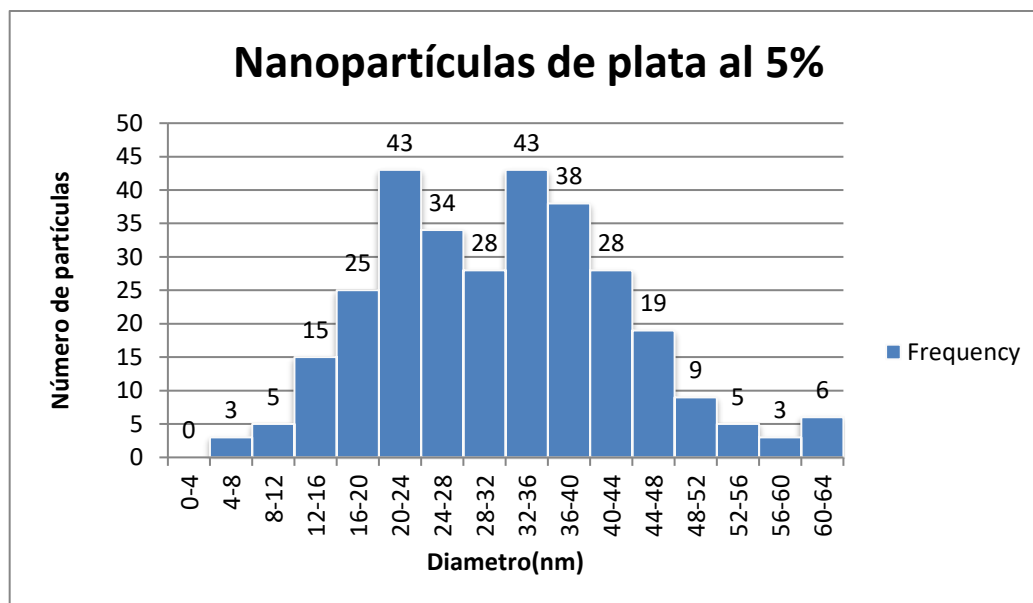


Figura 23. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 5% del lote B001079.

En la gráfica 3 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit. Totalmente se contó 223 partículas. El valor promedio del tamaño es: $34.0 \pm 12.5 \text{ nm}$.



Gráfica 3. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 5% de Argovit con el lote B001079.

En la figura 24 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit. Totalmente se contó 561 partículas. El valor promedio del tamaño es: $40.0 \pm 15.3 \text{ nm}$.

