

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**INSTITUTO DE INGENIERIA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“Caracterización del Mecanismo de Adhesión Bacteriana sobre  
Implantes Médicos Intravasculares”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:  
**Maestro en Ciencias**

Presenta:  
**Diana Isabel Lizcano Montealegre**

Director:  
**Dra. Mónica Carrillo Beltrán**

Mexicali, B.C. Marzo de 2009

## *Agradecimientos*

*Después de recorrer un largo camino, sobrepasar dificultades y alcanzar la madurez que requirió poder llegar al momento en que me encuentro hoy, doy por concluida esta tesis de maestría, la cual es símbolo del crecimiento tanto en mi vida profesional como personal y no hubiera sido posible sin el apoyo y colaboración de muchas personas e instituciones, a las cuales quiero dar mis más sinceros agradecimientos:*

*A mis padres Jorge Enrique Lizcano y Olga Montealegre y mi hermana Olga Lucía Lizcano, quienes han sido el motor de mi vida y me han apoyado en todo aspecto. Gracias por creer en mí, por todos sus consejos y por estar siempre conmigo a pesar de la distancia. A ustedes debo en gran parte que el sueño de continuar con mis estudios de posgrado dejara de ser sólo una posibilidad y se convirtiera en un hecho.*

*A mis demás familiares, por que igualmente han sido parte importante en mi vida y desde que inicié este viaje, me han brindado su apoyo incondicional.*

*A mi gran amiga Marcela Ovalle, quien fue parte fundamental en este proceso al conectarme con la universidad, y quien me abrió las puertas de su casa para hacer este sueño posible.*

*A la Dra. Mónica Carrillo, el Dr. Benjamín Valdez y la Dra. Sara Ojeda, quienes me abrieron las puertas del Instituto de ingeniería de la UABC y me guiaron y apoyaron profesionalmente durante mis estudios, al igual que en el desarrollo de esta tesis.*

*Al Dr. Fernando López Neblina, de quien en corto tiempo aprendí varias cosas y además fue pieza fundamental en el desarrollo de esta tesis gracias a su gran experiencia y conocimiento en el campo de la medicina.*

*A mi esposo Daniel Villeda, el amor de mi vida, quien un día se cruzó en mi camino y desde entonces no ha dejado de brindarme su apoyo y comprensión. Espero que en el camino que continuaremos juntos te sigas sintiendo tan orgulloso de mí como hasta ahora.*

*A la UABC y al CONACYT, por permitirme continuar con mi formación profesional y por el apoyo económico que hizo posible mi estancia en Mexicali-BC, al igual que el desarrollo y culminación de esta tesis de maestría.*

*A mis buenos amigos: Daniel Saucedá, Sayuri Kiyota e Irene Carrillo, al igual que a mis demás compañeros e investigadores del instituto, quienes de una u*

*otra manera me tendieron su mano y con quienes compartí momentos muy importantes y alegres en estos últimos dos años. Los extrañaré mucho.*

*Por último no puedo dejar de mencionar mi tierra natal, Colombia, donde pasé los años más importantes de mi vida y donde recibí la pauta para lograr lo que he alcanzado hasta ahora. Quiero dejar tu nombre siempre en alto. Colombia tierra querida, aunque halla elegido vivir lejos de todo lo bello que tienes y añoro tanto, te llevo siempre en mi corazón.*

# CONTENIDO

	Página
Agradecimientos.....	iii
Contenido.....	v
Listado de Tablas.....	viii
Listado de Figuras.....	x
Resumen.....	2
Objetivos.....	4
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Implantes Intravasculares Metálicos (STENTS).....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Clasificación .....	13
2.1.2 Relación de los stents con el desarrollo de infecciones .....	16
2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.1.4 Proteínas que median la adherencia del <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
<b>2.2 Tendencia de los microorganismos a la formación de biopelículas.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Biopelículas.....	25
2.2.2 Proceso para la formación de biopelículas.....	26
2.2.3 Factores que condicionan la adhesión bacteriana .....	28
2.2.4 Función del quorum sensing en la formación de biopelículas.....	31
2.2.5 Relación de las biopelículas con el desarrollo de infecciones.....	31
2.2.6 Técnicas para la generación de biopelículas.....	33
2.2.7 Técnicas para el análisis de biopelículas.....	39
<b>3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Activación de la cepa de <i>staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 .....</b>	<b>45</b>

3.1.1 Reconstitución y almacenamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 .....	45
3.1.2 Curvas de crecimiento y calibración de <i>Staphylococcus auerus</i> .....	46
3.1.3 Caracterización por espectroscopia infrarrojo (ATR-FTIR) y observación de componentes celulares por microscopía de fuerza atómica (AFM) de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
<b>3.2 Desarrollo y caracterización de la biopelícula</b> .....	55
3.2.1 Generación de la biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando un sistema estático .....	55
3.2.2 Generación de la biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando un sistema de flujo.....	57
3.2.3 Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).....	61
3.2.4 Cuantificación de azúcares y proteínas durante el desarrollo de biopelículas.....	62
3.2.5 Análisis de la biopelícula por microscopía de barrido electrónico (SEM).....	66
3.2.6 Análisis de la biopelícula por rayos de X de electrones dispersados (EDS).....	67
3.2.7 Caracterización de la biopelícula por espectroscopia infrarrojo (ATR-FTIR).....	67
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	68
<b>4.1 Activación de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213</b> .....	69
4.1.1 Reconstitución y almacenamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
4.1.2 Curvas de crecimiento y calibración de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	71
4.1.3 Caracterización por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (ATR-FTIR) y observación microscopía de fuerza atómica (AFM) de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	82

<b>4.2 Desarrollo y caracterización de la biopelícula</b> .....	84
4.2.1. Generación de la biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando un sistema estático.....	84
4.2.2. Generación de la biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizando un sistema de flujo.....	91
4.2.3. Cuantificación de azúcares y proteínas durante el desarrollo de biopelículas.....	95
4.2.4. Análisis de la biopelícula por microscopía de barrido electrónico (SEM).....	98
4.2.5. Análisis de la biopelícula por rayos de X de electrones dispersados (EDS).....	101
4.2.6. Caracterización de la biopelícula por espectroscopía infrarrojo (ATR-FTIR).....	105
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	109
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	113
GLOSARIO.....	122
ANEXO.....	125

## LISTADO DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1</b> Composición metálica de implantes intravasculares .....	13
<b>Tabla 2</b> Casos reportados de infección relacionados con la colocación de stents.....	17
<b>Tabla 3</b> Patologías asociadas al desarrollo de biopelículas .....	32
<b>Tabla 4</b> Estudios realizados induciendo bacteriemia por vía intravenosa.....	38
<b>Tabla 5</b> Soluciones estándar de glucosa.....	62
<b>Tabla 6</b> Soluciones estándar de albúmina bovina para la curva de calibración utilizando el método de Bradford.....	64
<b>Tabla 7</b> Soluciones estándar de albúmina bovina para la curva de calibración utilizando el método de absorción UV.....	65
<b>Tabla 8</b> Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos gram positivos.....	71
<b>Tabla 9</b> Tabla comparativa de los datos obtenidos en las curvas de crecimiento realizadas con diferentes soluciones.....	75
<b>Tabla 10</b> Lecturas de DO y UFC/mL obtenidas para diferentes diluciones de <i>S. aureus</i> en caldo infusión cerebro corazón.....	76
<b>Tabla 11</b> Valores de DO y UFC/mL para la curva de calibración de <i>S. aureus</i> en pool de suero humano con ajuste del inóculo.....	78
<b>Tabla 12</b> Diluciones realizadas a partir de una suspensión bacteriana ajustada a una DO de 0,17 ( $10^9$ UFC/mL) para la lectura de DO por triplicado.....	80
<b>Tabla 13</b> Resultados obtenidos para la curva de calibración en solución de Hartman.....	81
<b>Tabla 14</b> Conteo de UFC/mL en muestras de sangre total inoculadas con <i>S. aureus</i> , en diferentes periodos de tiempo.....	89
<b>Tabla 15</b> Cuantificación de azúcares y proteínas por métodos colorimétricos en las muestras analizadas para el sistema estático.....	96
<b>Tabla 16</b> Cuantificación de azúcares y proteínas por métodos colorimétricos en las muestras analizadas para el sistema de flujo.....	98

<b>Tabla 17</b> Asignación de los picos observados en los espectros IR de las figuras 55 y 56.....	106
--	-----

## LISTADO DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Diagrama esquemático de la colocación de un stent en una arteria coronaria.....	10
<b>Figura 2</b> Tipos de Stents aprobados por la FDA.....	14
<b>Figura 3</b> Stent de Gaspard.....	15
<b>Figura 4</b> Cocos gram positivos y cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
<b>Figura 5</b> Peptidoglucano de la pared celular de <i>S. aureus</i> .....	20
<b>Figura 6</b> Estructura global de la pared celular gram positiva.....	21
<b>Figura 7</b> Proceso de formación de una biopelícula.....	26
<b>Figura 8</b> Mecanismos de dispersión para formación de biopelículas de tres especies diferentes.....	30
<b>Figura 9</b> Formación de un complejo ligando receptor de un ligando bacteriano con el sitio de unión de determinada proteína.....	31
<b>Figura 10</b> Diagrama una biopelícula de importancia clínica.....	33
<b>Figura 11</b> Sistemas de flujo para el desarrollo de biopelículas.....	36
<b>Figura 12</b> Explicación gráfica del funcionamiento de un microscopio de barrido electrónico.....	41
<b>Figura 13</b> Representación gráfica del microscopio de fuerza atómica (AFM).....	42
<b>Figura 14</b> Representación gráfica de la prueba del inóculo.....	48
<b>Figura 15</b> Diluciones seriadas 1:10 realizadas para la curva de calibración en infusión cerebro corazón.....	50
<b>Figura 16</b> Diluciones seriadas 1:100 a partir de una suspensión bacteriana $10^9$ en solución de Hartman.....	53
<b>Figura 17</b> Esquema de las diluciones seriadas 1:10, realizadas para determinar la DO y el recuento de UFC/mL en cada suspensión.....	54
<b>Figura 18</b> Sistema estático.....	56
<b>Figura 19</b> Preparación de la arteria.....	58
<b>Figura 20</b> Fijación de la arteria.....	58
<b>Figura 21</b> Baño de tejidos.....	59

<b>Figura 22</b>	Sistema de flujo.....	60
<b>Figura 23</b>	Almacenamiento de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213 a -20°C.....	69
<b>Figura 24</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
<b>Figura 25</b>	Coloración de gram del <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	70
<b>Figura 26</b>	Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> utilizando infusión cerebro corazón, suero inactivado, suero sin inactivar y solución Ringer-Lactato.....	72
<b>Figura 27</b>	Conteo de UFC/mL de <i>S. aureus</i> en la prueba del inóculo.....	75
<b>Figura 28</b>	Curva calibración de <i>S. aureus</i> en caldo infusión cerebro corazón.....	76
<b>Figura 29</b>	Curvas de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en pool de suero humano con ajuste de inóculo.....	78
<b>Figura 30</b>	Curva de calibración de <i>S. aureus</i> en pool de suero humano con ajuste de inóculo.....	79
<b>Figura 31</b>	Curva de calibración en solución de Hartman, enfrentando la DO con el conteo de UFC/mL.....	81
<b>Figura 32</b>	Espectro ATR-FTIR obtenido de <i>S. aureus</i> ATCC 29213.....	83
<b>Figura 33</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo al inicio del experimento (t=0).....	84
<b>Figura 34</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 24 horas.....	85
<b>Figura 35</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 48 horas.....	86
<b>Figura 36</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 72 horas.....	86
<b>Figura 37</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 96 horas.....	87
<b>Figura 38</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 120 horas.....	87
<b>Figura 39</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 144 horas.....	88
<b>Figura 40</b>	Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 168 horas.....	88
<b>Figura 41</b>	Procedimiento quirúrgico de roedores.....	91
<b>Figura 42</b>	Preparación de la arteria para su adaptación al sistema de flujo.....	92
<b>Figura 43</b>	Sistema de flujo puesto en funcionamiento.....	93
<b>Figura 44</b>	Coloración de Wright de la muestra tomada a la hora 1 en el sistema de flujo.....	93
<b>Figura 45</b>	Observación por microscopía óptica durante el monitoreo del sistema de flujo a las 12 horas y 24 horas.....	94
<b>Figura 46</b>	Proceso para el retiro del stent.....	95

<b>Figura 47</b>	Espectros obtenidos en la región 900-190, en donde se muestran los picos máximos de absorción de la proteína BSA 1mg/ml, colorante y complejo colorante-proteína.....	97
<b>Figura 48</b>	Observación por SEM de las muestras obtenidas a partir del sistema estático.....	99
<b>Figura 49</b>	Observación por SEM del stent colocado en el sistema de flujo.....	100
<b>Figura 50</b>	Análisis por EDS del fragmento de Nitinol sumergido en sangre total sin inocular.....	101
<b>Figura 51</b>	Análisis por EDS del fragmento de Nitinol sumergido en sangre total inoculada con <i>S. aureus</i> .....	102
<b>Figura 52</b>	Análisis de EDS del agregado formado en la superficie del stent colocado en el sistema de flujo.....	103
<b>Figura 53</b>	Análisis de EDS de la biopelícula formada en el stent colocado en el sistema de flujo.....	104
<b>Figura 54</b>	Análisis de EDS a un mayor acercamiento, de la biopelícula formada en el stent colocado en el sistema de flujo.....	105
<b>Figura 55</b>	Espectro IR del coagulo formado en la superficie del stent a las 12 horas de la adición del inóculo al sistema de flujo.....	107
<b>Figura 56</b>	Espectro IR del material obtenido posterior a la sonicación del stent retirado del sistema de flujo.....	108

---

# Capítulo 1

---

## Introducción

---

## RESUMEN

Actualmente el uso de dispositivos intravasculares metálicos va en aumento, debido a las ventajas que hoy en día ofrece su tecnología. Sin embargo, el proceso de colocación, como todo procedimiento invasivo, sirve como vía de infección para cualquier microorganismo, especialmente aquellos de importancia nosocomial. El proceso de adhesión bacteriana a la superficie de biomateriales es un paso importante en la patogénesis de infecciones causadas por la formación de biopelículas en implantes médicos. El comportamiento de adhesión microbiana a ciertas superficies ha sido observado y estudiado durante años, por lo que hoy en día se entiende que dicha tendencia favorece su sobrevivencia, debido a que los nutrientes en un ambiente acuoso tienden a concentrarse cerca de las superficies sólidas. Dentro de las especies bacterianas, asociadas con infección posterior a la colocación de stents, se encuentra el *Staphylococcus aureus*, el cual presumiblemente inicia el proceso de colonización a través de la piel durante su colocación. El presente estudio tuvo como fin desarrollar un sistema *in-vitro*, que simulara condiciones fisiológicas que permitieran comprobar y caracterizar el desarrollo de biopelículas de *Staphylococcus aureus* en sangre total. En la etapa inicial se obtuvieron las curvas de crecimiento y calibración, hasta estandarizar el inóculo de partida en una concentración de  $10^3$  UFC/mL. Posteriormente se evaluó la adherencia de proteínas y materia orgánica sobre la superficie de un stent de Nitinol, en ausencia y en presencia del microorganismo, utilizando tanto un sistema estático como un sistema de flujo. A través de recuentos bacterianos realizados cada 24 horas, fue posible monitorear la concentración y viabilidad de *S. aureus* en sangre. Mediante microscopía de barrido electrónico (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) y microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés Atomic Force Microscopy), se observó la morfología de la biopelícula generada, mientras que su caracterización bioquímica se realizó con espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, utilizando el accesorio de

reflectancia total atenuada (ATR-FTIR, por sus siglas en inglés Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared), análisis de rayos X de electrones dispersados (EDS, por sus siglas en inglés Energy Dispersive X-Ray spectroscopy) y análisis químico cuantitativo por técnicas colorimétricas y absorción ultravioleta.

Las curvas de crecimiento obtenidas, mostraron el buen desempeño del *S. aureus* cuando crece en suero, y los análisis realizados posteriormente en sangre total *ex-vivo*, no sólo demostraron la capacidad del microorganismo de desarrollarse en dicho medio, sino también, que a pesar de que éste induce el proceso de coagulación, es capaz de formar la biopelícula en el interior del coagulo. Lo anterior fue comprobado por las imágenes de SEM obtenidas, el análisis colorimétrico que mostró la presencia de azúcares y proteínas, con una mayor proporción de azúcares debido a la generación de exopolisacáridos por parte de la bacteria. Los análisis de EDS y ATR-FTIR, confirmaron la presencia de componentes orgánicos, concluyendo finalmente que además de las sustancias exopoliméricas extracelulares (EPS) generadas durante proceso de formación de las biopelículas, las proteínas plasmáticas, también jugaron un papel importante en el acondicionamiento de las superficies de Nitinol y en el proceso de unión del *S. aureus* a las mismas.

## OBJETIVO

Caracterizar el proceso de formación de biopelícula por *Staphylococcus aureus* sobre superficies metálicas utilizadas en implantes médicos intravasculares.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reconstituir, conservar y confirmar las características de crecimiento y composición bioquímica de la pared celular de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- Diseñar un sistema de flujo que simule condiciones fisiológicas para el desarrollo de un proceso bacterémico causado por *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
- Generar una biopelícula de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sobre un implante intravascular metálico, en un sistema *in-Vitro*.
- Caracterizar la formación de la biopelícula e identificar los mecanismos relacionados con la adhesión bacteriana sobre el implante médico intravascular metálico.

**Hipótesis:** Los implantes médicos intravasculares metálicos, propician la adherencia de microorganismos en su superficie con la consecuente formación de biopelículas.

# 1. INTRODUCCIÓN

La adhesión bacteriana a la superficie de biomateriales es el paso esencial en la patogénesis de las infecciones recurrentes causadas por el uso extendido de implantes intravasculares, debido a que su compleja estructura, resiste la acción del sistema inmunológico del huésped, sobre las células bacterianas que se encuentran al interior de una biopelícula. Asimismo disminuye significativamente la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Se ha establecido que la velocidad de unión celular depende del número y tipo de células que se encuentren en el medio líquido al cual el implante está expuesto, la velocidad de flujo del medio líquido a través del implante y las características fisicoquímicas de la superficie. Una vez que los microorganismos se unen irreversiblemente, producen Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS, del inglés Extracellular Polymeric Substances) para formar una biopelícula. Posteriormente la tasa de flujo estará influenciada por la velocidad de flujo, la carga nutritiva del medio, la concentración de medicamentos antimicrobianos y la temperatura<sup>[1]</sup>.

El campo de los implantes intravasculares tiene el potencial de mejorar la capacidad terapéutica de los tratamientos endovasculares, debido a que su tecnología presenta grandes ventajas en cuanto a la facilidad de su colocación, gracias a la gran flexibilidad que permite alcanzar incluso la circulación intracraneal. Sin embargo, como todo procedimiento invasivo, el proceso de colocación tiene el riesgo de servir como vía de infección para cualquier microorganismo, especialmente aquellos de importancia nosocomial. El desarrollo de infecciones aparece como el principal impedimento para el uso a largo plazo de implantes y dispositivos intravasculares, tales como prótesis, válvulas cardíacas, catéteres vasculares, lentes de contacto y dentaduras<sup>[2]</sup>. Las infecciones causadas por la formación de biopelículas en implantes médicos, puede tener resultados catastróficos tanto físicos como fisiológicos para los

pacientes, debido a que puede traer como consecuencia la prolongación del tiempo de hospitalización, una posible amputación e incluso causar la muerte. Dentro de las especies bacterianas comúnmente aisladas a partir de implantes médicos, se encuentran bacterias Gram positivas como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus viridans*; y dentro del grupo de bacterias Gram negativas se encuentran: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, las infecciones causadas por estos microorganismos, pueden iniciar el proceso de colonización a través de la piel, durante la manipulación por parte del personal médico o por diferentes factores ambientales<sup>[1]</sup>. Sin embargo el panorama clínico refleja que aún no está muy claro el tiempo que puede tardar el desarrollo de infecciones a partir de un implante colonizado por bacterias. Algunas observaciones muestran que el periodo de tiempo podría variar entre días, semanas, meses e incluso años<sup>[3-8]</sup>.

Aún conociendo las interacciones moleculares y físicas que permiten la adhesión bacteriana a biomateriales, todos los mecanismos que comprenden la formación y función de las biopelículas no han sido comprendidos en detalle, al igual que el gran impacto que pueden tener en el campo clínico. Hasta el momento se sabe que su formación favorece el desarrollo de infecciones recurrentes y la resistencia a agentes antimicrobianos, dejando como única opción la intervención quirúrgica, con el fin de controlar la infección, ya sea limpiando o cambiando el implante médico.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el presente proyecto tuvo como finalidad, caracterizar el mecanismo de dicha adhesión bacteriana y la generación de una biopelícula sobre superficies metálicas de implantes médicos intravasculares (stents), haciendo uso de las técnicas: **1) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**, la cual ha sido ampliamente utilizada en la observación en tiempo real de estructuras celulares, al igual que la observación de procesos biológicos<sup>[9]</sup>. De la misma forma ha sido utilizada en la medición de fuerzas de

adhesión celular<sup>[10]</sup>, y en la observación de las características topográficas y morfológicas de algunas superficies<sup>[11]</sup>. **2)** Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), **3)** Análisis de Rayos X de Electrones Dispersados (EDS), **4)** Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier utilizando el accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR), para caracterizar la superficie de la biopelícula y su composición bioquímica, y **5)** Análisis químico cuantitativo mediante espectroscopía de absorción ultravioleta.