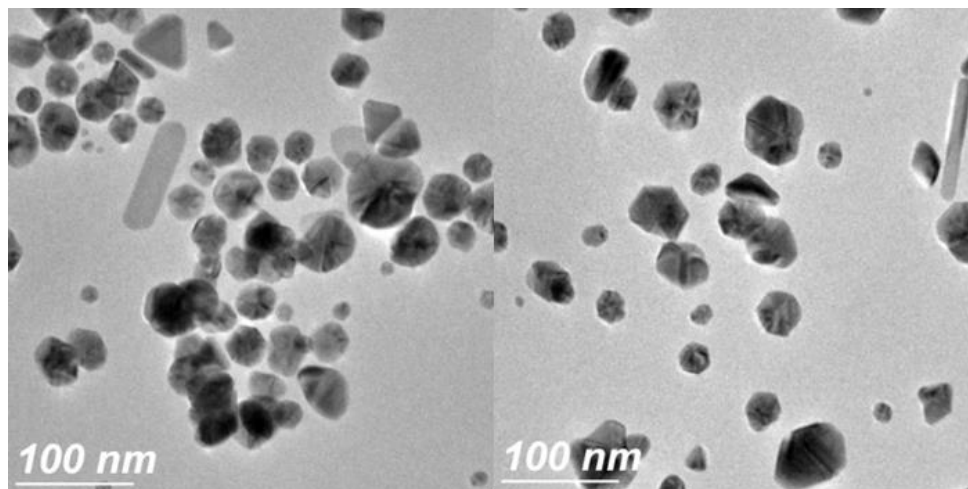
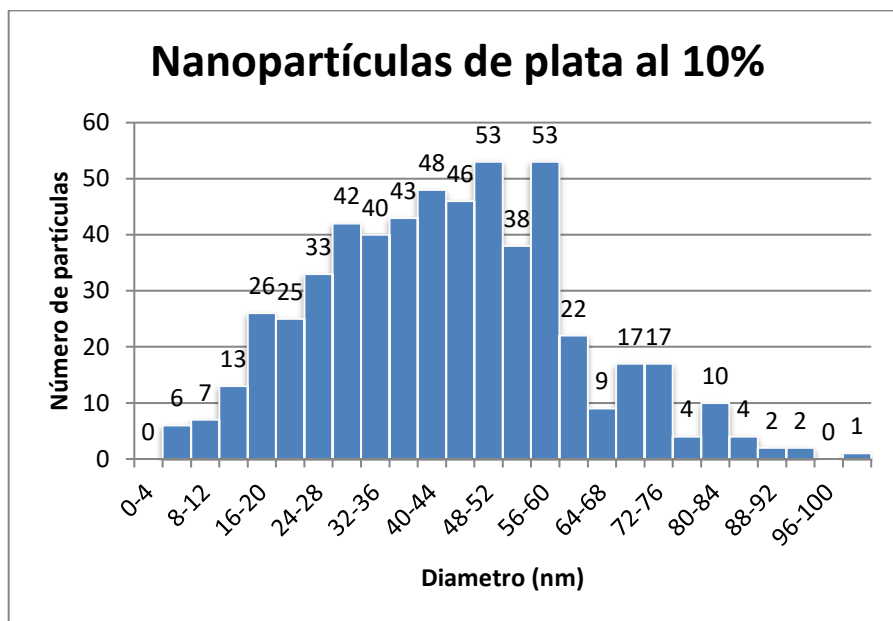


Figura 24. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 10% del lote B001066.

En la gráfica 4 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit. Totalmente se contó 561 partículas. El valor promedio del tamaño es: $40.0 \pm 15.3 \text{ nm}$.