La cepa seleccionada para el estudio fue *Staphylococcus aureus*, debido a que es uno de los microorganismos reportados con mayor frecuencia en infecciones de origen nosocomial. En casos clínicos reportados en los últimos años, se ha encontrado relacionado con la colonización postquirúrgica de implantes médicos intravasculares, stents<sup>[3, 8, 12, 13]</sup>. La Cepa fue reconstituida y congelada a -20 Cº, con el fin de preservarla y mantener sus características genéticas durante el estudio. Su análisis detallado en el proceso de formación y composición bioquímica de la biopelícula, permitió obtener datos que contribuirán al campo de conocimiento del proceso de adhesión bacteriana sobre la superficie de implantes intravasculares metálicos (stents), y en un futuro próximo, establecer mecanismos efectivos de control, que se basen en tecnologías de modificación de superficie, con la finalidad de mitigar la recurrencia de infecciones relacionadas con el uso de los mismos.

---

# Capítulo 2

---

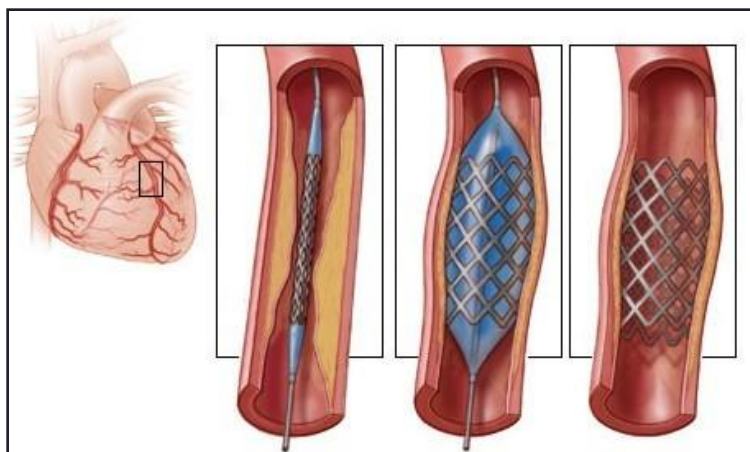
## Fundamentos Teóricos

---

## 2.1 IMPLANTES INTRAVASCULARES METÁLICOS (STENTS)

Los implantes médicos son biomateriales que según su composición química se clasifican en metálicos, plásticos o poliméricos, cerámicos y compuestos; de acuerdo con su origen en naturales y sintéticos, y según su estructura, en sólidos y porosos; sin embargo existe otra clasificación práctica que comprende los dispositivos no implantables, como sondas, catéteres, globos angioplásticos, y los dispositivos implantables, dentro de los que se encuentran los dispositivos ortopédicos e intrauterinos, dentaduras fijas y removibles y dispositivos vasculares, como marcapasos<sup>[14]</sup> y stents, entre otros.

Los stents, son finos tubos de malla de alambre, que son colocados en el interior de arterias parcialmente bloqueadas, por medio de un procedimiento quirúrgico, denominado Angioplastia Percutánea Transluminal (APT), y tiene como finalidad, prevenir la obstrucción del flujo sanguíneo y permitir la revascularización de los tejidos en pacientes, que por diversas causas, presentan estrechez del conducto arterial, proceso que recibe el nombre de aterosclerosis. La figura 1, esquematiza el proceso de colocación de un stent, el cual consiste en insertar con ayuda de un catéter y un globo (Catéter de balón), el implante intravascular en el lugar de la arteria obstruida. Posteriormente el globo es inflado para expandir el stent y empujar la placa acumulada contra la pared de la arteria, de esta manera la arteria se mantendrá abierta y permitirá que el flujo sanguíneo pase sin dificultad. Una vez posicionado el stent, el globo es desinflado y removido junto con el catéter.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de la colocación de un stent en una arteria coronaria<sup>[15]</sup>.

El proceso de aterosclerosis ha sido descrito por Badimon, L. y Vilahur, G.<sup>[16]</sup>, de la siguiente manera: El endotelio es un órgano autocrino y paracrino, que regula las actividades secretoras, mitogénicas y contráctiles, de la pared vascular y procesos hemostáticos mediante la producción y liberación de múltiples sustancias activas. En condiciones fisiológicas, las células endoteliales exhiben múltiples propiedades antitrombóticas, y fibrinolíticas que previenen la formación de trombos. Sin embargo la exposición crónica y repetida a los factores de riesgo (infecciones virales, complejos inmunitarios, estrés hemodinámico, productos del tabaco, altas concentraciones de colesterol, enzimas eicosanoides liberadas por las plaquetas y los leucocitos en los estados de inflamación, hiperhomosisteinemia y diabetes) producen una activación/disfunción del endotelio que se caracteriza por una disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico y de todos los mecanismos fisiológicos de protección cardiovascular que de él se derivan. Dicha anomalía endotelial facilita la acumulación y la oxidación de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) en la pared, que al ser un potente estímulo inflamatorio, origina la infiltración de monocitos circulantes. Una vez en el espacio subendotelial, los monocitos se diferencian a macrófagos, que captan lípidos en gran cantidad y se transforman en células espumosas (estría grasa). Los factores de crecimiento, las citoquinas

y otras sustancias liberadas por las células endoteliales, los monocitos/macrófagos, las plaquetas y los linfocitos T, no solo agravan y favorecen el desarrollo de la lesión endotelial, sino que también potencian la migración, la proliferación y la síntesis de matriz extracelular por las células musculares lisas vasculares. El resultado es una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa crónica que hace progresar las lesiones a ateroscleróticas. Es precisamente la erosión o rotura de estas lesiones ateroscleróticas lo que induce la exposición de superficies protrombóticas que causa la adhesión, la activación y la agregación de las plaquetas, con la consiguiente formación del trombo (aterotrombosis). Dichos trombos contribuyen al crecimiento de la placa aterosclerótica de forma asintomática, lo que desencadena la patología conocida como enfermedad aterotrombótica, dentro de la que se incluyen diferentes formas de presentación según su localización, como por ejemplo la cardiopatía isquémica (Enfermedad arterial coronaria).

La enfermedad aterotrombótica es la primera causa de muerte en Europa y Estados Unidos. Aproximadamente 12.2 millones de estadounidenses son diagnosticados de enfermedad arterial coronaria, de los cuales 7,4 millones han tenido eventos de Infarto Agudo del Miocardio (IAM) y 1.4 millones de hospitalizaciones por Síndrome Coronario Agudo (SCA), originando un costo entre 100 y 120 billones de dólares al año<sup>[17]</sup>. Las enfermedades cardiovasculares, particularmente la enfermedad coronaria, constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la mayor parte del mundo. México no es la excepción: representan la primera causa de muerte, aun por arriba de las enfermedades infecciosas. En 1990, en América Latina, casi 800 defunciones fueron secundarias a IAM, es decir 25% del total de defunciones<sup>[18]</sup>.

El concepto de colocación de soportes mecánicos dentro de los vasos sanguíneos fue instaurado hace casi 90 años por Carrel, quien insertaba tubos de vidrio en arterias de perros, pero fue Dotter quien primero colocó una endoprótesis arterial en un paciente, en el año 1980. En 1997 Sigward *et. al.*,

reportaron el primer estudio en el que insertó a 19 pacientes, 24 stents autoexpandibles de acero inoxidable, con el fin de prevenir la reoclusión y restenosis de arterias coronarias. Los stents probaron su efectividad en la disminución de complicaciones tempranas de los procedimientos de APT, tales como el estrechamiento abrupto de los vasos y la restenosis tardía, que puede ocurrir en el 30 al 50% de los pacientes después de la APT. Por consiguiente, la colocación de stents también mostró disminución en la tasa de reinfarto del miocardio, cirugía de revascularización miocárdica y mortalidad. Sin embargo, a pesar del mejoramiento en la calidad y variedad de stents, se continuó observando una alta tasa de restenosis<sup>[17]</sup>. La tolerancia biológica a un implante médico intravascular, depende del fenómeno de interferencia que ocurre entre el tejido del huésped y el cuerpo extraño, el cual está condicionado por la composición y características de superficie del biomaterial, lo que determina la naturaleza inmediata o a largo plazo de la respuesta. La conformación radial y la flexibilidad longitudinal pueden afectar a largo plazo, la colocación del stent. También las características de superficie como la rugosidad, la carga eléctrica y la energía libre de superficie, son determinantes en la trombogenicidad e incorporación de tejido (restenosis), debido a que inmediatamente después de la colocación del stent, ocurren una serie de cambios que facilitan el crecimiento de las células endoteliales en la superficie del implante<sup>[19]</sup>.

Solamente en los Estados Unidos, aproximadamente un millón de stents son colocados anualmente, de los cuales el 25% sufre restenosis o recurrencia de estrechamiento arterial [20]. Por esta razón la industria de los stents sigue a la vanguardia con sofisticadas tecnologías, como es el caso de los stents liberadores de fármacos, que actualmente han contribuido en la disminución de los casos de restenosis.

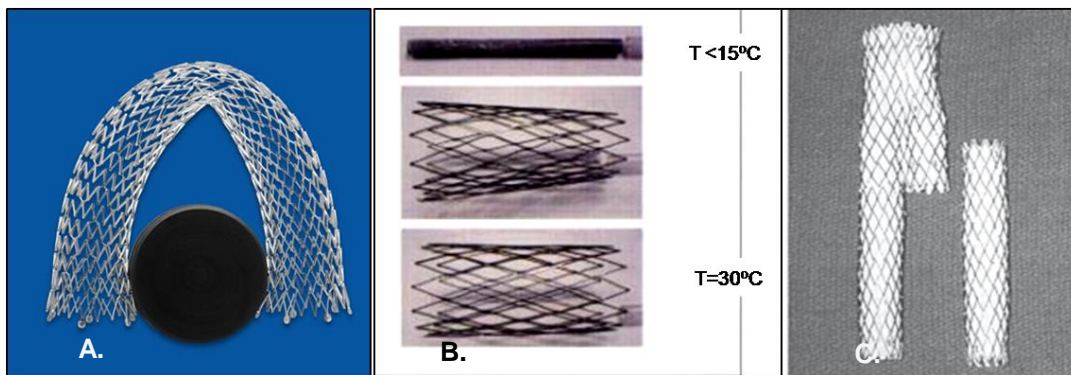
### 2.1.1 Clasificación

Los stents son clasificados en dos tipos: (1) Stents de balón expandible hechos de malla de acero inoxidable y (2) Stents auto-expandibles (sensibles a la temperatura), compuestos por metales inteligentes. Estructuralmente, los primeros, son mallas metálicas que pueden expandirse rápidamente cuando se les ejerce una alta presión con la ayuda de un catéter de balón<sup>[20]</sup>. Las aleaciones comúnmente utilizadas en la fabricación de stents, incluyen los aceros inoxidables de grado médico, serie 300, los cuales se caracterizan por que en su etapa final reciben un tratamiento electroquímico, en el cual se pule la superficie del metal para remover la mayor parte de los elementos, dejando una alta concentración de cromo. Después de exponerlo al aire y esterilizarlo, se forma una capa delgada de óxido de cromo, la cual estabiliza la superficie previniendo futuras oxidaciones<sup>[19]</sup>. Posteriormente con el mejoramiento en el diseño de los implantes intravasculares metálicos, aparece la segunda clasificación, los stents con aleaciones de memoria de forma, que contienen Níquel y Titanio (Nitinol). La tabla 1, muestra la composición metálica de los implantes intravasculares utilizados con mayor frecuencia en la actualidad.

**Tabla 1.** Composición metálica de implantes intravasculares<sup>[19]</sup>.

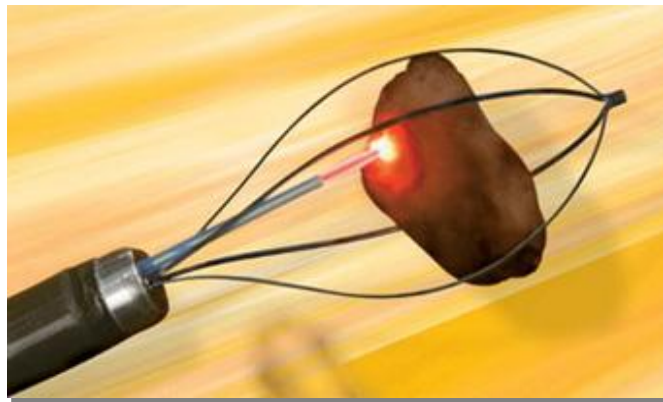
Implante médico intravascular	Composición
<b>Stent Z</b>	Acero inoxidable 304
<b>Stent Palmaz</b>	Acero inoxidable 316L
<b>Stent Medinvent</b>	Mediloy (composición desconocida)
<b>Stent Strecker</b>	Tantalio
<b>Stent Nitinol</b>	Nitinol
<b>Stent Greenfield</b>	Acero inoxidable 316L, B3, Titanio
<b>Filtro de Bird Nest</b>	Acero inoxidable 304
<b>Filtro Gunter</b>	Acero inoxidable 304
<b>Gianturco colis</b>	Acero inoxidable 304

La palabra Nitinol se debe a la composición de la aleación, Níquel (Ni): 55 wt%, Titanio (Ti): 45 wt%, y a las iniciales del laboratorio que lo descubrió, Naval Ordnance Laboratory (NOL). La memoria de forma hace referencia a las aleaciones que pueden regresar a su forma original, cuando son expuestas a cierta temperatura. Los stents de Nitinol se expanden automáticamente a la temperatura corporal (37°C), para aplicar una presión radial constante contra la pared arterial, previniendo su colapso <sup>[20]</sup>. Una ventaja de este proceso, es que dichos stents pueden ser llevados al lugar de colocación y ser desplegados con menor fuerza. Una vez en la zona de colocación, estos stents reaccionan superelásticamente al estrés y la tensión causados por la presión sanguínea y demás fuerzas externas. El primer stent metálico con estas características, fue el espiral de Nitinol hecho en 1983. Algunos ejemplos de stents aprobados por la administración de drogas y alimentos (FDA, del inglés Food and Drug Administration) incluyen el Cordis S.M.A.R.T., indicado para aplicaciones biliares; el SciMed Radius indicado para aplicaciones coronarias y el injerto intravascular metálico de Medtronic AneuRx indicado para aneurismas aórticos abdominales<sup>[21]</sup>. La figura 2, muestra un ejemplo de cada uno de los stents mencionados.



**Figura 2.** Tipos de Stents aprobados por la FDA. **A.** Stent Cordis S.M.A.R.T.<sup>[22]</sup>; **B.** Stent SciMed Radius. Esta imagen muestra como a una temperatura menor a 15°C, el stent se mantiene comprimido, y en la medida en la que se aumenta la temperatura, el stent se va expandiendo hasta desplegarse totalmente<sup>[23]</sup>; **C.** Injerto Intravascular Metálico Medtronic AneuRX<sup>[24]</sup>.

El futuro de las investigaciones en el desarrollo de implantes intravasculares continúa siendo estimulado, para mejorar la biocompatibilidad con los tejidos y componentes sanguíneos, así como disminuir los casos de trombosis y restenosis. La mayoría de las modificaciones se dirigen hacia la alteración de las superficies, lo que comprende la energía superficial, la carga eléctrica, la textura y la composición química<sup>[25]</sup>. Es así como en los últimos años se han estudiado diferentes alternativas, como es el caso de los stents reabsorbibles de ácido poliláctico, poliglicólico y recientemente el Magnesio, los cuales combinados con el efecto de remodelación del tejido ejercido por el stent, pretenden evitar el uso de implantes permanentes, creyéndose posible que con el tiempo, el stent reabsorbible haya desaparecido del área tratada<sup>[19, 26]</sup>. Por otro lado se encuentran los stents temporales y recuperables, como el stent de Gaspard, que consiste en un dispositivo de alambre de Nitinol en forma de canasta, el cual permanece adherido a un catéter después de desplegarse. Adicionalmente el catéter viene con una fibra laser que destruye el trombo capturado dentro de la canasta, como se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Stent de Gaspard, compuesto por una canasta de alambres de Nitinol y un dispositivo de fibra laser<sup>[27]</sup>.

Los esfuerzos por disminuir las propiedades trombogénicas, también han evaluado diferentes recubrimientos, los cuales pueden ser clasificados como artificiales o biológicos. Los recubrimientos artificiales pueden ser subdivididos en pasivos y activos. Los pasivos están compuestos de materiales como carbón

pirolítico y uretanos, los cuales tienen características de superficie favorables, que los hacen menos trombogénicos en comparación con los metales. Los recubrimientos activos incorporan diferentes materiales novedosos como heparina de bajo peso molecular, liberada lentamente por acción local sostenida. Por último, los recubrimientos biológicos, representados por cultivos de células endoteliales que se desarrollan sobre la superficie del stent antes de que éste sea desplegado. La utilización de células endoteliales también se ha combinado con el campo de la ingeniería genética, ya que utiliza técnicas de ADN recombinante para originar el tejido<sup>[19, 28]</sup>.

### **2.1.2 Relación de los stents con el desarrollo de infecciones.**

La colocación de cuerpos extraños es una predisposición para el desarrollo de infecciones, debido a que la invasión epitelial y de las barreras mucosas, puede propiciar el crecimiento de microorganismos y comprometer los mecanismos de defensa del huésped. La colocación de implantes médicos representa el 45% de todas las infecciones nosocomiales, por lo que es considerado uno de los factores de riesgo más importantes para este tipo de infecciones<sup>[3]</sup>. El reporte de infecciones relacionado con la colocación de stents es poco frecuente, se habla de un 1% a 5%<sup>[5]</sup>, sin embargo sus complicaciones son bastante severas. La tabla 2, resume los casos de infección de stents reportados en la literatura hasta el presente año:

**Tabla 2.** Casos reportados de infección relacionados con la colocación de stents.

Ref.*	Tipo de Stent	Tiempo de presentación después del procedimiento	Microorganismo aislado	Posición del stent	Respuesta
Gunther et al.	Palmaz- Schatz	4 semanas	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Falleció
Leory et. al.	Palmaz-Zchatz	1 semana	<i>P. aeruginosa</i>	Arteria coronaria	Falleció
Bouchart et. al.	Palmaz-Zchatz	4 días	<i>P. aeruginosa</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Grewe et. al.	AVE Microstent	4 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Falleció
Rensing et. al.	No especificado	4 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Liu et. al.	NIR	18 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Bangher et. al. <sup>[29]</sup>	Jostent Flex	24 días	SCNR** y <i>Candida spp.</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Golubev et. al.	Jomed stent recubierto	2 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Falleció
Singh et. al.	Cypher stent	4 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Hoffman et. al.	Jomed recubierto de heparina	5 días	<i>S. aureus</i>	Arteria coronaria	Sobrevivió
Therasse et. al. <sup>[13]</sup>	Palmaz-Balón expandible	10 días	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidermidis</i>	Arteria Iliaca	Falleció
Bunt Et. al. <sup>[12]</sup>	Palmaz	2 meses	<i>S. aureus</i>	Arteria Iliaca	Falleció
Dosluoglu et. al. <sup>[8]</sup>	Palmaz	3 meses	<i>S. aureus</i>	Arteria Iliaca	Sobrevivió
Dosluoglu et. al. <sup>[8]</sup>	Palmaz	4 semana	<i>S. epidermidis</i>	Vena Iliaca	Sobrevivió
Bukhari et. al. <sup>[4]</sup>	Palmaz	3 meses	<i>S. aureus</i>	Arteria Renal	Falleció

Esta tabla se basa en la documentada previamente por Kaufmann, et. al., 2005<sup>[3]</sup>.

\*Ref: Referencia.

\*\*SCNR: *Staphylococcus* Coagulasa Negativo resistente a Oxacilina.

Dentro de los posibles riesgos de infección por colocación de stents, se encuentran: la reutilización de catéteres, la contaminación de agujas con microorganismos de la piel, la formación de hematomas locales, el incremento del tiempo en el procedimiento<sup>[4]</sup>, la utilización de dispositivos para diálisis, etc. Por otro lado, las zonas de colocación de stents como las arterias aorta e iliaca, presentan una tasa de infección menor al 1%, mientras que la tasa de infección aumenta de un 2% a 5 %, cuando se trata del área inguinal<sup>[5]</sup>.

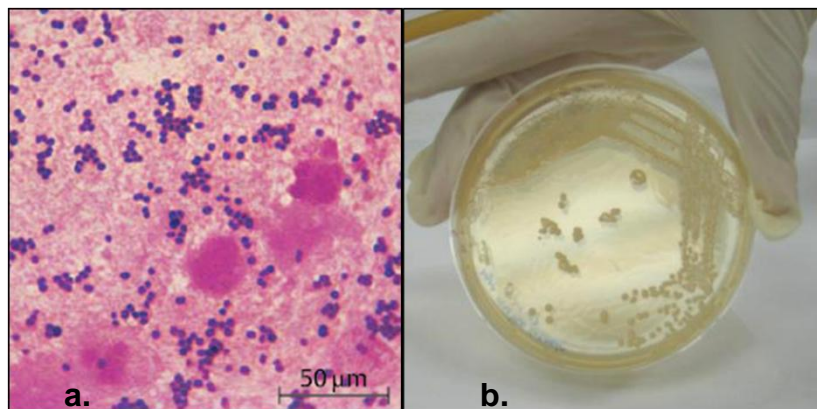
Con el fin de demostrar la infección bacteriana relacionada con el uso de stents, dos estudios realizados en modelo animal han sido reportados. Para este fin, en ambos estudios se utilizaron porcinos, a los cuales se les realizó el procedimiento de APT, a un grupo con colocación de stent y a otro sin colocación del mismo. Posteriormente les fue inyectado un inóculo bacteriano de *S. aureus*. 72 horas después de haber inoculado los animales, éstos fueron sacrificados para observar tanto los stents como las arterias intervenidas. Los resultados mostraron señales de inflamación y cultivos bacterianos positivos. Finalmente se concluyó que es necesario llevar a cabo futuros estudios que permitan evaluar, de forma más certera, la incidencia de dichas infecciones en humanos<sup>[6, 7]</sup>.

Datos obtenidos por el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales en Inglaterra, mostraron que el *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) es el patógeno reportado con mayor frecuencia aislado como causante de bacteriemia en los pacientes de las unidades de cuidados intensivos (37.3% comparado con el 12.6% para *Staphylococcus aureus*)<sup>[30]</sup>. En contraste con los anteriores hallazgos, se ha encontrado que las bacterias comúnmente aisladas de implantes médicos, incluyen las bacterias gram positivas: *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus viridans*; y las bacterias gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[31]</sup>. La relación de éstos microorganismos con este tipo de infecciones, se debe a que pueden ser habitantes normales de la piel, encontrarse en los suministros de agua de los hospitales o pueden ser transportados por el equipo de trabajadores del área de la salud.