Gráfica 4. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 10% de Argovit con el lote B001066.

En la figura 25 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit. Totalmente se contó 422 partículas. El valor promedio del tamaño es: $44.4 \pm 17.8 \text{ nm}$.

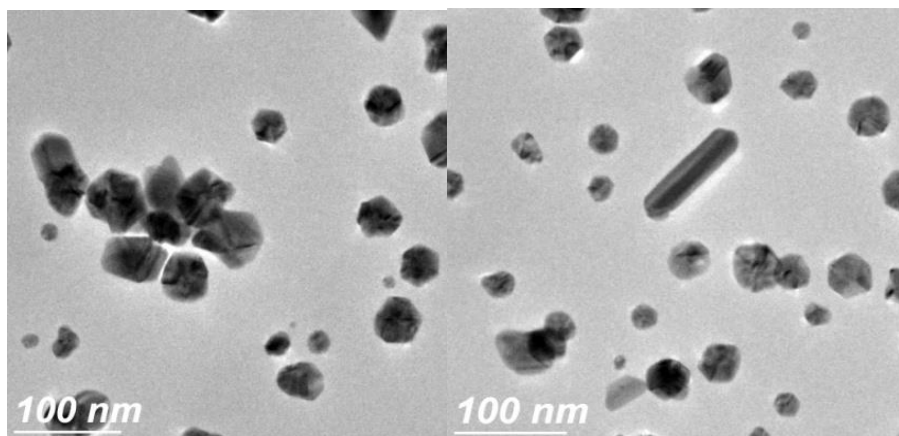
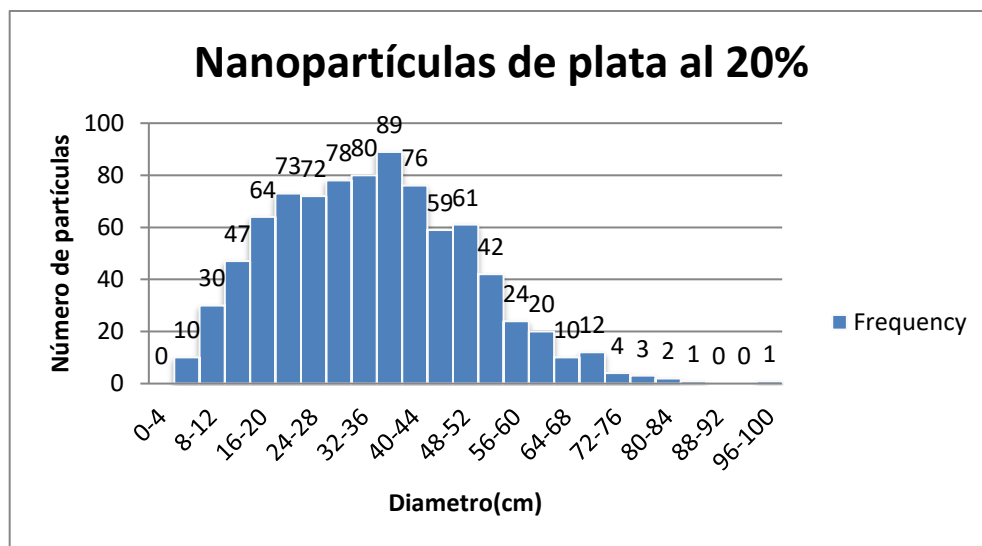