### **2.1.3 *Staphylococcus aureus***

El *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, inmóvil, de 0.5 a 1.5 µm de diámetro. Microscópicamente se encuentran aislado en pares, tétradas o formando racimos irregulares<sup>[32]</sup>. Es considerado anaerobio facultativo y crece

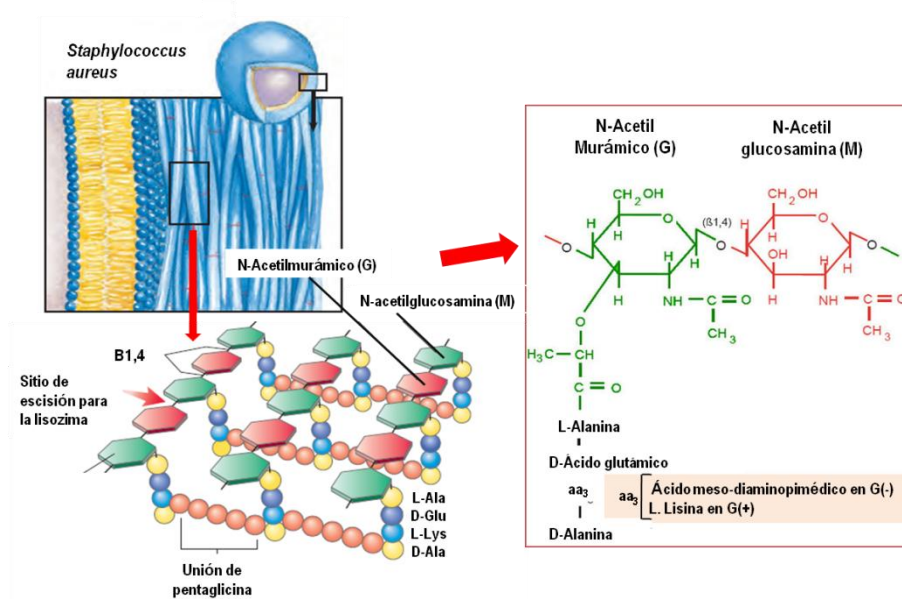
fácilmente en medios nutritivos convencionales, a una temperatura de 37°C. Sus colonias se desarrollan después de 24 horas de incubación, y si se trata de medios enriquecidos con sangre, con frecuencia, se observan zonas de hemólisis alrededor de las colonias. La figura 4(a), muestra como se observan al microscopio, los cocos Gram positivos cuando son teñidos por coloración de gram, y la figura 4(b), muestra un cultivo de *S. aureus* en agar Infusión Cerebro corazón. Obsérvese el color amarillo de sus colonias, característica por la que algunas veces, este microorganismo es llamado “Estafilococo dorado”.



**Figura 4.** (a) Cocos gram positivos<sup>[33]</sup>. (b) Cultivo de *S. aureus* en agar.

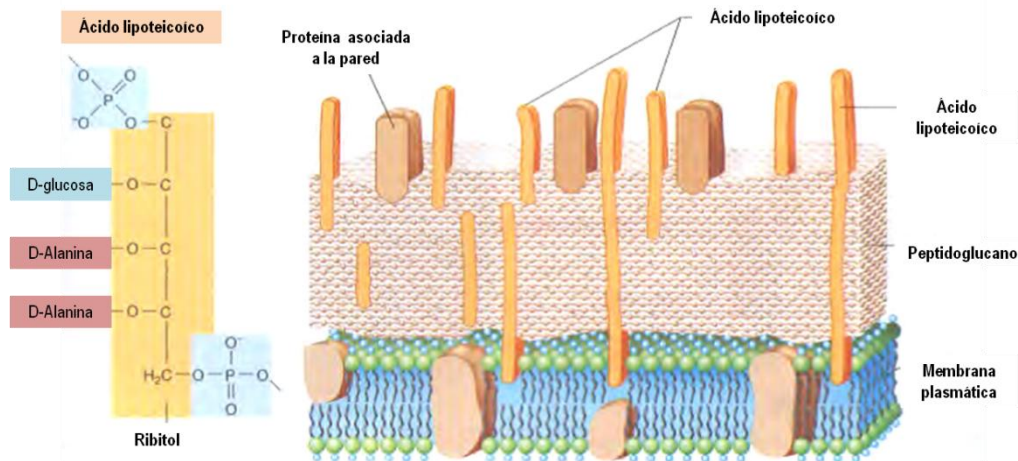
**Estructura:** El componente rígido de la pared celular bacteriana, denominado peptidoglucano o mureína, es un heteropolímero compuesto por dos derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico), los cuales se encuentran ligados por la unión glicosídica  $\beta$ 1,4. También se encuentra compuesto por un grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico, y Lisina o ácido diaminopimélico (DAP). Estos componentes se unen entre sí, para formar una estructura repetitiva, que se denomina tetra péptido del glicano. Como se muestra en la figura 5, los péptidos que componen el peptidoglucano de la pared celular, están covalentemente unidos al ácido N-acetilmurámico, en cadenas vecinas de polisacáridos. Nótese la mezcla de los aminoácidos L y D en los péptidos y la presencia de cadenas entrecruzadas de pentaglicina, lo que

confiere la rigidez característica de la pared celular en las bacterias gram positivas<sup>[34]</sup>.



**Figura 5.** Peptidoglucano de la pared celular de *S. aureus*<sup>[34]</sup>.

En las bacterias gram positivas, el peptidoglucano representa hasta el 90% de la pared celular, y en pequeñas cantidades, suelen encontrarse otros componentes como los ácidos teicoicos, término que se refiere a polímeros que contienen unidades de glicerolfosfato y ribofosfato. Éstos polialcoholes están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan unidos otros azúcares y D-alanina. Debido a su carga negativa, los ácidos teicoicos, son en parte responsables de la carga negativa neta de la superficie de las células y puede intervenir en el paso de iones, a través de la pared celular. Algunos ácidos que contienen glicerol, están unidos a los lípidos de la membrana y debido a esta íntima asociación con lípidos, reciben el nombre de ácidos lipoteicoicos<sup>[35]</sup>. Los ácidos teicoicos y lipoteicoicos pueden desencadenar la activación del complemento por la vía alterna y estimular la secreción de citoquinas por parte de los macrófagos<sup>[33]</sup>. La figura 6, muestra la estructura global de la pared celular Gram Positiva y la estructura química del ácido lipoteicoico.



**Figura 6.** Estructura global de la pared celular Gram Positiva <sup>[35]</sup>.

Otros componentes importantes en la superficie celular, son los proteoglicanos, macromoléculas en las cuales una o más cadenas de glicosaminoglicanos, son unidas covalentemente a las proteínas de membrana. En muchos casos su actividad biológica es proveer múltiples sitios de unión, presentando mayor oportunidad para las uniones hidrógeno y la interacción electrostática con otras superficies de la pared celular<sup>[34]</sup>.

**Enzimas extracelulares y toxinas:** *Staphylococcus aureus* es considerado patógeno humano, por ser el agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial, debido a que presenta una amplia gama de factores de virulencia, dentro de los que se encuentran algunos componentes de su pared celular y una gran variedad de exoproteínas, que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en los mamíferos.

- **Coagulasa:** Es una enzima que funciona como la trombina para convertir el fibrinógeno en fibrina. Al colonizar los tejidos, las microcolonias se rodean por una pared de fibrina, lo que las hace difíciles de fagocitar.
- **Hemolisinas:** Casi todas las cepas producen 4 tipos de hemolisinas,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ . Estas toxinas pueden ocasionar efectos letales debido al daño que

producen en las membranas celulares, que resulta entre otras cosas en hemólisis, y es responsable del proceso de necrosis.

- Leucocidina: Son agentes líticos capaces de lisar leucocitos, razón por la que disminuyen los mecanismos de respuesta del huésped<sup>[35]</sup>.
- Exfoliatinas: Son responsables de la lisis de células epiteliales.
- Enterotoxinas: Son aquellas que desencadenan los síntomas de intoxicación por alimentos. Se han diferenciado serológicamente en 8 toxinas: A-E, H, G, I. Estas proteínas con peso molecular de 35kDa, no son inactivadas por calentamiento a 100°C de 15 a 30 minutos. Por la respuesta inmunológica que causan, especialmente frente a los linfocitos, son consideradas superantígenos<sup>[33, 35]</sup>.

Otras enzimas y citotoxinas que pueden ser encontradas en *S. aureus* incluyen: nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidadasas y colagenasas.

**Patogénesis y cuadro clínico:** La patogénesis y síntomas causados por *S. aureus*, pueden desencadenar de uno a tres cursos distintos<sup>[33]</sup>:

- Infección invasiva: En este tipo de infección, los patógenos tienden a permanecer en el mismo lugar, después de haber atravesado la dermis o mucosa y ocasionar infección local caracterizada por presentar lesiones purulentas, como es el caso de los furúnculos, carbúnculos, sinusitis, otitis media, entre otros. Otro tipo de este tipo de infecciones, incluyen las postoperatorias o postraumáticas, como osteomielitis, endocarditis posterior cirugía cardíaca, neumonía postinfluenza, y sepsis en pacientes inmunocomprometidos. La colocación de cuerpos extraños puede favorecer la colonización por *S. aureus*, la cual es mediada por diferentes proteínas como las de adhesión a la pared celular, fibrinógeno y fibronectina, lo que resulta en la formación de una biopelícula y actuaría como foco de infección.

- Tóxicas: La intoxicación alimentaria, resulta de la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas. Pocas horas después de la ingestión, puede desencadenar náuseas, vómito y fuerte diarrea.
- Forma mixta: Estados patológicos como la dermatitis exfoliativa y el impétigo, son causados por cepas productoras de exfoliatinas que tienen la capacidad de causar infección en la piel. El síndrome de shock tóxico por cepas que producen la enzima TSST-1. Estas cepas pueden causar infección invasiva o colonizar solamente la mucosa. Los principales síntomas son hipertensión, fiebre y brote escarlata (fiebre escarlatina).

#### **2.1.4 Proteínas que median la adherencia del *Staphylococcus aureus***

El *S. aureus* produce un gran número de proteínas, que se unen específicamente a moléculas del plasma. Estas interacciones han sido propuestas como mediadoras en el proceso de colonización del tejido del huésped. Esta bacteria ha mostrado que tiene la capacidad de unirse a la fibronectina (Fn), al colágeno, al fibrinógeno (Fg), a la vitronectina y elastina. El *S. aureus* interactúa con el fibrinógeno de varias maneras, para producir diferentes proteínas de unión al fibrinógeno. El principal mediador de la adherencia al Fg y a la fibrina es una proteína asociada a la superficie celular, llamada factor de agregación (en inglés, clumping factor, CLf). Esta unión al Fg se considera de importancia en el desarrollo de endocarditis, y se presume que media adhesión bacteriana a implantes médicos. Adicionalmente, el *S. aureus* produce tres proteínas extracelulares que pueden unirse al Fg <sup>[36]</sup>.

- Coagulasa: Esta proteína tiene la capacidad de unirse a la protrombina (Pt) y al fibrinógeno (Fg). El complejo coagulasa-Pt, tiene la habilidad de convertir el fibrinógeno a fibrina por un mecanismo diferente al de la agregación natural. Se considera como factor de virulencia en el desarrollo de infecciones pulmonares.

- Proteína extracelular de unión al fibrinógeno (Efb): Su rol como factor de virulencia, ha sido demostrada en infecciones experimentales, donde se ha observado el desarrollo de anticuerpos contra la Efb. Su función fisiológica aún no es clara, pero se ha visto que el Efb está directamente involucrado en la adhesión bacteriana.
- Proteína para la adherencia extracelular: Esta proteína interactúa con más de 7 proteínas del plasma y también tiene la habilidad de unir las células de *S. aureus*, para formar oligómeros y permitir su aglutinación.

## **2.2 TENDENCIA DE LOS MICROORGANISMOS A LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS**

A comienzos de los años 20, Zobell y otros investigadores observaron en poblaciones de bacterias acuáticas, la tendencia por un estilo de vida sedentario, vivir en comunidad unidas a ciertas superficies. También ha sido descrita la importancia de la colonización bacteriana sobre las superficies desde el punto de vista ecológico, debido a que determinados microorganismos, ubicados en sitios específicos, establecen una relación simbiótica, como es el caso de la flora microbiana del tracto digestivo de los rumiantes, la cual promueve la degradación y recirculación de material insoluble<sup>[37]</sup>.

An *et al.*, 2000<sup>[38]</sup>, menciona que el proceso de adhesión bacteriana puede ser descrito en dos partes, una fase física en la que ocurre un proceso instantáneo y reversible (fase 1), seguido por una fase celular dependiente de tiempo, molecularmente irreversible (fase 2). Por otro lado Carpentier y colaboradores<sup>[39]</sup>, proponen que la adhesión primaria entre bacterias y superficies abióticas, es generalmente mediada por interacciones no específicas (hidrofóbicas), mientras que la adhesión a tejidos vivos es llevada a cabo a través de puentes moleculares (lecitinas, ligandos o adhesinas).

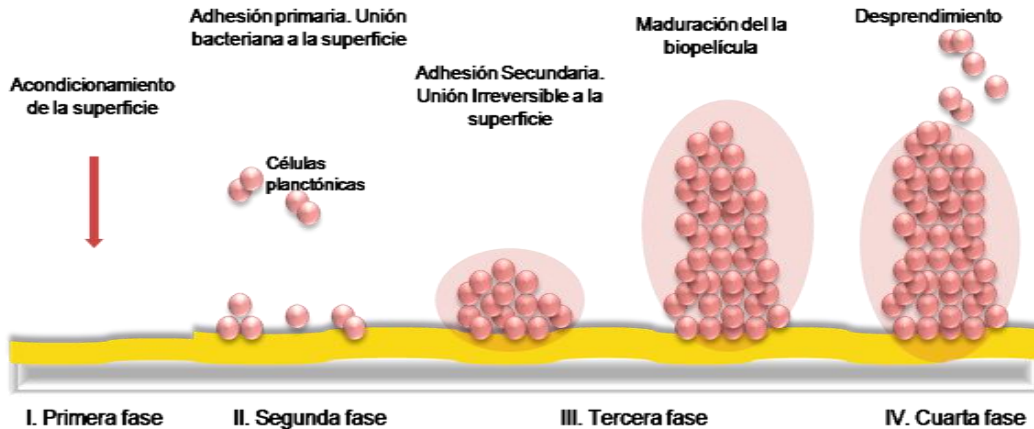
### **2.2.1 Biopelículas**

Existen una variedad de definiciones para describir en qué consiste una biopelícula, una de ellas, propone que se trata de una comunidad estructurada de células bacterianas, que autoinducen la producción de una matriz polimérica en la cual se encuentran encapsuladas y les permite adherirse a superficies vivas o inertes <sup>[40]</sup>. También se ha dicho que las biopelículas son un consorcio funcional de microorganismos organizados dentro de una amplia matriz exopolimérica, y de forma similar se ha mencionado, que son una comunidad de microbios dentro de una matriz polimérica orgánica, adherida a una superficie <sup>[41]</sup>. De acuerdo con las definiciones anteriores, se establece que para el desarrollo de una biopelícula se necesitan 3 componentes básicos: microorganismos, glicocálix y una superficie. Los polímeros extracelulares (EPS, del inglés Extracellular Polymeric Substances), específicamente los exopolisacáridos, son el principal componente del glicocálix, el cual se encuentra predominantemente compuesto por agua. En la mayoría de las especies, el glicocálix es principalmente aniónico y crea un sistema compacto eficiente, que captura y concentra minerales esenciales y nutrientes a partir del ambiente que lo rodea. También confiere cierta protección contra tratamientos ambientales como los biocidas, antibióticos, anticuerpos, surfactantes, bacteriófagos y predadores foráneos tales como, amebas de vida libre y glóbulos blancos <sup>[37, 39]</sup>.

Las biopelículas en la naturaleza se encuentran compuestas por especies heterogéneas, donde los productos metabólicos de un organismo pueden servir como soporte para el crecimiento de otros, al igual que la adhesión de una especie provee ligandos para la unión de otras, sin embargo la competencia por nutrientes y la acumulación de sustancias tóxicas generadas por los colonizadores primarios, puede limitar la diversidad de especies dentro de una biopelícula <sup>[37]</sup>.

## 2.2.2 Proceso para la formación de biopelículas

El proceso que da lugar a la formación de una biopelícula puede ser resumido en 4 fases, como lo indica la figura 7: (1) Acondicionamiento de la superficie, (2) acoplamiento o adhesión primaria, (3) fijación o adhesión secundaria y maduración de la biopelícula, y (4) desprendimiento de células planctónicas.



**Figura 7.** Proceso de formación de una biopelícula.

**La primera fase** se da por ejemplo, cuando un cuerpo extraño es colocado en el sistema circulatorio, y la superficie nativa, es modificada por la adsorción de agua, albúmina, lípidos, moléculas de la matriz extracelular, el complemento, fibronectina, sales inorgánicas, etc. Ocurrido el acondicionamiento, las propiedades del cuerpo extraño se alteran permanentemente, lo que con frecuencia aumenta la afinidad de los microorganismo por dicha superficie <sup>[37]</sup>.

**En la segunda fase** las bacterias son atraídas hacia la superficie acondicionada, por efecto de las fuerzas físicas (adhesión primaria), tales como el movimiento Browniano, las fuerzas de atracción de Van der Waals, la fuerza gravitacional, el efecto de la carga electrostática de la superficie y las interacciones hidrofóbicas. Igualmente la quimiotaxis y quizás la heptotaxis podrían contribuir a este proceso. Las interacciones físicas son clasificadas como interacciones de largo y corto rango. Las interacciones de largo rango no

son específicas, se presentan a distancias mayores a los 50 nm, y están en función de la distancia y la energía libre. Las interacciones de rango corto comienzan cuando las células y la superficie llegan a tener un contacto cercano de menos de 5 nm. Estas uniones pueden ser divididas en uniones químicas (tales como puentes de hidrógeno), iónicas e interacciones dipolo, e interacciones hidrofóbicas. Esta unión bacteriana a la superficie, es el paso inicial de la adhesión bacteriana, el cual permite que la siguiente fase de interacción molecular o celular, se haga posible [2].

**En la tercera fase** se presenta la denominada adhesión secundaria, donde las interacciones moleculares específicas entre las estructuras de la superficie bacteriana y la superficie del sustrato comienzan a ser predominantes. Esto implica una firme adhesión de la bacteria a la superficie por la unión selectiva de estructuras poliméricas, entre las cuales se encuentran la cápsula, las fimbrias o pili y lama, donde la parte funcional de estas estructuras son las adhesinas, especialmente en los casos en que el sustrato, es el tejido de un huésped [2].

Una vez que la bacteria se adhiere irreversiblemente a la superficie, comienza el proceso de maduración de la biopelícula. La densidad total y la complejidad de la biopelícula se incrementan, así como los microorganismos adheridos a la superficie comienzan activamente a replicarse y a morir. Paralelo a ello, los componentes extracelulares generados por la interacción bacteriana con las moléculas orgánicas e inorgánicas del ambiente, dan origen al glicocálix. En el caso de implantes biomédicos infectados, el glicocálix puede incluir proteínas derivadas de la respuesta inflamatoria del huésped, o proteínas provenientes del complemento, fibrinógeno, fibronectina y glicosaminoglicanos adheridos a la superficie acondicionada. El crecimiento potencial de cualquier biopelícula bacteriana, está limitado por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente inmediato, la perfusión de esos nutrientes hacia las células dentro de la biopelícula, y la remoción de las sustancias de desecho. Adicionalmente existe un flujo hidrodinámico óptimo, que cruza por la biopelícula y favorece el

crecimiento y la perfusión hacia el interior de la misma. Otros factores que controlan la maduración de la biopelícula, incluyen el pH interno, la perfusión de oxígeno, la fuente de carbono y la osmolaridad.

**En la cuarta fase**, la biopelícula alcanza una masa crítica, y las moléculas extracelulares comienzan a degradarse, lo que genera una dinámica de equilibrio, donde la capa más externa, comienza a desprender organismos planctónicos. Dichos organismos libres, escapan de la biopelícula y colonizan otras superficies, dando continuidad al ciclo de generación de las biopelículas<sup>[37, 39]</sup>.

### **2.2.3 Factores que condicionan la adhesión bacteriana**

El proceso de adhesión bacteriana a una superficie viva o inerte y el consecuente desarrollo de una biopelícula, está condicionado por diferentes variables, que incluyen la especie bacteriana, las características y composición de la superficie, los factores ambientales y los mecanismos moleculares del microorganismo<sup>[37]</sup>. A continuación se describe con mayor detalle cada uno de estos factores:

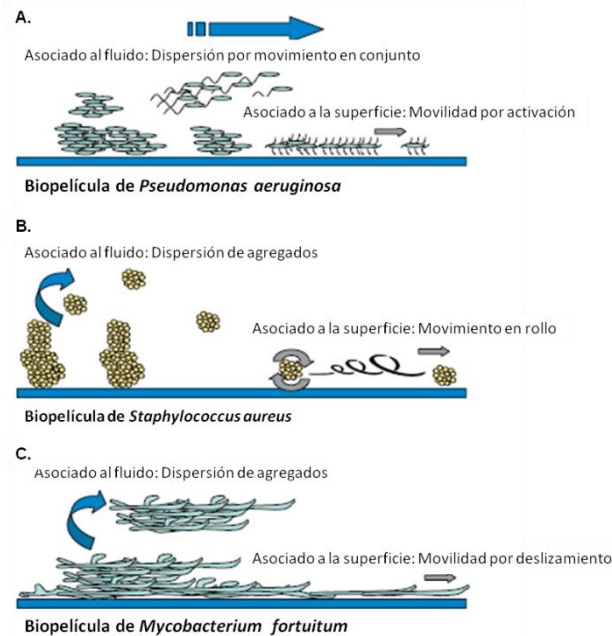
- **Ambiente:** Aquí se incluyen aspectos como la temperatura, el tiempo de exposición, la concentración bacteriana, la presencia de antibióticos y las condiciones asociadas con el flujo. Este último factor es considerado como dominante, ya que influencia fuertemente el número de uniones bacterianas así como la estructuración y desarrollo de la biopelícula<sup>[2]</sup>.
- **Características de la superficie del biomaterial:** La composición química de la superficie de un biomaterial, influencia la adhesión bacteriana y su proliferación. Los materiales con diferentes grupos funcionales, estimulan la adhesión bacteriana, de acuerdo con la hidrofobicidad del material y la carga. También se considera de gran influencia la rugosidad de la superficie, debido a que se ha encontrado que las irregularidades de las superficies poliméricas,

promueven la adhesión bacteriana y el desarrollo de biopelículas<sup>[42]</sup>, que en los lugares de depresión, facilita la colonización. Por otro lado se encuentra la configuración de la superficie, puesto que algunos hallazgos señalan que en superficies porosas, la velocidad de colonización es mayor que en superficies densas<sup>[2]</sup>.

- Características bacterianas: Se debe tener en cuenta que el proceso de adhesión bacteriana va a depender de la especie, debido a que cada cepa presenta características fisicoquímicas y mecanismos de adhesión diferentes. Generalmente las bacterias con propiedades hidrofílicas prefieren superficies hidrofóbicas y viceversa. Igualmente se habla de la carga de la superficie bacteriana, puesto que en suspensiones acuosas, en la mayoría de los casos, se encuentran cargadas negativamente. Dicha carga varía con la especie bacteriana, y está influenciada por el medio de crecimiento, el pH, la fuerza iónica de la solución amortiguadora de suspensión, la etapa de crecimiento de la bacteria y su estructura superficial<sup>[2]</sup>.

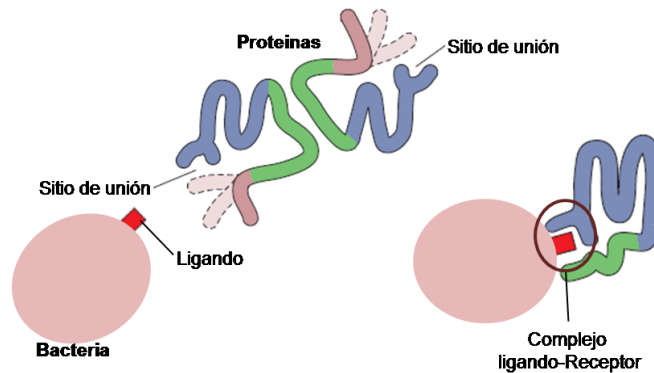
Por otro lado, varios mecanismos de dispersión son ejecutados para llevar a cabo la formación de una biopelícula bacteriana. En la figura 8, se muestra el comportamiento de adhesión y dispersión de tres especies diferentes: (a) *Pseudomonas aeruginosa*, (b) *Staphylococcus aureus*, y (c) *Mycobacterium fortuitum*. Estas estrategias de dispersión, pueden ser divididas en dos: (i) Dispersión debida al desprendimiento de una capa externa de la biopelícula, influenciada por el flujo del medio en el que se encuentra y (ii) Dispersión sobre una superficie sólida. Adicionalmente, en cada una de estas formas, la dispersión puede darse por diferentes mecanismos de locomoción: movimiento en conjunto, deslizamiento o movilidad por activación de mecanismos motores; o puede ser inducida por el flujo del medio líquido: agregación, movimiento ondulatorio o movimiento en rollo. Aunque las bacterias con mecanismos de movimiento en conjunto y movimiento por activación, tienen la ventaja de que la movilidad bacteriana es direccionada y propia de la bacteria, la célula por si sola

no tiene la protección que tendría al estar al interior de una biopelícula. Por el contrario, las células que están encapsuladas (b. movimiento circular), se encuentran protegidas por la biopelícula <sup>[43]</sup>.



**Figura 8.** Mecanismos de dispersión para la formación de biopelículas de 3 especies diferentes. (a) *Pseudomonas aeruginosa*, (b) *Staphylococcus aureus*, (c) *Mycobacterium fortuitum*<sup>[43]</sup>.

- **Proteínas del suero o tejidos:** Proteínas tales como la albúmina, fibronectina, fibrinógeno, colágeno desnaturalizado, entre otros, promueven o inhiben la adhesión bacteriana, ya sea mediando la unión a la superficie del substrato o entre bacterias. La mayoría de los mecanismos de unión entre bacterias y proteínas, son interacciones ligando-receptor específicas<sup>[2]</sup>. La figura 9 esquematiza el proceso de unión entre el receptor de determinada proteína, al ligando de una bacteria.



**Figura 9.** Formación de un complejo ligando-receptor de un ligando bacteriano con el sitio de unión de determinada proteína<sup>[34]</sup>.

#### 2.2.4 Función del quorum sensing en la formación de biopelículas

El quorum sensing es un término utilizado para describir la emisión de señales entre bacterias. Aunque varios sistemas del quorum sensing son conocidos, quizás los que han sido descritos con mayor frecuencia, son el acyl-homoserine lactone (acyl HSL), presente en la mayoría de especies gram negativas, y el sistema AI-2, encontrado en varias especies de gram negativos y gram positivos. De acuerdo con los estudios realizados, el quórum sensing no parece estar involucrado en la formación de la biopelícula, sin embargo ha mostrado tener influencia en el desarrollo de biopelículas de varias especies. Por ejemplo el gen regulador (accessory gen regulator, agr) del sistema quórum sensing en *Staphylococcus aureus*, reprime varias adhesinas de superficie, que median el contacto con la matriz huésped, como las proteínas de unión al fibrinógeno y a la fibronectina, mientras que bajo ciertas condiciones, mutantes agr, pueden adherirse a superficies bióticas y abióticas, con mayor eficiencia que otras cepas. Finalmente el quórum sensing ha mostrado tener influencia en la maduración, agregación y disolución o dispersión de las biopelículas<sup>[30]</sup>.

#### 2.2.5 Relación de las biopelículas con el desarrollo de infecciones

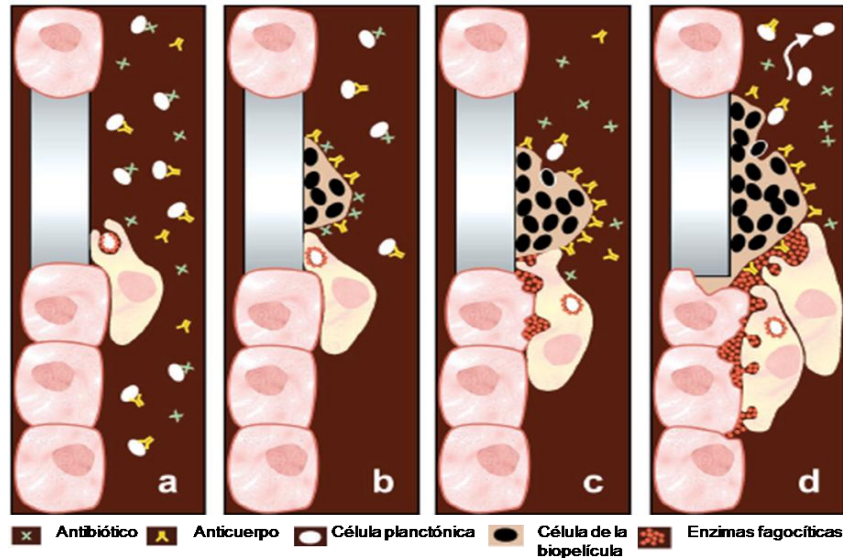
La formación de biopelículas representa una estrategia que facilita la supervivencia microbiana, en la que los microorganismos, incluidos los

patógenos, presentan un equilibrio dinámico, donde la matriz de células encapsuladas, madura y libera microorganismos que se diseminan hacia nuevas superficies<sup>[43]</sup>. Los microorganismos al estar incluidos dentro de un glicocálix, difícilmente son alcanzados por los agentes antimicrobianos, al igual que por los mecanismos de defensa del sistema inmunológico. De esta forma, se cree que pueden ser el origen de un gran número de infecciones, al igual que de la recurrencia de las mismas. La tabla 3 presenta las principales patologías asociadas al desarrollo de biopelículas.

**Tabla 3.** Patologías asociadas al desarrollo de biopelículas.

Patología	Bacterias relacionadas	Observaciones
<b>Fibrosis quística</b> <sup>[44-46]</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Bulkhoderia</i> spp.	Resistencia a antibióticos. <i>P. aeruginosa</i> presenta múltiples mutantes fenotípicos, capaces de desarrollar biopelículas.
<b>Cálculos renales</b> <sup>[30, 47]</sup>	<i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	Infecciones persistentes. Resistencia a antibióticos
<b>Endocarditis bacteriana</b> <sup>[30]</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> y <i>S. mutans</i>	Asociado a válvulas cardíacas. Infecciones persistentes.
<b>Otitis media</b> <sup>[30, 46]</sup>	<i>Streptococcus</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	En pacientes se han observado cultivos negativos, pero en ensayos realizados en modelos animales, se ha observado el desarrollo de biopelículas en la mucosa.
<b>Prostatitis crónica</b> <sup>[46, 48, 49]</sup>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Corynebacterium</i> spp	Biopsias demuestran la presencia de bacterias en el ducto prostático, a pesar de observar urocultivos negativos.
<b>Infecciones en el tracto biliar</b> <sup>[50]</sup>	<i>Salmonella</i> spp.	Infecciones asociadas a implantes médicos.
<b>Periodontitis</b> <sup>[46, 51]</sup>	<i>Fusobacterium</i> , <i>Peptoestreptococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> spp.	
<b>Infecciones oftálmicas</b> <sup>[52]</sup>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> y <i>Candida tropicalis</i>	

La figura 10 muestra el proceso de colonización y formación de una biopelícula de importancia clínica sobre un cuerpo extraño, y su respuesta frente a los mecanismos de defensa del huésped y agentes antimicrobianos.



**Figura 10.** Diagrama de una biopelícula de importancia clínica<sup>[53]</sup>. **(a)** Las células planctónicas, pueden ser capturadas fácilmente por los anticuerpos y fagocitos, además son susceptibles a la acción de los antibióticos. **(b)** Las células bacterianas adheridas a superficies inertes en forma de biopelícula (Células Sésiles), son resistentes a la acción de los anticuerpos, fagocitos y antibióticos. **(c)** Los fagocitos son atraídos hacia la biopelícula, donde liberan sus enzimas, pero el proceso de fagocitosis es frustrado. **(d)** Por último, las enzimas fagocíticas dañan el tejido alrededor de la biopelícula y las bacterias planctónicas son liberadas de la biopelícula, lo que causa la diseminación y subsecuente infección aguda, generada por la colonización de los microorganismos en los tejidos vecinos.

### 2.2.6 Técnicas para la generación de biopelículas

Con la finalidad de evaluar el proceso de formación de biopelículas, los mecanismos que participan en dicho proceso, los requerimientos nutricionales y el tiempo que pueden tardar en desarrollarse, se han creado diversas metodologías y sistemas *in-vitro*, tanto estáticos como de flujo para inducir la formación de biopelículas. A continuación se presentan algunos ejemplos:

- Ensayos estáticos: Este tipo de ensayos son simples, económicos y facilitan el estudio de la adhesión bacteriana sobre diferentes superficies. En principio, es

necesario preparar la superficie, sumergiéndola en una suspensión celular por un periodo de tiempo determinado. Posteriormente las células no adheridas deberán ser removidas para realizar el recuento de las células adheridas a la superficie. Dicho conteo puede llevarse a cabo por microscopía, métodos para el recuento de células viables, métodos indirectos como espectrofotometría, Coulter Counter, marcadores bioquímicos etc. También se pueden utilizar métodos para la evaluación de la biopelícula, como la microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica<sup>[54]</sup>.

- Cámaras de flujo de placas paralelas: Como muestra la figura **11-a**, este es un sistema tanto común como sencillo de construir, donde el flujo generado dentro de la cámara puede ser analizado matemáticamente. Generalmente se utiliza una bomba que provee un flujo constante, donde el fluido entra de un lado y sale por el lado opuesto de una cámara rectangular. La placa superior es usualmente una laminilla de vidrio, mientras que en el fondo está el preparado de la superficie, en el cual las células han sido dejadas por un tiempo predeterminado. El movimiento del fluido crea cierto estrés sobre la pared, el cual es calculado en la siguiente ecuación:

$$\tau_w \approx \frac{\lambda P h^2 L}{W}$$

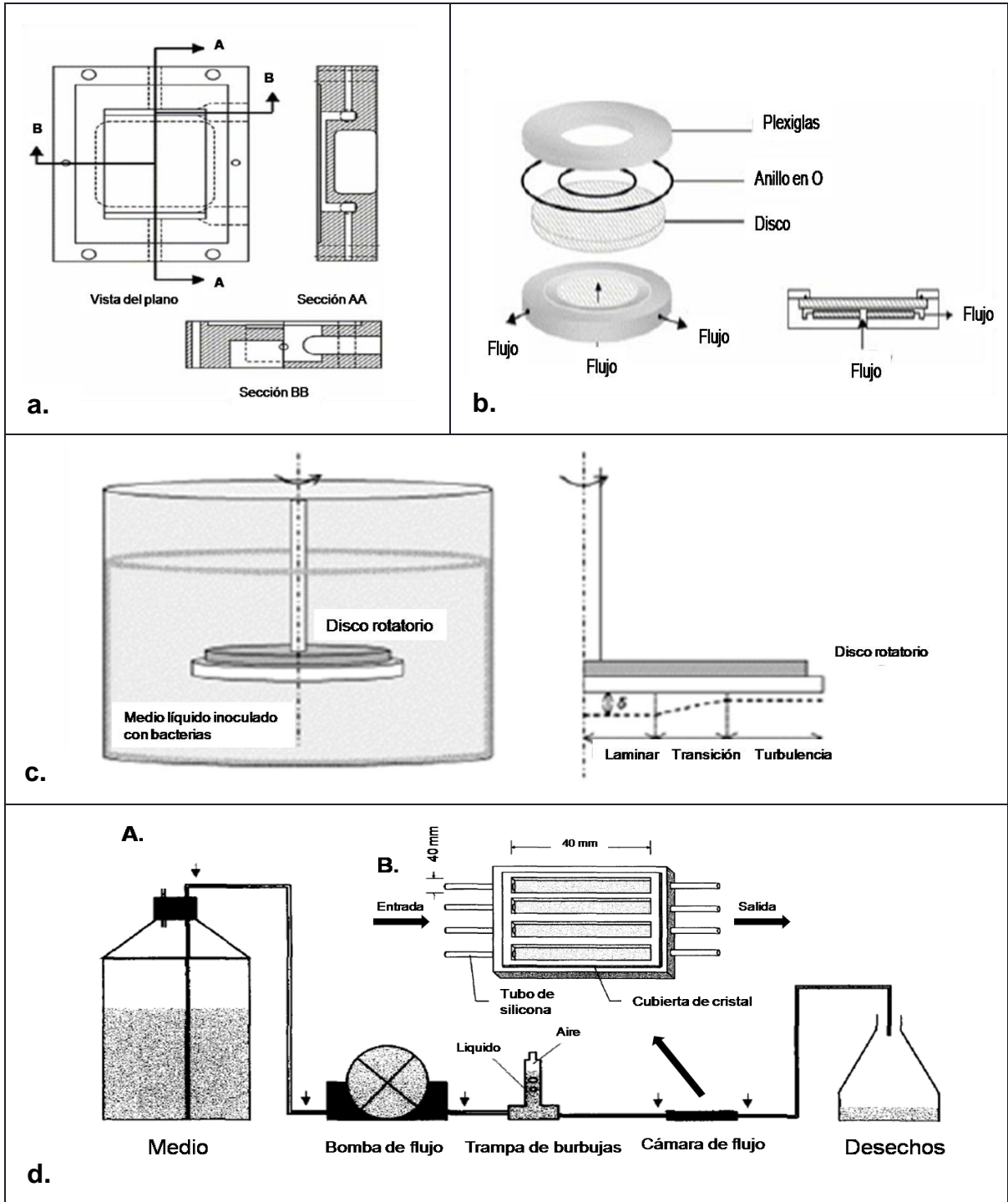
Donde  $\lambda P$  es la presión de la gota ( $\lambda P = (12L/h^3 W)\mu Q$ ),  $h$  es la altura,  $L$  es la longitud y  $W$  es el ancho de la cámara.  $\mu$  es la viscosidad del fluido y  $Q$  es la velocidad del flujo volumétrico<sup>[2]</sup>.

- Cámara de flujo radial: La figura **11-b**, muestra que esta cámara consta de 2 discos planos, separados por un espacio angosto de unos 200  $\mu\text{m}$ . Para una velocidad volumétrica de flujo dada ( $Q$ ), la velocidad de división en la superficie del colector, es inversamente proporcional a la posición radial del portal de ingreso ( $r$ ) y es calculado a partir del espacio de la anchura ( $h$ ) utilizando la siguiente la relación:

$$S \approx 3Q / rh^2.$$

- Disco rotatorio: La figura **11-c**, muestra un sistema que utiliza un disco rotatorio en un medio líquido, donde pueden distinguirse a lo largo de la superficie, una región de flujo laminar, una región transitoria y una región de flujo turbulento.
- Sistema de flujo con cámara: Como se observa en la figura **11-d-A**, este sistema cuenta con un flujo de entrada que es conectado por un tubo de silicón, excepto por el tubo que se dirige hacia la bomba peristáltica, el cual es de marpreno. Las dimensiones normales del tubo son de 3.0 mm (diámetro externo) y 1.0 mm (diámetro interno). El tubo entre la trampa de burbujas y la cámara de flujo debe ser lo suficientemente largo, para de esta forma facilitar el montaje de la cámara sobre el microscopio. Las flechas indican el lugar donde los tubos son ensamblados con los conectores. La figura **11-d-B**, muestra que la cámara de flujo consta de 4 canales paralelos. Cada canal es de 1mm de profundidad y los orificios para el flujo de entrada y salida son de 3.0 mm. Una lámina cubreobjetos de 50 x 40 mm, es colocada para cubrir los canales utilizando pegamento de silicona y un tubo de silicón es insertado en cada terminación. La velocidad de flujo aplicada a este sistema es de 0.2 mm por segundo<sup>[55]</sup>.

A partir de los modelos anteriormente mencionados, se han desarrollado otros como el utilizado por Anderson et. al., 2007<sup>[56]</sup>, en el cual se evaluaron los mecanismos de adhesión mediados por la adhesina FimH de tres cepas de *Escherichia coli*, aplicando cierta velocidad de flujo. Muchos otros estudios han empleado el modelo desarrollado por Christensen et al., 1999<sup>[55]</sup>, por la facilidad del diseño que permite observar las muestras al microscopio, sin tener que retirarlas del sistema de flujo. Adicionalmente, en otros sistemas de flujo se han modificado algunos materiales, con el fin de adaptar la cámara de flujo a equipos como el espectroscopio infrarrojo y de esta manera rastrear la formación de biopelículas en tiempo real, obteniendo información sobre su composición química<sup>[57]</sup>.



**Figura 11.** Sistemas de flujo para el desarrollo de biopelículas. **a)** Cámara de flujo de placas paralelas. **b)** Cámara de flujo radial. **c)** Disco rotatorio. **d)** **A.** Sistema de flujo con cámara. **B.** Cámara de flujo.

Por otro lado, se han desarrollado modelos de infección *in-vivo* en diferentes animales, dentro de los que se encuentran perros, ovejas, cabras, porcinos, pollos, conejos, cobayos, ratas y ratones. Diversas técnicas han sido descritas para evaluar la colonización de diferentes biomateriales, como los utilizados para implantes y catéteres, sin embargo, muy poco ha sido descrito en relación con los implantes intravasculares metálicos, hallándose reportado en la literatura, tan sólo dos estudios realizados por Thibodeaux, *et al.*, 1996<sup>[6]</sup> y Hearn, *et. al.*, 1997<sup>[7]</sup>, en los que se emplearon porcinos, a los cuales se les realizó el procedimiento de APT para la colocación de implantes intravasculares metálicos de Palmaz e inducir posteriormente un proceso infeccioso con *S. aureus*. Los resultados mostraron indicio de inflamación y presencia de células bacterianas, sin embargo los implantes colonizados no fueron analizados en detalle, tan sólo se obtuvo el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC).

Para inducir la formación de biopelículas, se debe tener en cuenta el modelo de infección, ya que dependiendo del interés del estudio, éste puede ser local o generalizado, y en el caso preciso de los implantes intravasculares metálicos, es necesario inocular el animal directamente en la circulación sanguínea, puesto que estos implantes son colocados en venas o arterias. También se deben tener en cuenta las características del microorganismo, como los factores de virulencia, de lo que depende su capacidad para evadir el sistema inmunológico y lograr iniciar el proceso de colonización. De igual forma es importante la fase de crecimiento, para la que se recomienda la fase logarítmica, debido a que el contenido de lipopolisacáridos (LPS) y polisacáridos capsulares es mucho mayor. En el caso de bacteriemias inducidas con *Escherichia coli*, se han observado conteos que rara vez exceden valores de  $10^4$  UFC/mL, y los recuentos máximos, alcanzan valores de  $10^7$  UFC/mL<sup>[58]</sup>. A continuación en la tabla 4, se presentan algunos estudios en los que se han inducido bacteriemias por vía intravenosa en modelo animal, haciendo especial énfasis en el tamaño de los inóculos, en el volumen aplicado, la cepa bacteriana utilizada, el modelo

animal y sus características, el tiempo de exposición al inóculo bacteriano y los resultados obtenidos en cada uno de los casos.