Figura 25. Se presenta una imagen de TEM para las nanopartículas de plata al 20% del lote B001067.

En la gráfica 5 se presenta la distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit. Totalmente se contó 422 partículas. El valor promedio del tamaño es: $44.4 \pm 17.8 \text{ nm}$.



Gráfica 5. Distribución del número de nanopartículas de plata por tamaño para la concentración 20% de Argovit con el lote B001067.

Anexo II. Fotografías de cultivos de nanopartículas de plata CMI y CMB.

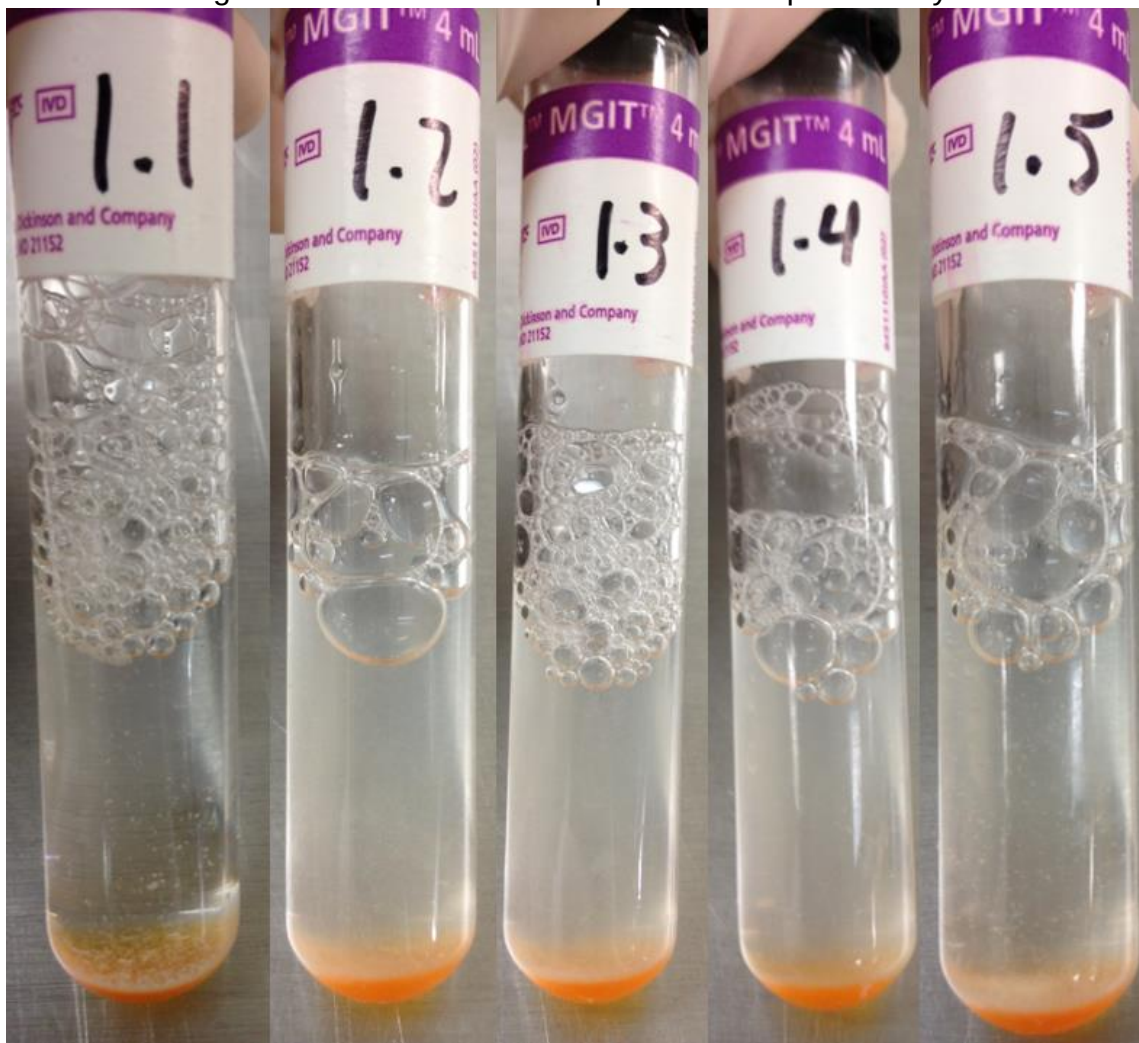


Figura 26 Tubos de cultivo liquido 1.1-1.5 después de tres semanas de incubación. CMI.



Figura 27 Tubos de cultivo líquido 2.1-2.5 después de tres semanas de incubación. CMI.



Figura 28. Tubos de cultivo líquido 3.1-3.5 después de tres semanas de incubación. CMI.