**Tabla 4.** Estudios realizados induciendo bacteriemia por vía intravenosa.

OBJETIVO DEL ESTUDIO	MODELO ANIMAL/ CEPA/ TAMAÑO /LUGAR DEL INÓCULO	TIEMPO	RESULTADOS
Desarrollar un modelo infeccioso de endocarditis en ratas, a partir de una infección primaria en la unión temporomandibular, induciendo la traslocación hematogena en una válvula aortica traumatizada <sup>[59]</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rata</li> <li>▪ <i>S. aureus</i>.</li> <li>▪ 10<sup>7</sup> CFU</li> <li>▪ Intravenoso</li> </ul>	7 días	Se observó un bajo nivel de bacteriemia a partir del foco de infección utilizado.
Determinar si los stents intravasculares metálicos en un modelo porcino, pueden ser infectados al inyectarles un inóculo bacteriano posterior a la colocación del implante <sup>[6, 7]</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Porcino</li> <li>▪ <i>S. aureus</i></li> <li>▪ (a) 5 mL 3x 10<sup>3</sup> UFC Después de colocación del stent (b) 5 mL 6x10<sup>6</sup>, 4 semanas después de la colocación del stent.</li> <li>▪ Intravenoso</li> </ul>	3 días	Stent/arteria: 50% cultivos positivos. Estenosis: 7% cultivos positivos. Evidencia de inflamación en las arterias con cultivos positivos.
Demostrar que un modelo experimental de bacteremia por <i>S. aureus</i> en ratones, puede ser utilizado para correlacionar la actividad de citoquinas en suero y tejido, con hallazgos histopatológicos y conteo bacteriano en sangre y tejido <sup>[60]</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ratones femeninos, Swiss-Webster con 8 a 10 semanas.</li> <li>▪ <i>S. aureus</i></li> <li>▪ 0,2 mL 5 x 10<sup>7</sup> CFU/ml</li> <li>▪ Intravenoso</li> </ul>	A diferentes tiempos (1, 3, 6, 24, 48 y 72 h) después de inoculados.	El inóculo utilizado no indujo la muerte de ningún animal hasta las 72 horas. - Disminución del inóculo bacteriano y aumento de citoquinas con el tiempo.
Comprobar que la pérdida del locus <i>ica</i> que induce la inhabilidad de producir Poly N acetilglucosamina (PNAG), afecta severamente la virulencia de 3 cepas de <i>S. aureus</i> utilizando modelos murinos de bacteremia, infección renal y letalidad <sup>[61]</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ratones hembra Swiss-Webster de 5 a 7 semanas</li> <li>▪ <i>S. aureus</i></li> <li>▪ 0.2 ml 5x10<sup>8</sup> CFU/mL</li> <li>▪ Intravenous</li> </ul>	2 y 4 horas	La ausencia del locus <i>ica</i> no permite la expresión de PNAG, lo que disminuye la capacidad virulenta de las cepas de <i>S. aureus</i> .  -Reducción de la bacteremia ≤2 CFU/mL.
Determinar el rol que las proteínas de superficie codificadas por los genes <i>srtA</i> y <i>srtB</i> , juegan en la habilidad del <i>S. aureus</i> para desarrollar infección <sup>[62]</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ratones hembra, cepa CD-1</li> <li>▪ <i>S. aureus</i></li> <li>▪ <b>Modelo de infección letal aguda.</b></li> <li>▪ 5 animales fueron infectados con 3 inóculos de: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> UFC/mL.</li> <li>▪ Intravenoso</li> </ul>	A los 7 días de acuerdo con el porcentaje de supervivencia, se estimó la dosis letal 50 (LD <sub>50</sub> ).	inóculo de 5-8x10 <sup>5</sup> CFU no causó la muerte de ninguno de los animales infectados con las diferentes cepas. Aumentando el inóculo a 10 <sup>7</sup> , se observaron porcentajes de mortalidad altos (73% a 80%).
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ratas Sprague-Dawley de 250 ±25 g;</li> <li>▪ <i>S. aureus</i></li> <li>▪ <b>Modelo de endocarditis en ratas.</b> 1mL, 10<sup>5</sup> cfu/mL.</li> <li>▪ Intravenoso</li> </ul>	2 días	Todos los catéteres fueron infectados, con un promedio de 7.7+1.6 log <sub>10</sub> UFC, con relación a la cepa no modificada genéticamente.

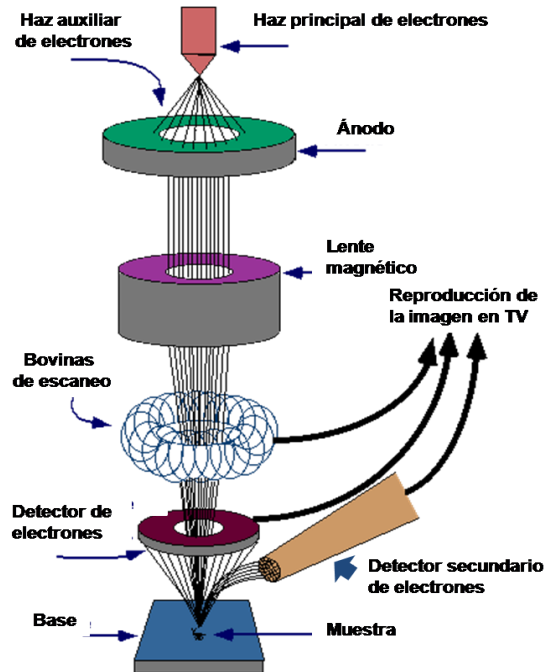
### 2.2.7 Técnicas para el análisis de biopelículas

Una vez se ha desarrollado la biopelícula ya sea *in-vitro* o *in-vivo*, es necesario contar con el equipamiento necesario para su análisis, lo que comprende, conocer su morfología y estructura, su composición química, caracterizar los mecanismos fundamentales en el proceso de adhesión, los genes que median la expresión de proteínas importantes en dicho proceso; así mismo, estudiar la composición de la superficie donde se dio lugar a la formación de la biopelícula, y determinar que componentes tanto de la superficie como del medio propiciaron su desarrollo.

Para este fin se han utilizado ampliamente microscopías como la de transmisión del electrones (TEM, del inglés transmission electron microscopy), SEM, microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM, del inglés environmental scanning electron microscopy (ESEM)), microscopía de contraste interferencial con y sin fluorescencia (DIC, del inglés episcopic differential interference contrast microscopy), microscopía de contraste modulado de Hoffman (HMC, del inglés Hoffman modulation contrast microscopy), AFM y microscopía confocal de barrido laser (SCLM, del inglés scanning confocal laser microscopy). Un estudio realizado por Surman *et. al.*, 1996<sup>[63]</sup>, comparó las diferentes microscopías para determinar cual de todas era la más apropiada, sin embargo concluyó que todas son útiles dependiendo de lo que quiera ser estudiado y recomienda que para obtener un mejor análisis de la compleja estructura de las biopelículas, es conveniente la utilización de varias microscopías que sean complementarias entre sí. Se podría considerar que las microscopías empleadas con mayor frecuencia para dicha finalidad, son la SEM y AFM, por lo que continuación se profundizará un poco más acerca de su principio y ventajas:

- Microscopía de barrido electrónico (SEM): Este microscopio contiene dos haces distintos de electrones que se encuentran sincronizados. El haz principal se usa para iluminar la muestra. El haz auxiliar, es parte de un tubo

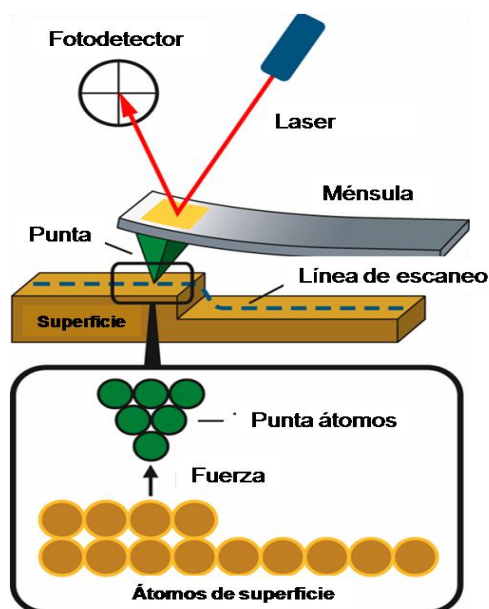
de rayos catódicos idénticos al de un televisor. En respuesta a la iluminación del haz principal, un punto de la muestra emite electrones secundarios. La cantidad de estos electrones se mide y se utiliza para modular el haz auxiliar, que crea un punto luminoso u oscuro en la pantalla. El haz principal va recorriendo punto por punto la muestra, a la vez que el haz auxiliar va construyendo la imagen de la misma manera. La cantidad de electrones secundarios que emite un punto de la muestra, depende de dos factores: la topografía de la muestra y el número atómico del elemento que forma la muestra. Las regiones con características irregulares, emiten más electrones y se visualizarán como puntos brillantes en la pantalla; las regiones más planas, emiten menos electrones y se visualizan como puntos oscuros<sup>[64]</sup>. Para este fin, las muestras deben ser recubiertas con una capa de metal delgado que permita la conductividad de electrones. La gran ventaja de este tipo de microscopía, es que permite obtener imágenes de alta resolución, por lo que es posible visualizar con mayor detalle las diferentes estructuras contenidas en la muestra. La figura 12, esquematiza el funcionamiento de un microscopio de barrido electrónico.



**Figura 12.** Explicación gráfica del funcionamiento de un microscopio de barrido electrónico (SEM)<sup>[65]</sup>.

- **Microscopía de fuerza atómica (AFM):** Este microscopio posee una sonda de barrido que utiliza una punta piramidal adherida al extremo de una ménsula, a la cual se le detecta la deflexión, enfocando un laser en el dorso de ésta y dirigiéndolo hacia un fotodetector. Un circuito de retroalimentación, trata de mantener la deflexión de la ménsula constante y la señal de error que usa para corregir la deflexión, se utiliza para reconstruir una imagen topográfica de la muestra. En el **modo de contacto**, la sonda se aproxima tanto a la muestra, que las funciones de onda cuánticas de los átomos, tanto de la muestra como de la zona se traslapan, de modo que la fuerza ejerce sobre la sonda una fuerza de repulsión. En el **modo de nocontacto**, la sonda se mantiene a una cierta distancia intermedia de la muestra, desde donde ésta ejerce sobre la sonda las fuerzas de atracción de Van der Waals. En el **modo de contacto intermitente**, la ménsula se pone a vibrar a un punto cercano a su frecuencia de resonancia. La oscilación de la ménsula es monitoreada por el fotodetector. Cuando la sonda se acerca a la superficie, el movimiento de la sonda es amortiguado conforme empieza a

hacer contacto con la superficie. El nivel de amortiguamiento se hace igual a un valor prefijado y las desviaciones de este valor se registran punto por punto y se utilizan para construir una imagen topográfica de la muestra. Esta modalidad es ideal para trabajar con muestras blandas, ya que produce menos daño que en el modo de contacto<sup>[64]</sup>. La figura 13, muestra de forma gráfica, los componentes y el funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.



**Figura 13.** Representación gráfica del Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)<sup>[66]</sup>.

El AFM ha sido una herramienta útil en el estudio de biopelículas bacterianas, para la medición de dimensiones críticas, la rugosidad de las superficies y la organización de EPS hidratadas, como es el caso de biopelículas desarrolladas por *Pseudomonas spp.*, *Azospirillum brasilense*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis*<sup>[67]</sup>, entre otros.

Otras técnicas complementarias a las técnicas de microscopía, también han sido incorporadas al estudio de las biopelículas, tal es el caso de la espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier, la cual permite obtener información cualitativa y cuantitativa, y por su sensibilidad, rapidez, bajo costo

y facilidad en la preparación de la muestra, promete tener un gran impacto en el campo de la microbiología. El principio de la técnica consiste en obtener el espectro infrarrojo de los compuestos químicos de una muestra, los cuales son comparados con un estándar de picos en diferentes intervalos de absorción ya descritos, considerados como la huella digital de cada compuesto químico. Es así como ha sido posible realizar la detección e identificación de microorganismos y hongos, la caracterización de células cancerígenas, células infectadas con virus y diferentes sustancias farmacológicas inyectadas en animales<sup>[68]</sup>. Un estudio realizado por Donlan *et. al.*, 2004<sup>[69]</sup>, evidenció bandas específicas de polisacáridos en la región de los 1200 a 900  $\text{cm}^{-1}$ , al igual que bandas compatibles con amidas, en la región de los 1650 a 1550  $\text{cm}^{-1}$ , demostrando así, la presencia de polímeros extracelulares en la formación de biopelículas.

---

# Capítulo 3

---

## Metodología Experimental

---

### **3.1 Activación de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

#### **3.1.1 Reconstitución y almacenamiento de *Staphylococcus aureus***

##### **Reconstitución del *Staphylococcus aureus***

Se reconstituyó el *Staphylococcus aureus*, siguiendo las indicaciones del inserto:

- a. Retirar del empaque el dispositivo, el cual consta de una ampolleta con 0.5 mL de medio transporte Stuart (ver composición en el anexo 1), un aplicador y bacterias viables liofilizadas.
- b. Sostener el dispositivo de forma vertical y en el extremo de arriba, apretar la ampolleta fuertemente con la yema de los dedos hasta romperla y liberar el medio líquido.
- c. Dejar humedecer el aplicador y el liofilizado.
- d. Sembrar en el medio de cultivo apropiado.

##### **Almacenamiento del *Staphylococcus aureus***

El procedimiento de almacenamiento, se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. A un frasco con 60 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (Merk), previamente esterilizado, se le adicionó el microorganismo reconstituido. La composición del medio de cultivo, se describe en el anexo 1.
- b. El frasco se cerró parcialmente y se dejó en incubación a 37°C, por un periodo de 5 horas, cuando se observó una alta turbidez.
- c. Se preparó una solución de criopreservación, agregando 18 mL de glicerol estéril, a los 60 mL de medio de cultivo previamente inoculado.
- d. El frasco se agitó durante unos minutos hasta que el glicerol se mezcló completamente con el medio de cultivo.
- e. Se colocaron 1.5 mL de la solución de criopreservación con la suspensión bacteriana, en microviales con tapa.
- f. Cada vial fue marcado con la información del microorganismo y la fecha de congelación. Las tapas fueron cubiertas con papel parafilm para evitar la apertura de algún vial durante el almacenamiento.

- g.** Los tubos fueron colocados en una caja para microviales y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).
- h.** Se realizó una prueba de viabilidad tomando una muestra con asa bacteriológica de uno de los viales y sembrándola en agar Infusión Cerebro Corazón (Bioxon). El cultivo se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. La composición del medio de cultivo se describe en el anexo 1.
- i.** Del cultivo anterior, se realizó una coloración de gram, para confirmar la presencia de cocos Gram positivos y la esterilidad del cultivo criopreservado. Igualmente se realizó una prueba de identificación con un kit comercial para Gram positivos (BD, BBL Crystal Identification system) con el fin de confirmar la pureza de la cepa.

### **3.1.2 Curvas de crecimiento y calibración de *Staphylococcus aureus***

Se realizaron varias curvas de crecimiento, con el fin de comparar con cuál de ellos se obtenía el desarrollo óptimo del microorganismo. Para ello, una de las técnicas empleadas, fue la espectrofotometría, por medio de la cual se determinó la absorbancia o densidad óptica (DO), de suspensiones bacterianas en diferentes medios de cultivo, a través del tiempo. Para entender el término de DO, es necesario entender el término de transmitancia (T), la cual se define como la fracción de radiación incidente, transmitida por una solución, a causa de la interacción entre los fotones y partículas absorbentes, una vez un haz colimado de radiación monocromática, es atenuado al atravesar una solución con un grosor de  $b$  cm y una concentración  $c$  de una especie absorbente:

$$T = P/P_0$$

**P** hace referencia a la intensidad de luz transmitida y **P<sub>0</sub>** a la intensidad de luz incidente. De acuerdo con lo anterior, se ha establecido que la absorbancia (A) ó DO de una solución, aumenta conforme disminuye la transmitancia, por lo que se define con la siguiente ecuación<sup>[70]</sup>:

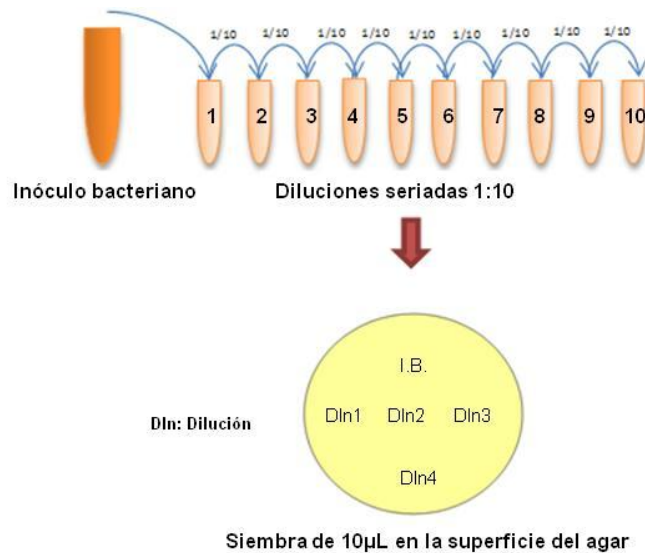
$$A = -\log_{10}T = \log P_0/P$$

## I. Curva de Crecimiento en caldo infusión cerebro corazón

La primer curva de crecimiento se realizó utilizando **caldo Infusión Cerebro Corazón** (Merck), inoculado con la bacteria recién reconstituida. La lectura se realizó en un espectrofotómetro de absorción ultravioleta visible (UV-Vis) marca Perkin-Elmer Modelo Lambda 25. El procedimiento empleado se describe a continuación:

- a. Se tomaron 2 tubos tapa rosca, uno con 8 mL y otro con 9 mL de caldo infusión cerebro corazón. El primero se reservó para la lectura del blanco, y al segundo tubo se le agregaron 90 $\mu$ L de un inóculo bacteriano, el cual fue preparado diluyendo 10  $\mu$ L de la cepa recién reconstituida, en 10 mL de caldo infusión cerebro corazón.
- b. El tubo inoculado se agitó fuertemente para homogenizar la suspensión bacteriana. Posterior a la lectura del blanco, se dispensaron 4 mL de la suspensión bacteriana en una celda de cuarzo para su lectura por espectrofotometría.
- c. El espectrofotómetro fue programado para que realizara una lectura por minuto, durante 24 horas, a una longitud de onda de 600nm y temperatura ambiente.
- d. La cantidad de inóculo bacteriano restante, fue incubada a 37°C por 24 horas.
- e. Paralelo a los puntos c y d, con el fin de conocer el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) del inóculo bacteriano, se realizó la **prueba del inóculo** de la siguiente manera:
  - Agregar a 10 microviales de 1.5 mL, 1.0 mL de solución salina al 0.85%.
  - A partir del inóculo bacteriano, realizar diluciones seriadas 1:10 en los 10 microviales, como se muestra en la figura 12.
  - Sembrar 10 $\mu$ L de cada vial en agar Infusión Cerebro Corazón como se muestra en la figura 12.
  - Dejar secar los 10 $\mu$ L en la superficie del agar, y posteriormente incubar a 37°C por 24 horas.

- Realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/10 $\mu$ L) de cada dilución, una vez se cumpla el tiempo de incubación.



**Figura 14.** Representación gráfica de la prueba del inóculo.

- Para determinar el valor de UFC/mL, multiplicar por 100 el número de UFC/10 $\mu$ L y posteriormente multiplicar por el factor de dilución correspondiente.
- f. El análisis de los datos obtenidos por espectrofotometría, se realizó con el programa para gráficos de Microsoft Excel, y se presentan en el capítulo 4, figura 26.

## II. Curvas de crecimiento utilizando soluciones fisiológicas

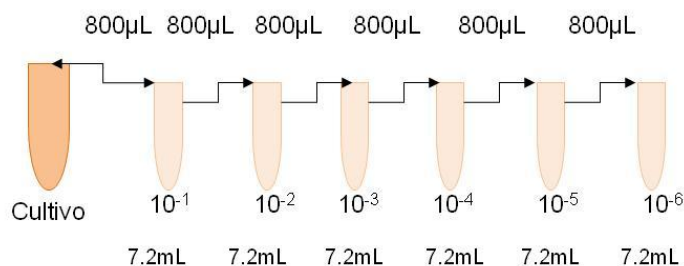
Con el fin de verificar el crecimiento del microorganismo en soluciones fisiológicas, se realizaron otras curvas de crecimiento utilizando el mismo espectrofotómetro descrito en el punto I. Las soluciones empleadas fueron: pool de suero humano inactivando el complemento a 56°C (**PSHI**), pool de suero humano sin inactivar el complemento (**PSH**) y solución de Hartman (**SH**). El procedimiento empleado, fue muy similar al descrito en el punto anterior con algunas modificaciones, como se describe a continuación:

- a. Se realizó una siembra en agar infusión cerebro corazón, a partir de uno de los viales con suspensión bacteriana en medio de criopreservación. El vial se descongeló a temperatura ambiente, antes de ser utilizado.
- b. El medio de cultivo fue incubado a 37°C por 24 horas.
- c. Cumplido el tiempo de incubación, se tomaron de 2 a 3 colonias y se inocularon en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón. La suspensión se incubó por 5 horas a 37°C, para obtener un cultivo en fase exponencial con alta turbidez.
- d. Se tomaron 50 µL del cultivo y se inocularon en 5 mL de la solución a evaluar (PSHI, PSH, SH). Se agitó el tubo para homogenizar la suspensión y se dispensaron 4 mL en una cubeta de cuarzo para realizar la lectura por espectrofotometría. Se realizó blanco de muestra con la solución respectiva.
- d. El equipo fue programado para leer cada minuto por 24 horas, a una longitud de onda de 600 nm y temperatura ambiente.
- e. Paralelo al punto d, se llevó a cabo la prueba del inóculo (ver punto l.e).
- f. El análisis de los datos obtenidos, se realizó con el programa para gráficos de Microsoft Excel. El análisis comparativo de las curvas de crecimiento obtenidas con cada solución fisiológica, al igual que los rangos de tiempo, densidad óptica para la fase exponencial, fase de muerte y el conteo de UFC/mL de la suspensión bacteriana de partida, se presentan en el capítulo 4, figura 26 y tabla 9, respectivamente.

### **III. Curva de Calibración de *S. aureus* en infusión cerebro corazón**

Debido a que en las curvas de crecimiento anteriores no se había tenido en cuenta el ajuste del inóculo, es decir que el inóculo de partida siempre tuvo diferente conteo de UFC/mL, se consideró realizar una curva de calibración que nos permitiera estimar el inóculo con una densidad óptica lo más próxima a cero, antes de llevar a cabo la nueva curva de crecimiento. El protocolo utilizado se describe a continuación:

- a. Se realizó un cultivo en agar infusión cerebro corazón, a partir de uno de los viales con suspensión bacteriana en medio de criopreservación. El vial se descongeló a temperatura ambiente, antes de ser utilizado.
- b. El medio de cultivo fue incubado a 37°C por 24 horas.
- c. Cumplido el tiempo de incubación, se tomaron de 2 a 3 colonias y se inocularon en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón. La suspensión se incubó por 5 horas a 37°C, para obtener un cultivo en fase exponencial con alta turbidez.
- d. En 6 tubos marcados con números del 1 al 6, se agregaron 8 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón y se realizaron 6 diluciones 1/10 a partir de la suspensión realizada en el paso anterior, como se muestra en la figura 15. Cada muestra se procesó por duplicado.



**Figura 15.** Diluciones seriadas 1:10 realizadas para la curva de calibración en infusión cerebro corazón.

- e. Se determinó la densidad óptica de cada una de las diluciones, a una longitud de onda de 650 nm.
- d. Se realizó la prueba del inóculo a cada una de las diluciones, al igual que a la suspensión inicial, siguiendo el procedimiento descrito en el punto I.e, con la diferencia que sólo se realizaron 5 diluciones seriadas 1:100.
- e. Los resultados fueron procesados utilizando el programa para gráficos de Microsoft Excel. Los valores de UFC/mL y densidad óptica para cada dilución, al igual que la curva de calibración obtenida con dichos valores, se presentan en el capítulo 4 en la tabla 10 y figura 28, respectivamente.

#### **IV. Curva de crecimiento de *S. aureus* en pool de suero humano, con ajuste del inóculo**

Una vez realizada la curva de calibración, donde se determinó la concentración en UFC/mL de una DO lo más cercana a 0, se continuó con el desarrollo de la nueva curva de crecimiento, para la que se seleccionó pool de suero humano inactivando el complemento a 56°C, teniendo en cuenta que según las anteriores curvas de crecimiento, en esta solución, el microorganismo se había desarrollado de forma más satisfactoria. Las lecturas por espectrofotometría se realizaron en el espectrofotómetro Espectronic 20D, por la facilidad en el manejo y lectura de las muestras. Las lecturas fueron realizadas cada 2 horas y adicionalmente, en los mismos periodos, se determinó el recuento de UFC/mL. A continuación se describe el procedimiento utilizado:

- a.** Los puntos a, b y c de la curva de calibración descrita en el punto III, son iguales para este procedimiento.
- b.** Se ajustó un inóculo bacteriano a una densidad óptica de 0.001, con el fin de obtener un inóculo aproximado de  $1 \times 10^6$ , teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el punto III.
- c.** En 2 tubos de 13x100 mm, se inocularon 80  $\mu$ L en 8 mL de pool de suero humano inactivado, posteriormente se cubrieron con parafilm y se agitaron para homogenizar la suspensión bacteriana.
- d.** Los tubos se mantuvieron a 37°C en una incubadora Burnstead Labline.
- e.** Se realizaron lecturas de densidad óptica (DO) a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 48, 54 y 58 horas, a una longitud de onda de 650 nm. Las muestras fueron mezcladas suavemente antes de cada lectura.
- f.** Con el fin de verificar que las lecturas de DO si correspondieran con comportamiento del *S. aureus* y no con la generación de metabolitos secundarios, paralelamente se llevó a cabo la determinación de UFC/mL, en los mismos periodos de tiempo descritos en el punto anterior. Para dicha determinación, se siguió el procedimiento descrito en el punto I.e, con la diferencia que se realizaron 5 diluciones seriadas 1:100.

**g.** Los resultados fueron procesados utilizando el programa para gráficos de Microsoft Excel. El conteo de UFC/mL y la densidad óptica determinados en cada muestreo, al igual que las curvas de crecimiento de cada uno de estos parámetros con relación al tiempo, se presentan en la tabla 11 y figura 29, respectivamente. La curva de calibración obtenida al enfrentar el conteo de UFC/mL con los valores de densidad óptica, se presenta en la figura 30.

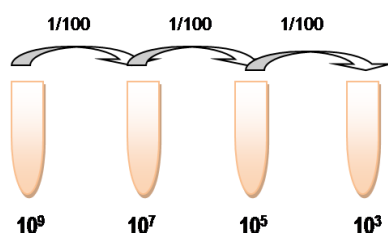
## **V. Evaluación de la variabilidad de lecturas de DO menores a 0.010**

Tomando en consideración que al momento de la realización de la curva de crecimiento descrita en el punto IV, el ajuste del inóculo de partida a una densidad óptica de 0.001, no se logró con facilidad, debido a que el espectrofotómetro Espectronic 20D presentó variaciones de las lecturas en muestras con DO menores a 0.01, se tomó la decisión de evaluar el equipo y poder validar los resultados, para lo cual se prepararon por triplicado suspensiones de *S. aureus* en solución de Hartman, siguiendo la metodología que a continuación se describe:

- a.** Se realizó un cultivo en agar infusión cerebro corazón, a partir de uno de los viales con suspensión bacteriana en medio de criopreservación. El vial se descongeló a temperatura ambiente, antes de ser utilizado.
- b.** La siembra fue incubada a 37°C por 24 horas.
- c.** Cumplido el tiempo de incubación, se tomaron de 2 a 3 colonias y se inocularon en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón. La suspensión se incubó por 5 horas a 37°C, para obtener un cultivo en fase exponencial con alta turbidez.
- d.** Los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm, posteriormente se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 6 mL de solución de Hartman. Este proceso de lavado se repitió dos veces más, para finalmente resuspender el pellet en 8 mL de solución Hartman.

e. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la curva de calibración descrita en el punto III, la densidad óptica se ajustó a 0.17, esperando obtener un recuento aproximado de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.

f. Como se muestra en la figura 16, a partir de la suspensión bacteriana con DO de 0.17, se realizaron 3 diluciones seriadas 1:100, en solución de Hartman, esperando obtener recuentos aproximados de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^3$  UFC/mL, respectivamente. Se le realizaron 3 lecturas a cada tubo, tanto en el espectrofotómetro espectronic 20D como en el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 25.



**Figura 16.** Diluciones seriadas 1:100 a partir de una suspensión bacteriana  $10^9$ , en solución de Hartman.

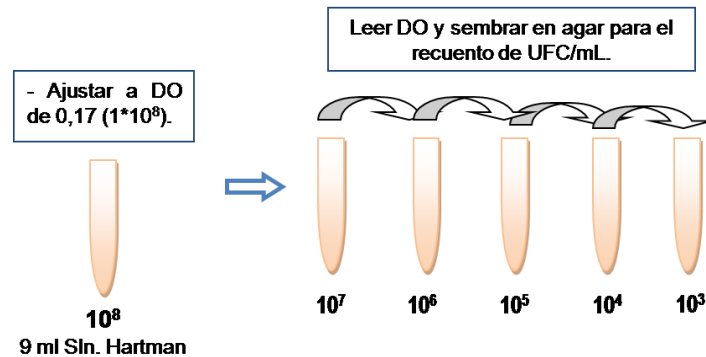
d. Adicionalmente, en las suspensiones correspondientes a las concentraciones de  $10^9$  y  $10^3$  se les determinó el recuento de UFC/mL, de acuerdo con el protocolo para la prueba del inóculo realizado en el punto I.e, con la diferencia que sólo se realizaron 4 diluciones seriadas 1:100, a partir de cada suspensión.

e. Los datos fueron tabulados y comparados para establecer las diferencias entre cada medición, como se presenta en el capítulo 4, tabla 11.

## VI. Verificación de la curva de calibración en solución de Hartman

Debido que el conteo UFC/mL esperado a una DO de 0.17, no fue de  $10^9$  sino de  $10^8$ , se llevó a cabo una nueva curva de calibración, con el fin de verificar los resultados, además de obtener conteo de UFC/mL de cada una de las diluciones

de  $10^8$  a  $10^3$ . Para este fin, se realizaron 5 diluciones seriadas 1:10 en solución de Hartman y las lecturas por espectrofotometría se realizaron solo una vez, en el espectrofotómetro espectral 20D. La determinación de UFC/mL para cada dilución, fue igual a la descrita en el punto I.e, con la diferencia que sólo se realizaron 4 diluciones seriadas 1:100. A continuación en la figura 15, se presenta un esquema de dicho procedimiento.



**Figura 17.** Esquema de las diluciones seriadas 1:10, realizadas para determinar la DO y el recuento de UFC/mL en cada suspensión.

Los datos fueron tabulados y graficados utilizando el programa Microsoft Excel y se presentan en el capítulo 4, tabla 13 y figura 31, respectivamente.

### **3.1.3 Caracterización por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (ATR-FTIR) y observación por microscopía de fuerza atómica (AFM) de *Staphylococcus aureus***

La espectroscopia infrarroja es una técnica no destructiva que permite obtener información de la composición química de una muestra. Esta técnica es apropiada para monitorear el desarrollo de biopelículas debido a su capacidad para discriminar los cambios bioquímicos y estructurales en la composición de las células microbianas<sup>[71]</sup>. El equipo utilizado fue un espectroscopio infrarrojo con transformada de Fourier, utilizando el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) marca Perkin Elmer modelo Spectrum One. La

preparación de la muestra se hizo en base a la metodología propuesta por Erukhimovitch V., 2005<sup>[68]</sup>. El procedimiento utilizado se describe a continuación:

- a. Partir de un cultivo fresco de *S. aureus*, de no más de 24 horas.
- b. Tomar de 4 a 6 colonias y colocarlas directamente sobre el ATR.
- c. Determinar el espectro IR de la muestra.

Adicionalmente, las células de *S. aureus* fueron observadas por microscopía de fuerza atómica, para tener información complementaria sobre su morfología. Para este fin se realizó un frotis de la bacteria sobre una lámina portaobjetos, a partir de un cultivo fresco que no tuviera más de 24 horas. La muestra se dejó secar completamente y posteriormente fue observada en el AFM, utilizando el modo de contacto.

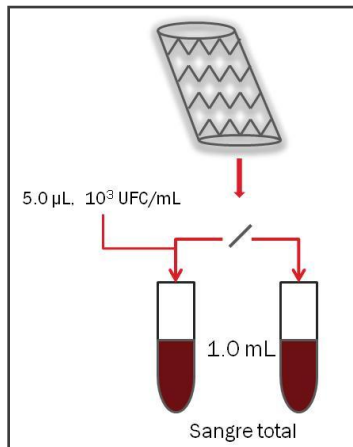
## **3.2 Desarrollo y caracterización de la biopelícula**

### **3.2.1 Generación de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* utilizando un sistema estático.**

Para observar el proceso de adhesión bacteriana, se fragmentó un stent de Nitinol en pedazos de 0.5 cm, los cuales posteriormente fueron sumergidos en sangre total con y sin inóculo bacteriano de *S. aureus*. Estas muestras fueron monitoreadas a las 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas. El procedimiento utilizado se describe a continuación:

- a. A partir de un sujeto voluntario, se obtuvo una muestra de 10 mL de sangre con 1.4 mL de anticoagulante CPDA-1 (Baxter). La composición del anticoagulante, se describe en el anexo 1.
- b. En 2 microviales se dispensó 1 mL sangre total anticoagulada.
- c. Se preparó un inóculo de *S. aureus* de  $10^3$  UFC/mL, teniendo en cuenta el procedimiento descrito en el punto **3.1.2** inciso VI.

d. A uno de los tubos se le adicionaron 5 uL del inóculo bacteriano preparado en el paso anterior, la otra muestra se utilizó como blanco.



**Figura 18.** Sistema estático.

e. Las muestra inoculada y el blanco fueron incubados a 37° C por un total de 168 horas.

f. Cada 24 horas a partir de la hora 0, se tomó una muestra de sangre, tanto de la muestra inoculada como del blanco, para la realización del conteo de UFC/mL y extendido de sangre para coloración de Wright. El procedimiento para el recuento de UFC/mL se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el punto **3.2.1** inciso **I.e**, con la diferencia que se realizaron 5 diluciones seriadas 1:100 en solución de Hartman.

La **coloración de Wright** se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a. Colocar una gota de 20 µL de sangre sobre una lámina cubreobjetos.
- b. Extender la gota sobre la lámina con ayuda de otra lámina cubreobjetos en forma perpendicular, de tal forma que el extendido se vaya adelgazando gradualmente formado tres fases: cabeza, cuerpo y cola.
- c. Dejar secar el extendido a temperatura ambiente.
- d. Colocar unas gotas de colorante de Wright sobre el extendido, hasta que se cubra completamente. Dejar actuar por 3 minutos.

- e. Agregar 5 gotas de agua destilada o buffer pH 6.8 y soplar hasta observar la formación de una capa tornasol. Dejar por 4 minutos.
- f. Retirar el colorante agregando agua suavemente. Dejar secar las láminas a temperatura ambiente.
- g. Observar en microscopio de luz a 100x, utilizando aceite de inmersión.

### **3.2.2 Generación de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* utilizando un sistema de flujo**

Se desarrolló un sistema de flujo, en el que al igual que en el sistema estático, se empleó sangre total, de tal forma que se suministraran los nutrientes necesarios para el crecimiento óptimo del microorganismo en cuestión, además de simular otras condiciones fisiológicas, como la velocidad de flujo, el suministro constante de oxígeno y la interacción con células endoteliales. Para este fin se utilizó un baño de tejidos marca Panlab modelo LE11.100 V22/03/04, el cual permite mantener los tejidos inmersos en solución fisiológica, con temperatura controlada a 37°C y posee una válvula a través de la cual se introduce oxígeno al sistema, para permitir el intercambio de gases e incrementar la viabilidad tanto del endotelio como de las células sanguíneas.

Para la obtención del tejido endotelial y sangre total, fueron empleadas ratas entre los 300 y 600 g, a las cuales se les extrajo la totalidad de su sangre y un fragmento de arteria aorta de la región abdominal. A continuación se describen los pasos que se llevaron a cabo durante el desarrollo del sistema, incluyendo la manipulación de los animales:

#### **Procedimiento quirúrgico**

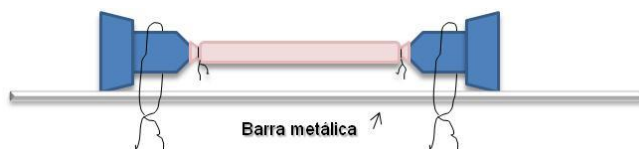
- a. Inyectar una combinación de clorketam y lidocaína a cada una de las ratas que serán utilizadas y esperar a que estén completamente anestesiadas.
- b. Pesar cada animal antes de iniciar el procedimiento quirúrgico.

- c. Rasurar el abdomen y tórax de cada rata y colocar el animal que va a ser intervenido sobre la tabla de disección. Amarrar las extremidades del animal para evitar que este se mueva durante la cirugía.
- d. Diseccionar el animal pasando el bisturí por la línea central abdomen.
- e. Con una jeringa de 10 mL con 1.5 mL de anticoagulante CPDA (ver composición en el anexo 1), punzar el extremo inferior de la arteria aorta y extraer toda la sangre del animal. Desangrar de 3 a 4 ratas para obtener un total aproximado de 40 mL de sangre total. Reunir el total de sangre extraída en una sola bolsa de sangre.
- f. Una vez extraído el total de la sangre (aproximadamente 10-15 ml), cortar un fragmento de aproximadamente 2 cm de la arteria aorta y sumergir en solución de Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL). La Composición de dicha solución se describe en el anexo 1.
- g. Tomar la arteria extraída e insertar dentro de la misma el stent de Nitinol, con ayuda del sistema de colocación que permite la extensión del stent.
- h. Amarrar cada extremo de la arteria utilizando sutura quirúrgica, a la punta de dos catéteres punzocat.



**Figura 19.** Preparación de la arteria.

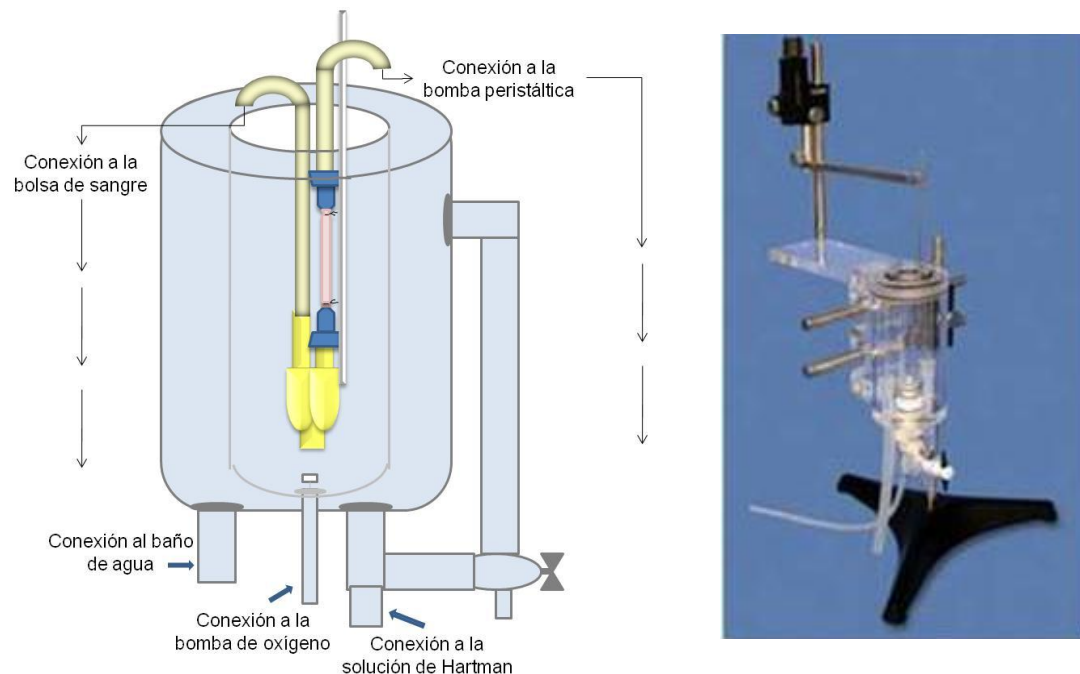
- i. Fijar la arteria preparada a la barra metálica que se inserta en el baño de tejidos.



**Figura 20.** Fijación de la arteria

## Sistema de flujo

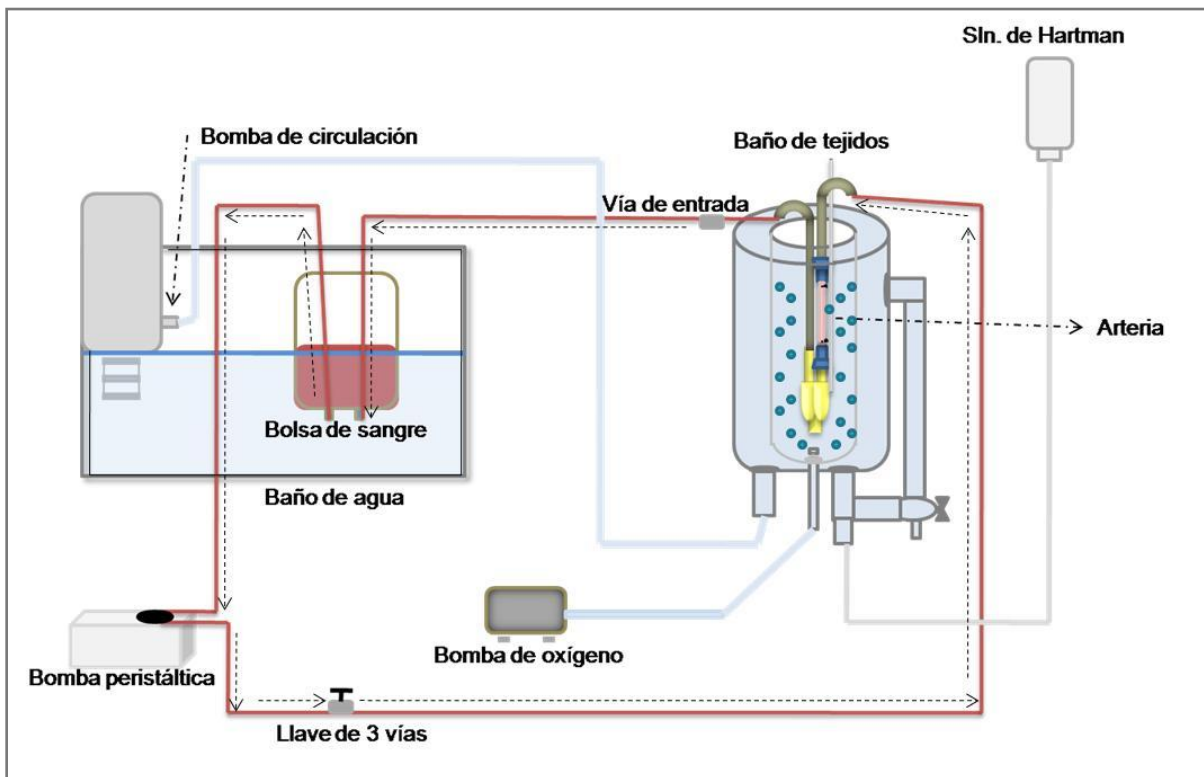
- j. Conectar dos equipos de venoclisís a una bomba peristáltica. Una de los tubos debe ir conectado a la bolsa de sangre extraída (vía de salida) y el otro debe ir conectado al extremo del punzocat que conecta con la arteria.
- k. El punzocat que se encuentra conectado al otro extremo de la arteria, debe ir conectado directamente a la bolsa de sangre, lugar por donde se da la vía de salida de la sangre.
- l. Una vez conectados todos los tubos a la arteria, colocarla dentro del baño de tejidos.