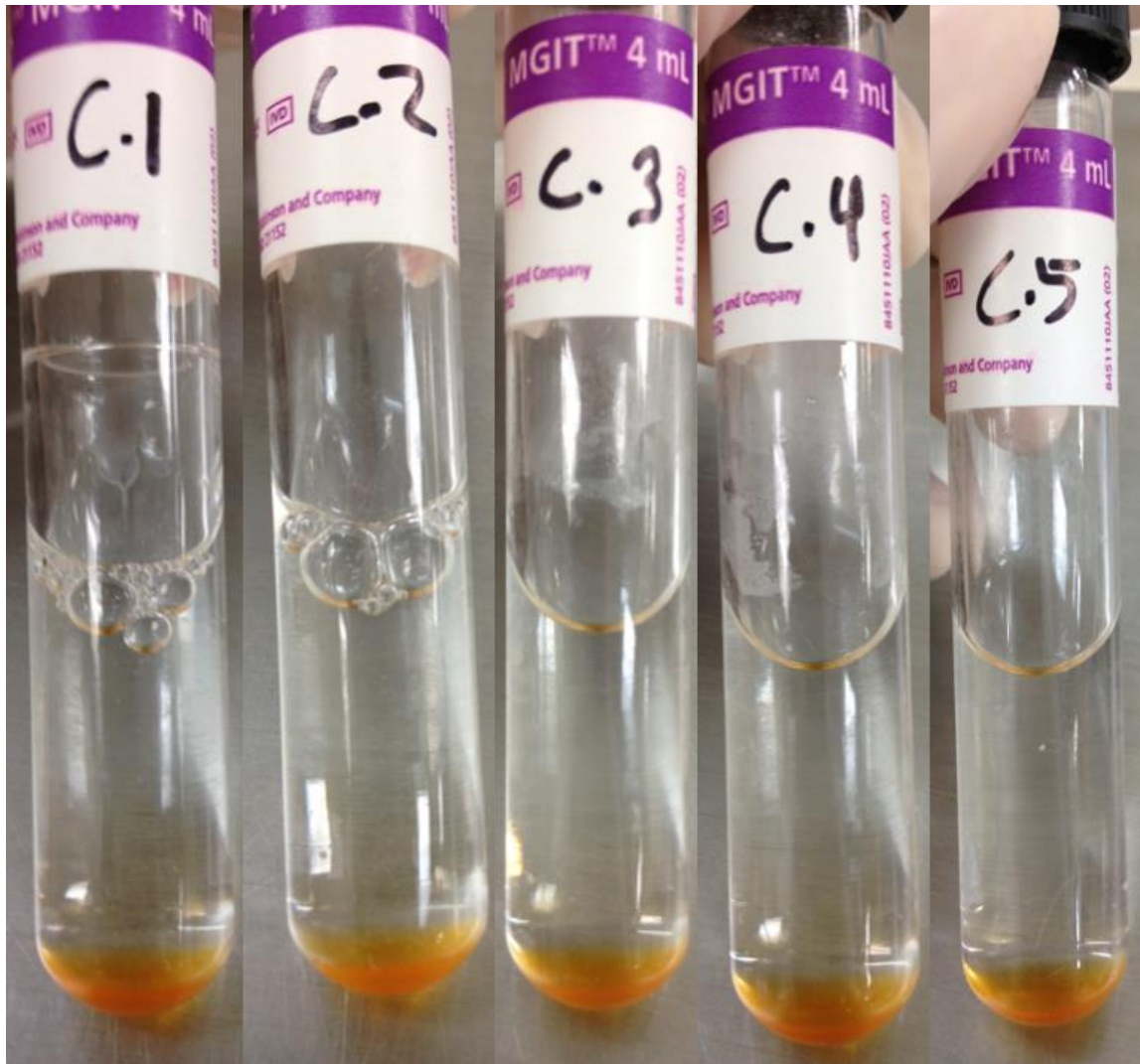


Figura 29 Tubos de cultivo líquido C.1-C.5 después de tres semanas de incubación. CMI.



Figura 30 Control positivo con cepa de referencia y control negativo sin inocular.

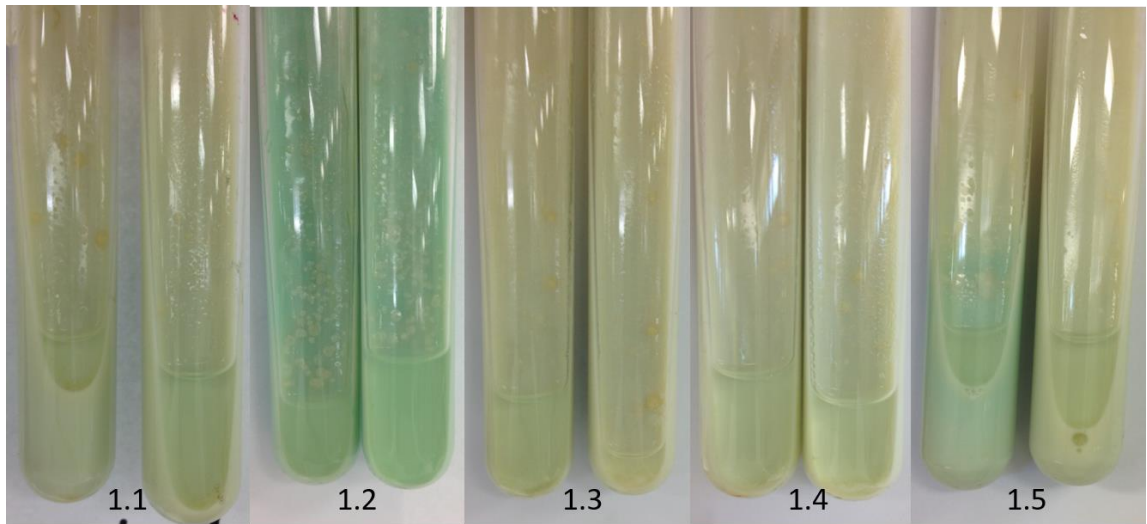


Figura 31. Cultivos CMB tubos 1.1-1.5. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

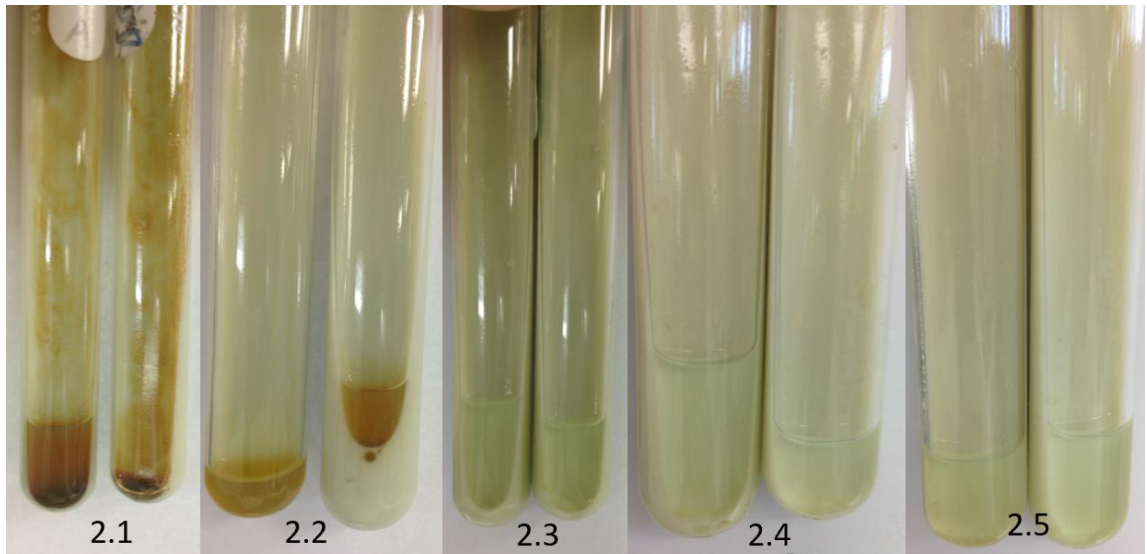


Figura 32. Cultivos CMB tubos 2.1-2.5. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y nanopartículas de plata.

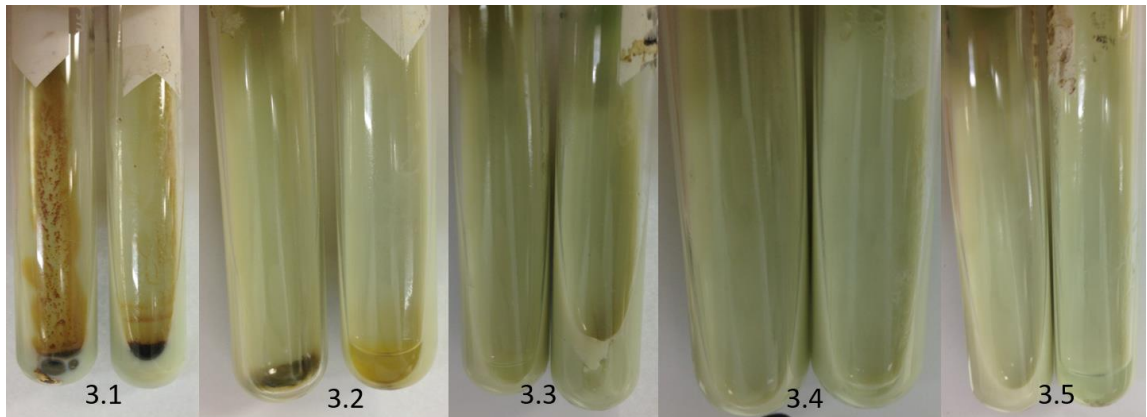


Figura 33. Cultivos CMB tubos 3.1-3.5. Control solamente nanopartículas de plata.