**Figura 21.** Baño de tejidos. Este baño consta de una cámara externa con conexión a un baño de agua, y una cámara interna con dos conexiones, una de ellas conecta a una bomba de oxígeno y la otra conecta al suministro de solución fisiológica de Hartman.

- m. Conectar la cámara de inmersión a la bomba de circulación del baño de agua, el cual previamente ha sido llevado a 37°C. Esta conexión suministra agua en la parte externa del baño, para mantener atemperada la arteria.

- n. Otra manguera conecta a la cámara interna para suministrar solución de Hartman, y una última manguera se conecta a la parte interna de la cámara, para suministrar constantemente oxígeno.
- o. Una vez ensamblado todo el sistema de flujo, encender la bomba peristáltica a una velocidad de 50 mL/min y verificar que la sangre este fluyendo por todo el sistema.



**Figura 22.** Sistema de flujo. Este sistema consta de un baño de tejidos donde se encuentra inmersa la arteria preparada; Un baño de agua con bomba de circulación que suministra constantemente agua a 37°C al baño de tejidos; una bomba de oxígeno y un suministro de solución fisiológica de Hartman, que conectan con el baño de tejidos; Una llave de 3 vías y una vía de entrada para la toma de muestras y adición del inóculo bacteriano; y por último, una bomba peristáltica ajustada a una velocidad de flujo de 50 mL/min.

- p. Con una jeringa de 1 mL, agregar al sistema de flujo 200 µL de un inóculo de  $10^3$  UFC/mL. Dejar circulando el sistema por 24 horas.

- q. Durante el tiempo de funcionamiento del sistema, tomar muestras de sangre cada 12 horas, comenzando desde el momento en que se ponga en funcionamiento (hora 0) y realizar el conteo de UFC/mL, al igual que extendidos de sangre para su coloración con Wright.
- r. Transcurrido el tiempo, retirar el stent cuidadosamente y procesar para su análisis por SEM, EDS, FTIR y cuantificación de azúcares y proteínas.

### **3.2.3 Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)**

Una vez generadas las biopelículas tanto en el sistema estático como en el sistema de flujo, fué necesario llevar a cabo un pretratamiento que permitiera extraer las EPS. Cabe recordar que dichas sustancias, son el principal componente del glicocalix que sostiene la biopelícula, y está conformado principalmente por exopolisacáridos y en una menor proporción, por proteínas. Este procedimiento se realizó en base al descrito por Zhang, X. y colaboradores<sup>[72]</sup> y se describe a continuación:

- a. En microviales con 1 mL de solución salina al 0.85%, se sumergieron por separado, el fragmento de Nitinol utilizado en el sistema estático y el stent utilizado en el sistema de flujo.
- b. La biopelículas adheridas, fueron desprendidas de las muestras descritas en el punto anterior, sometiéndolas a sonicación durante un minuto, con el fin de que quedaran suspendidas en la solución salina.
- c. Dichas suspensiones fueron transferidas a nuevos microviales, y se les agregaron 2.2 µL de formaldehído.
- d. Estas últimas preparaciones, fueron colocadas en hielo granizado por 10 minutos y a continuación se agitaron fuertemente durante 3 minutos.
- e. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante una hora. Una vez removidos los residuos sólidos, el sobrenadante estuvo listo para la cuantificación de azúcares y proteínas.

### 3.2.4 Cuantificación de azúcares y proteínas durante el desarrollo de biopelículas

Se realizó la cuantificación de azúcares y proteínas a las muestras procesadas tanto para el sistema estático como para el sistema de flujo de acuerdo con los protocolos descritos a continuación:

#### Cuantificación de azúcares totales por el método de Dubois

Este método descrito por Dubois, M. y colaboradores<sup>[73]</sup>, se basa en la reacción que manifiestan los azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos y sus derivados cuando son tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado, desarrollando un color naranja-amarillo. El ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) aumenta la temperatura de las muestras para hidrolizar los polisacáridos, deshidratar los monosacáridos y así obtener las formas furfural e hidroximetilfurfural de las pentosas y hexosas respectivamente. Estas soluciones son luego tratadas con un reactivo aromático (fenol) para producir un compuesto coloreado que se puede medir espectrofotométricamente. Las pentosas, hexosas, heptosas y sus derivados, excepto aminoazúcares, reaccionan generando un producto coloreado, mientras que las triosas y tetrasas no. Este método permite determinar cantidades muy pequeñas de azúcares y sustancias relacionadas. A continuación se describe la técnica empleada:

- a. Estándar de glucosa: Prepara 100 mL a una concentración de 400  $\mu\text{g/mL}$ . Tomar 40 mg de glucosa anhidrida grado analítico, disolver y ajustar a 100 mL con agua destilada. Rotular la solución y mantener a 4°C.
- b. Curva de calibración: A partir del estándar de glucosa, preparar soluciones de glucosa de 0, 10, 20, 40, 50 y 60  $\mu\text{g/mL}$ , de acuerdo con la tabla 5:

**Tabla 5.** Soluciones estándar de glucosa.

<b>Estándar de glucosa (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0	25	50	75	100	125	150
<b>Agua destilada (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1000	975	950	925	900	875	850
<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0	10	20	30	40	50	60

c. Preparación de la muestra problema: Diluir la muestra a analizar de la siguiente manera:

**5%** : 50  $\mu$ L de muestra + 950  $\mu$ L de agua destilada

**10%** : 100  $\mu$ L de muestra + 900  $\mu$ L de agua destilada

d. Análisis de las muestras:

- Tomar 1 mL de la muestra problema y/o solución estándar y blanco, en tubos de ensayo de vidrio.
- Adicionar 0,5 mL de solución de fenol al 5%.
- Adicionar 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (tratar de no deslizar el ácido por las paredes del tubo de ensayo).
- Llevar al vortex para mezclar y capturar los restos de ácido que hayan podido quedar en las paredes del tubo.
- Dejar reposar de 10-15 minutos.
- Transferir a las celdas colorimétricas.
- Leer en primer lugar las soluciones estándar para realizar la curva de calibración, a una longitud de onda de 490 nm. Posteriormente leer las muestras problema.

### **Cuantificación de proteínas por el método de Bradford**

Este procedimiento se llevó a cabo para la cuantificación de proteínas durante el proceso de formación de la biopelícula en el sistema estático.

El método de Bradford, es un método colorimétrico que se basa en la detección del complejo que se origina entre la forma iónica del colorante azul G250 de Coomassie y las proteínas, el cual es detectable una longitud de onda de 595 nm. El colorante se une específicamente a los residuos proteicos arginilo y lisilo, pero no se une a los aminoácidos que se encuentran en forma libre, de acuerdo con ello la técnica es específica para las proteínas, sin embargo puede tener ciertas variaciones dependiendo de las proteínas evaluadas, ya que los residuos proteicos que se unen al colorante, se

encuentran en diferente proporción <sup>[74]</sup>. A continuación se describe dicha técnica:

**a. Preparación del reactivo:** Disolver 100 mg de azul de Coomassie G250 en 50 mL de etanol al 95%. Posteriormente mezclar dicha solución con 100 mL de ácido fosfórico al 85% y por último llevar toda la solución a 1 L con agua destilada. Filtrar la solución con un filtro Whatman No. 1 y almacenar en una botella ámbar a temperatura ambiente. Siempre filtrar el reactivo antes de usarlo.

**b. Estándar de proteína:** Preparar una concentración de 1mg/mL de albúmina bovina (Proteína estándar, 2mg BSA/mL en 0,9% NaCl con 0,05% de ácido de sodio ) en agua destilada.

**c. Curva de calibración:** Pipetear volúmenes de 1, 2, 5, 10, 20 y 40  $\mu$ L a partir del estándar de proteína y llevar cada solución a 100  $\mu$ L con agua destilada, de acuerdo con la tabla 6. Para el blanco utilizar 100  $\mu$ L de agua destilada.

**Tabla 6.** Soluciones estándar de albúmina bovina para la curva de calibración utilizando el método de Bradford.

<b>Albúmina bovina (<math>\mu</math>L)</b>	1	2	5	10	20	40
<b>Agua destilada (<math>\mu</math>L)</b>	99	98	95	90	80	60
<b>Concentración (<math>\mu</math>g/mL)</b>	10	20	50	100	200	400

**d. Preparación de la muestra problema:** Preparar 100  $\mu$ L de la muestra problema, haciendo diluciones de 1/10 a 1/1000, dependiendo de la concentración de proteínas esperada en el tipo de muestra. Prepare las muestras por duplicado.

**e. Análisis de las muestras:** Añadir 5 mL del reactivo a cada muestra y mezclar por inversión o utilizando vortex. Evitar la formación de espuma.

**f.** Realizar primero la curva de calibración, midiendo las soluciones del estándar de proteína a una longitud de onda de 595 nm, para posteriormente leer las muestras problema.

## Cuantificación de proteínas por absorción UV

Este procedimiento se llevó a cabo para la cuantificación de proteínas durante el proceso de formación de la biopelícula en el sistema de flujo.

Este método, se basa en la absorción de la radiación por parte de las proteínas, dependiendo del contenido de los aminoácidos tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), a una longitud de onda de 280 nm. De acuerdo con lo anterior, pueden observarse grandes diferencias entre los valores obtenidos para diferentes proteínas<sup>[75]</sup>. La descripción de dicha técnica se presenta a continuación:

- a. Preparación de estándares de albúmina bovina a partir de una solución estándar de 1 mg/mL.

**Tabla 7.** Soluciones estándares de albúmina bovina para la curva de calibración utilizando el método de absorción UV.

Proteína (µL)	Solución salina (µL)	Conc. (µg/mL)	Proteína (µL)	Solución salina (µL)	Conc. (ug/mL)
5	4995	1	375	4625	75
10	4990	2	500	4500	100
25	4975	5	750	4250	150
50	4950	10	1000	4000	200
100	4900	20	1500	3500	300
150	4850	30	2000	3000	400
200	4800	40	2500	2500	500
250	4750	50	5000	---	1000

- b. Cada estándar y cada muestra, fueron leídos a una longitud de onda de 280 nm y la concentración se calculó aplicando la siguiente fórmula de acuerdo con la ley de Beer-Lambert:

$$C_{\mu\text{g/mL}} = (A_{280}/\epsilon_{\%}) 10,000$$

Donde  $C_{\mu\text{g/mL}}$  es la concentración de la muestra,  $A_{280}$  es la absorbancia a 280 nm,  $\epsilon_{\%}$  es el coeficiente de extinción porcentual para la albúmina bovina, el cual tiene un valor de 6.6 y **10,000** es el valor que corresponde al factor de ajuste para reportar los resultados en µg/mL.

### **3.2.5 Análisis de la biopelícula por Microscopía de barrido electrónico (SEM)**

Las muestras del sistema estático y del sistema de flujo fueron sometidas al proceso de fijación para su observación por SEM, de acuerdo con el protocolo descrito a continuación:

- a. Fijar con glutaraldehído al 2% por 2 horas.
- b. Lavar con tampón fosfato pH 7.0 por 5 minutos.
- c. Realizar una post-fijación con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 2% durante una hora (trabajar en cabina de extracción de gases).
- d. Lavar con tampón fosfato por 5 minutos.
- e. Deshidratar con etanol, de acuerdo con los siguientes esquemas de tiempo:
  - Etanol al 50%: 10 minutos
  - Etanol al 70%: 10 minutos
  - Etanol al 90%: 10 minutos
  - Etanol al 100%: 10 minutos
  - Etanol al 100%: 10 minutos
  - Etanol al 100%: 10 minutos
- f. Dejar secar a temperatura ambiente.
- g. Observar las muestras en SEM.

**Nota:** Todo el proceso de fijación de las muestras se realizó por inmersión.

### **3.2.6 Análisis de la biopelícula por rayos X de electrones dispersados (EDS)**

Las biopelículas generadas tanto en el sistema estático como en el sistema de flujo, fueron sometidas al análisis químico semi-cuantitativo de las EPS. Para esta técnica se utilizó la microsonda de rayos X adaptada en el microscopio de barrido electrónico, la cual brinda un análisis químico de la composición elemental del material del implante intravascular metálico, así como de los componentes de la biopelícula. Los análisis se realizaron en locaciones específicas, previamente identificadas por SEM.

### **3.2.7 Caracterización de la biopelícula por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

Teniendo en cuenta que la interpretación de espectros IR de compuestos biológicos se basa principalmente en el análisis de estructuras de composición conocida, tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos que frecuentemente se encuentran presentes en diferentes cantidades en las células microbianas, se identificaron y caracterizaron las sustancias poliméricas extracelulares (EPS), generadas como resultado del metabolismo celular, de las muestras procesadas tanto para el sistema estático como para el sistema de flujo. Se empleó el equipo Perkin-Elmer Spectrum One con accesorio universal de muestreo ATR de ZnSe. La caracterización se llevó a cabo relacionando las bandas sobresalientes, con los grupos funcionales más comunes en los compuestos exopoliméricos.

---

# Capítulo 4

---

## Resultados y Discusión

---

## 4.1 Activación de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

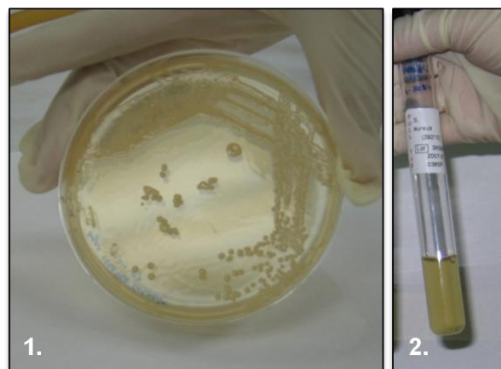
### 4.1.1 Reconstitución y almacenamiento de *Staphylococcus aureus*

Cada vial con *S. aureus* en solución de criopreservación fue colocado en una caja para microviales y almacenado a una temperatura de congelación de  $-20^{\circ}\text{C}$ . La figura 23 muestra la forma como el microorganismo fue almacenado:



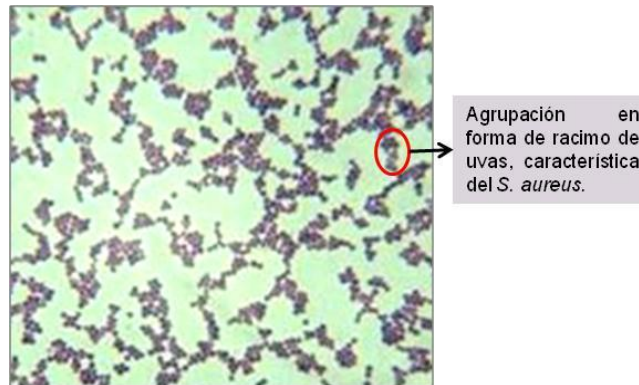
**Figura 23.** Almacenamiento de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La cepa recién reconstituida fue cultivada en agar y caldo Infusión Cerebro Corazón. Después de un periodo de incubación de 24 horas, se obtuvo satisfactoriamente el desarrollo de *S. aureus* en ambos medios. La figura 24, muestra el desarrollo de colonias redondas con bordes definidos, color amarillo crema, características del *S. aureus*. El medio de cultivo líquido muestra una alta turbidez, lo que indica un abundante crecimiento del microorganismo.



**Figura 24.** (1) Cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 en agar. (2) Cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 en caldo.

La figura 25, muestra la coloración de gram, en la que se evidenció la presencia de cocos gram positivos, agrupados en forma de racimo de uvas, compatibles con el género *Staphylococcus*. De esta manera se confirmó también la pureza de la cepa.



**Figura 25.** Coloración de gram del *S. aureus* ATCC 29213.

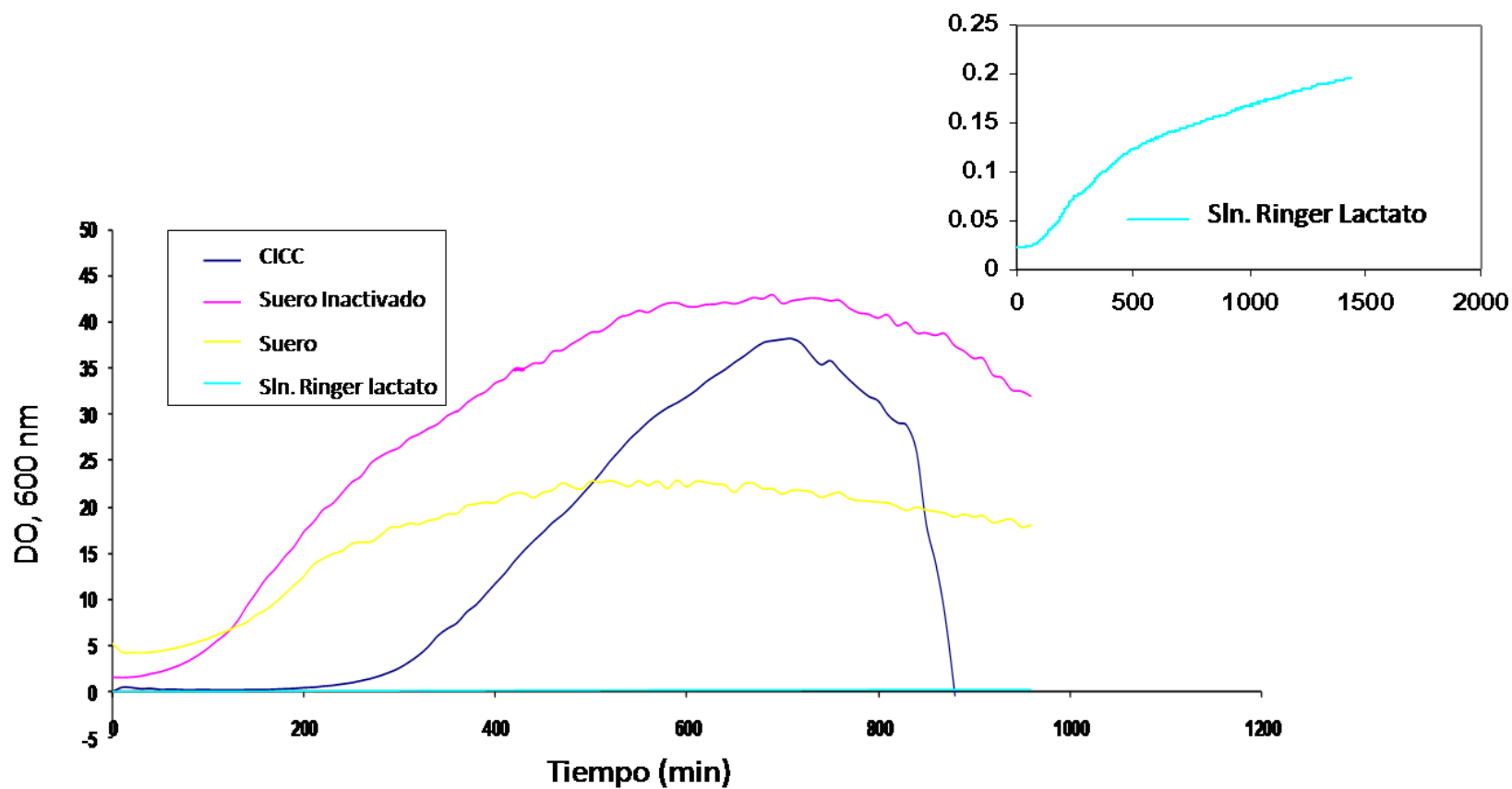
Otra prueba realizada para confirmar la especie y pureza de la cepa, fue una prueba de identificación realizada con el Kit comercial para microorganismos Gram positivos, BD-BBL Crystal, Identification System, el cual emplea diferentes reacciones bioquímicas, para las que se obtuvieron los siguientes resultados afirmando la presencia de *S. aureus*, de acuerdo con los valores de referencia reportados por el kit:

**Tabla 8.** Pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos gram positivos.

Substrato	Código	Pos.	Neg.
4MU-β-D-glucósido	FGC		X
L-valina-AMC	FVA		X
L-fenilalanina-AMC	FPH		X
4MU-α-D-glucósido	FGS		X
Ácido L-piroglutámico –AMC	FPY	X	
L-triptofano-AMC	FTR	X	
L-arginina-AMC	FAR	X	
4MU-N-acetil-β-D-glucosaminida	FGA		X
4MU-fosfato	FHO	X	
4MU-β-D-glucoronido	FGN		X
L-isoleucina-AMC	FIS		X
Trealosa	TRE	X	
Lactosa	LAC	X	
Metil-α & β-glucósido	MAB	X	
Sucrosa	SUC	X	
Manitol	MNT	X	
Maltotriosa	MTT	X	
Arabinosa	ARA		X
Glicerol	GLR	X	
Fructose	FRU	X	
p-n-p-β-D-glucósido	BGL	X	
p-n-p-β-D-celobiosido	PCE		X
Prolina & Leucina p-nitroanilida	PLN		X
p-n-p-fosfato	PCE	X	
p-n-p-α-D-maltosida	PAM	X	
ONPG & p-n-p-α-D-galactosido	PGO		X
Urea	URE		X
Esculina	ESC	X	
Arginina	ARG	X	

#### 4.1.2 Curvas de crecimiento y calibración de *Staphylococcus aureus*

La figura 26 muestra el crecimiento de *S. aureus* en los medios descritos en el capítulo 3, **puntos I y II**. En las curvas se pueden apreciar las 4 fases del crecimiento microbiano, observándose con mayor claridad en las soluciones Infusión cerebro corazón y suero inactivado.



**Figura 26.** Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* utilizando Caldo Infusión Cerebro Corazón (CICC) (—), Suero Inactivado (—), Suero sin inactivar (—) y Solución de Harman ó Ringer-Lactato (—).

- Fase de latencia: En la solución Infusión Cerebro Corazón, las células bacterianas se encontraban en la etapa de adaptación, después de haber permanecido liofilizadas por un largo periodo de tiempo. El inóculo utilizado en las soluciones de suero inactivado y sin inactivar provenían de la colonia madre, la cual fue previamente incubada en placa a 37°C por 24 horas. Adicionalmente el inóculo agregado a dichas soluciones fue mayor, por lo que la fase de latencia fue más corta en ambos casos. De acuerdo con la literatura, las bacterias se encuentran formando enzimas y metabolitos intermediarios, hasta alcanzar concentraciones que permitan que el crecimiento se reinicie<sup>[76]</sup>. El tiempo de duración en esta fase para cada curva, se presenta en la tabla 9.
- Fase exponencial: Esta fase puede apreciarse con mayor claridad en la curva de crecimiento donde se utilizó CICC. Para la curva obtenida con la solución de suero inactivado, se observó una fase mucho más larga y pronunciada, comparada con las demás curvas, lo que puede atribuirse a la presencia de glucosa y albúmina en el medio de crecimiento, las cuales son utilizadas por el microorganismo como nutrientes, que permiten el desarrollo óptimo del *S. aureus*. En la curva obtenida con suero sin inactivar, el tiempo de duración de la fase exponencial es mucho más corto, comparado con demás curvas, lo que podría ser provocado por el efecto del sistema inmunológico, en especial por el complemento, el cual al no ser inactivado a 56°C, puede inhibir el desarrollo de los microorganismos. Por otro lado también puede ser considerado el tamaño del inóculo, ya que comparado con el preparado para las demás soluciones, este último fue mucho mayor, lo que propicia el aceleramiento de las fases de latencia y exponencial, alcanzando más rápidamente la fase de estacionaria.

La fase exponencial sigue una cinética de primer orden, de la cual es posible establecer la constante de velocidad de crecimiento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$N = N_0 e^{kt}$$

Donde  $N_0$  es el número de células en el tiempo cero y  $N$  es el número de células  $n$  en cualquier momento,  $t$ . En la tabla 9, se presentan los valores del tiempo de duración de la fase exponencial para las curvas de crecimiento obtenidas con las diferentes soluciones.

- Fase estacionaria: Esta fase se presenta cuando el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos hace que el crecimiento cese por completo, y aunque se habla de que en la mayoría de los casos hay recambio celular por la pérdida lenta de células por muerte, seguida por una compensación al formarse nuevas células<sup>[76]</sup>, en el caso de *S. aureus* en CICC, se observó que dicha fase tuvo un periodo de tiempo bastante corto, comparado con las otras dos curvas, que puede ser atribuido a que dicha compensación no suplió por completo la pérdida celular. El rango de tiempo y densidad óptica de esta fase, se presenta para cada curva, en la tabla 9.
- Fase de muerte: El tiempo de muerte para la curva obtenida con CICC, fue menor comparado con las curvas obtenidas con suero inactivado y sin inactivar, donde el inicio de esta fase apenas alcanza a apreciarse. El descenso en la curva por la muerte celular es debido al agotamiento de nutrientes y el exceso de compuestos tóxicos para el microorganismo. De acuerdo con lo anterior, la cantidad de nutrientes en los pool de suero humano, debe ser mayor a la cantidad presente en el CICC, teniendo en cuenta que en el suero se encuentran concentradas las diferentes sustancias que el organismo necesita, entre las que se encuentran, electrolitos, azúcares y proteínas. El rango de tiempo de duración de esta fase y el rango de densidad óptica para cada una de las curvas de crecimiento, se presentan en la tabla 9.

La curva de crecimiento realizada en solución de Hartman comercial (PiSA), se presenta con aumentos en la Figura 26, dado que las escalas son diferentes. En esta última es posible observar un crecimiento continuo de *S. aureus*. Los

rangos de densidad óptica van de 0,0361 a 0,0553. En la tabla 9, se presentan los valores anteriormente mencionados al igual que el tamaño del inóculo.

**Tabla 9.** Tabla comparativa de los datos obtenidos en las curvas de crecimiento realizadas con diferentes soluciones.

Soluciones	Rangos de <sup>1</sup> DO a $\lambda=600\text{nm}$ y tiempo (t) en horas					Inóculo (UFC/mL)
		<sup>2</sup> FI	<sup>3</sup> Fex	<sup>4</sup> Fes	<sup>5</sup> Fm	
Caldo ICC	DO	-0.062 a 0.45	0.46 a 37.9	38 a 38.08	37 a 5.4	$8 \times 10^8$
	t	0 a 3	3 a 11	11 a 12	12 a 14.5	
Suero humano no inactivado	DO	5.2 a 4.6	4.7 a 22.1	22.2 a 22.3	21.8 a 18	$8 \times 10^{10}$
	t	0 a 1	1 a 8	8 a 12	12 a 16	
Suero humano inactivado	DO	1.5 a 2.1	2.2 a 41.6	41.6 a 41.7	41.8 a 31.9	$1 \times 10^{11}$
	t	0 a 0.8	0.8 a 9	9 a 13	13 a 16	
Solución de Hartman	DO	0.02 a 0.05	--	--	--	$3 \times 10^6$
	t	0 a 32	--	--	--	

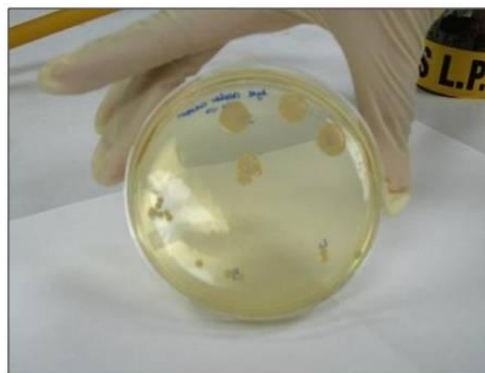
1. DO: Densidad óptica  
2. FI: Fase de latencia

3. Fex: Fase exponencial  
4. Fes: Fase estacionaria

5. Fm: Fase de muerte

**Nota:** Los números resaltados en rojo hacen referencia a las DO ópticas de partida en las diferentes soluciones y al tiempo total en el que se desarrollaron las curvas de crecimiento.

La figura 27, muestra como se obtienen los resultados para la prueba del inóculo, cuando se siembran diferentes diluciones en una placa de agar Infusión Cerebro Corazón.

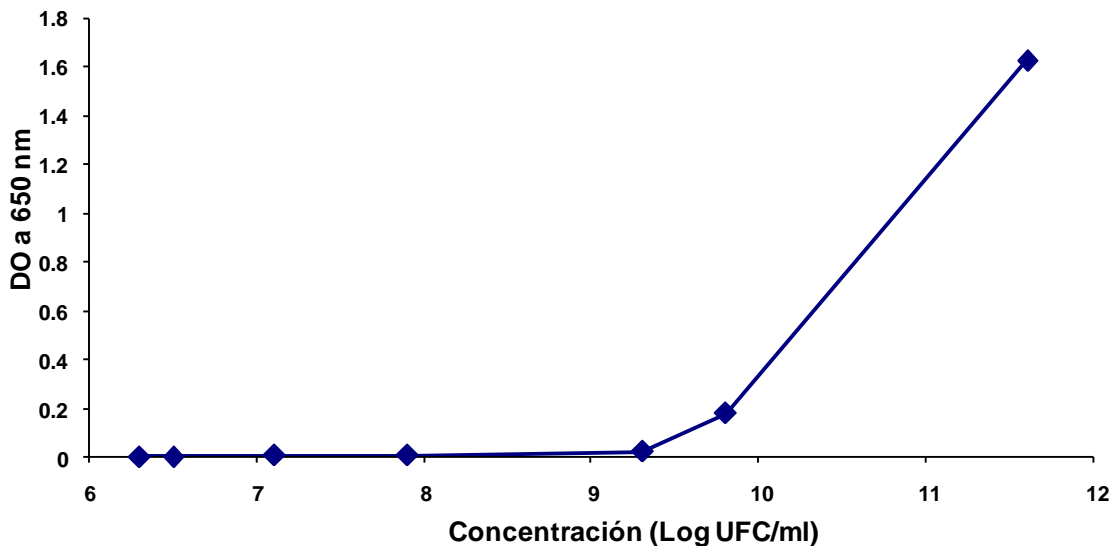


**Figura 27.** Conteo de UFC/mL de *S. aureus* en la prueba del inóculo.

Los valores de UFC/mL y DO obtenidos para la curva de calibración de *S. aureus* en caldo infusión cerebro corazón, descrita en el **punto III** del capítulo 3, se presentan a continuación en la tabla 10 y figura 28.

**Tabla 10.** Lecturas de DO y UFC/mL obtenidas para diferentes diluciones de *S. aureus* en Caldo Infusión Cerebro Corazón.

Dilución	UFC/mL	UFC/mL LOG10	DO
$10^{-1}$	$4 \times 10^{11}$	11,6	1,630
$10^{-2}$	$6 \times 10^9$	9,8	0,179
$10^{-3}$	$2 \times 10^9$	9,3	0,021
$10^{-4}$	$7 \times 10^7$	7,9	0,006
$10^{-5}$	$1 \times 10^7$	7,1	0,004
$10^{-6}$	$3 \times 10^6$	6,5	0,001
$10^{-7}$	$2 \times 10^6$	6,3	0,001



**Figura 28.** Curva calibración de *S. aureus* en caldo infusión cerebro corazón.

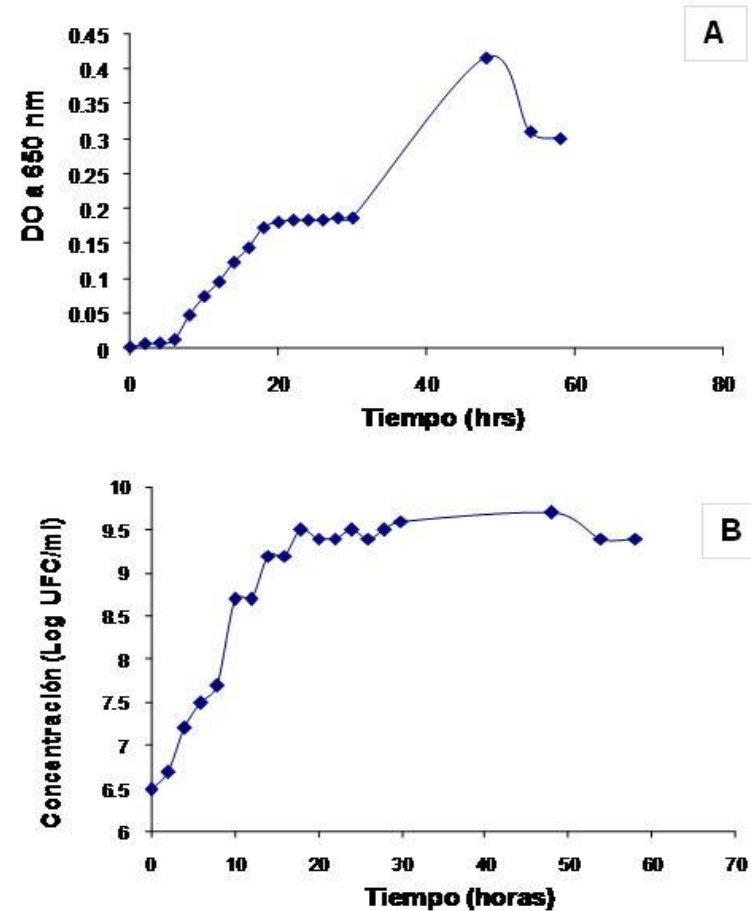
De acuerdo con lo anterior, se determinó que a una longitud de onda de 650 nm, un valor de D.O. de 0.001, en diluciones de un cultivo de *S. aureus*, realizadas en caldo Infusión Cerebro Corazón, presentaría un recuento de  $10^6$  UFC/mL, estableciendo así, que para la siguiente curva de crecimiento se prepararía un

inóculo que cumpliera dichas condiciones, y poder apreciar el crecimiento bacteriano a partir de una DO de cero.

Los resultados obtenidos para la curva de crecimiento de *S. aureus* en pool de suero humano con ajuste del inóculo, descrita en el **punto IV** del capítulo 3, se presentan en la figura 29, donde se puede observar como la bacteria comenzó a crecer lentamente, presentando la fase de latencia de las 0 a las 6 horas. Posteriormente la fase exponencial tuvo lugar de las 6 a las 18 horas con valores de DO de 0.012 a 0.173, y a partir de las 20 hasta las 30 horas, presentó un comportamiento similar al esperado en la fase estacionaria, con valores de DO entre los 0.181 a 0.187, por lo que se alargaron los intervalos en las posteriores mediciones. Sin embargo en la lectura realizada a las 48 horas se aprecia un gran aumento en el valor de la DO de 0.187 a 0.417, razón por la que se consideraron dos posibilidades: 1) La fase exponencial había continuado durante las 18 horas transcurridas entre las mediciones; ó 2) El incremento de la DO fue ocasionado por la generación de metabolitos secundarios y sustancias de desecho. Esta última afirmación fue confirmada al realizar el recuento bacteriano, ya que la concentración permanece en el orden de magnitud de  $10^9 \pm 1$  UFC/ml.

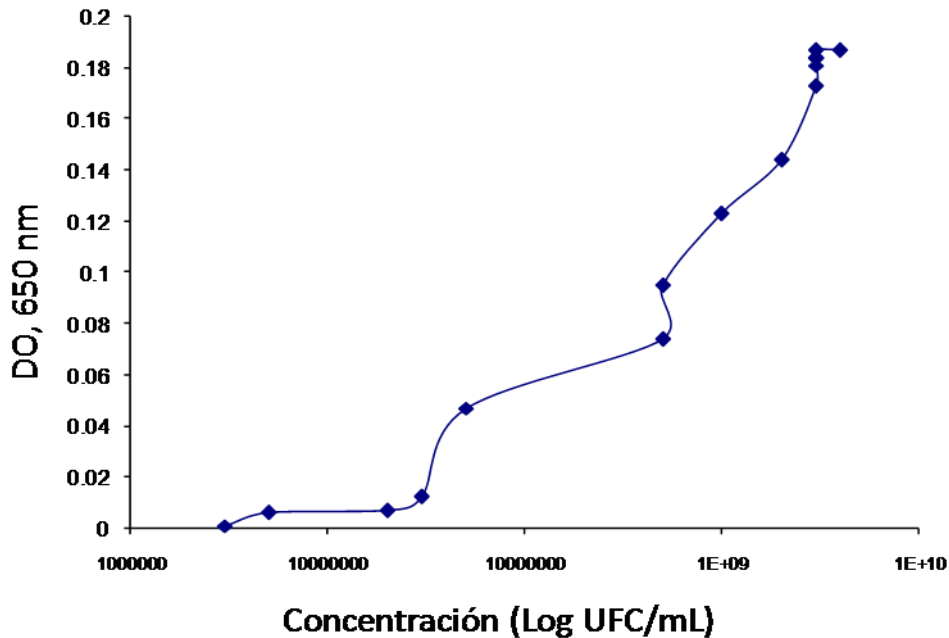
**Tabla 11.** Valores de DO y UFC/mL para la curva de calibración de *S. aureus*, en Pool de Suero Humano con ajuste del inóculo

TIEMPO (Horas)	UFC/mL	LOG10 UFC/mL	DO
0	3x10 <sup>6</sup>	6,5	0,001
2	5x10 <sup>6</sup>	6,7	-0,006
4	2x10 <sup>7</sup>	7,2	0,007
6	3x10 <sup>7</sup>	7,5	0,012
8	5x10 <sup>7</sup>	7,7	0,047
10	5x10 <sup>8</sup>	8,7	0,074
12	5x10 <sup>8</sup>	8,7	0,095
14	1x10 <sup>9</sup>	9,2	0,123
16	2x10 <sup>9</sup>	9,2	0,144
18	3x10 <sup>9</sup>	9,5	0,173
20	3x10 <sup>9</sup>	9,4	0,181
22	3x10 <sup>9</sup>	9,4	0,184
24	3x10 <sup>9</sup>	9,5	0,184
26	3x10 <sup>9</sup>	9,4	0,184
28	3x10 <sup>9</sup>	9,5	0,187
30	4x10 <sup>9</sup>	9,6	0,187
48	5x10 <sup>9</sup>	9,7	0,417
54	3x10 <sup>9</sup>	9,4	0,311
58	2x10 <sup>9</sup>	9,4	0,301



**Figura 29.** Curvas de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en pool de suero humano con ajuste de inóculo, enfrentando la Absorbancia vs tiempo(A), y Concentración vs tiempo (B).

La figura 30 muestra la curva de calibración obtenida al graficar los valores de densidad óptica y los recuentos bacterianos. Se puede apreciar que a partir de las 30 horas, los últimos recuentos son prácticamente iguales, por lo que el incremento en los valores de absorbancia corresponde a los metabolitos secundarios.



**Figura 30.** Curva de calibración de *S. aureus* en suero humano con ajuste del inóculo.

De este modo fue posible determinar la concentración del inóculo bacteriano en una suspensión de suero humano, el cual al presentar una densidad óptica de 0.001 le corresponde una concentración del orden de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la variabilidad de lecturas de DO menores a 0.01 (**Capítulo 3, punto V**), se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Diluciones realizadas a partir de una suspensión bacteriana ajustada a una DO de 0,17 ( $10^9$  UFC/mL) para la lectura de DO por triplicado.

UFC/ mL	Mx	Espectrofotómetro Espetronic 20D			Espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 25		
		Lectura DO			Lectura DO		
		1	2	3	1	2	3
$10^9$	1	0.171	0.169	0.168	0.144	0.144	0.144
	2	0.173	0.174	0.173	0.153	0.153	0.153
$10^7$	1	0.002	-0.006	0.001	0.002	0.002	0.002
	2	0.012	0.010	-0.002	0.002	0.002	0.002
$10^5$	1	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001
	2	-0.002	-0.001	-0.001	0.001	0.001	0.001
$10^3$	1	0.001	0.000	-0.001	0.001	0.002	0.002
	2	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001

**DIn:** Dilución **Mx:** Muestra **DO:** Densidad óptica

Como puede observarse en las concentraciones esperadas de  $10^7$ ,  $10^5$  y  $10^3$ , los valores de DO obtenidos, comienzan a ser muy similares y a presentar cierta variabilidad al utilizar el espectrofotómetro Espectronic 20D. Las lecturas realizadas en el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Lambda 25, no presentaron variabilidad significativa, debido a que este es un equipo con rangos de sensibilidad mayores, sin embargo puede igualmente observarse que en las mismas concentraciones, los valores son muy similares, lo que indica que el recuento de UFC/mL esperado a una DO cercana a cero, puede tener una alta variación.

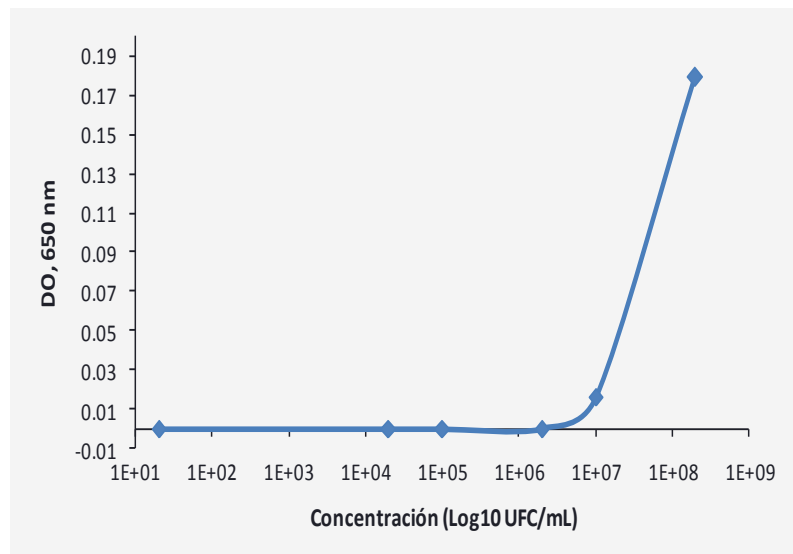
El conteo de UFC/mL obtenido para las suspensiones bacterianas correspondientes a las concentraciones de  $10^9$  y  $10^3$  UFC/mL, fue inferior a lo esperado, presentando valores de  $1 \times 10^8$  y 0 UFC/mL, respectivamente. De acuerdo con lo anterior, se estableció que a una DO de  $0.170(\pm 2)$ , se obtendría un conteo en la escala de magnitud de  $10^8$  UFC/mL. Sin embargo, no se realizó la prueba del inóculo a las suspensiones bacterianas correspondientes a las concentraciones de  $10^5$  y  $10^7$  UFC/mL, por lo que no fue posible verificar dichos

recuentos. Teniendo en cuenta que los inóculos deseados para las futuras pruebas, debían encontrarse en la escala de magnitud de  $10^6$  a  $10^3$ , se propuso llevar a cabo, una nueva de curva de calibración, en la que se determinara para cada suspensión bacteriana, tanto los valores de DO como el conteo de UFC/mL.

La nueva curva de calibración realizada en solución de Hartman, se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el **punto VI** del capítulo 3, y los valores de UFC/mL esperados y UFC/mL obtenidos, como los valores de DO, se presentan en la tabla 13. La curva de calibración presentada en la figura 31, se realizó enfrentando los valores de DO con el conteo de UFC/mL correspondiente (valor equivalente a la concentración).

**Tabla 13.** Resultados obtenidos para la curva de calibración en solución de Hartman.

Dilución	UFC/mL esperadas	DO	UFC/mL obtenidas
$10^0$	$10^8$	0.179	$2 \times 10^8$
$10^{-1}$	$10^7$	0.016	$1 \times 10^7$
$10^{-2}$	$10^6$	0.000	$2 \times 10^6$
$10^{-3}$	$10^5$	0.000	$1 \times 10^5$
$10^{-4}$	$10^4$	0.000	$2 \times 10^4$
$10^{-5}$	$10^3$	0.000	$2 \times 10^3$



**Figura 31.** Curva de calibración en solución de Hartman, enfrentando la DO con el conteo de UFC/mL.

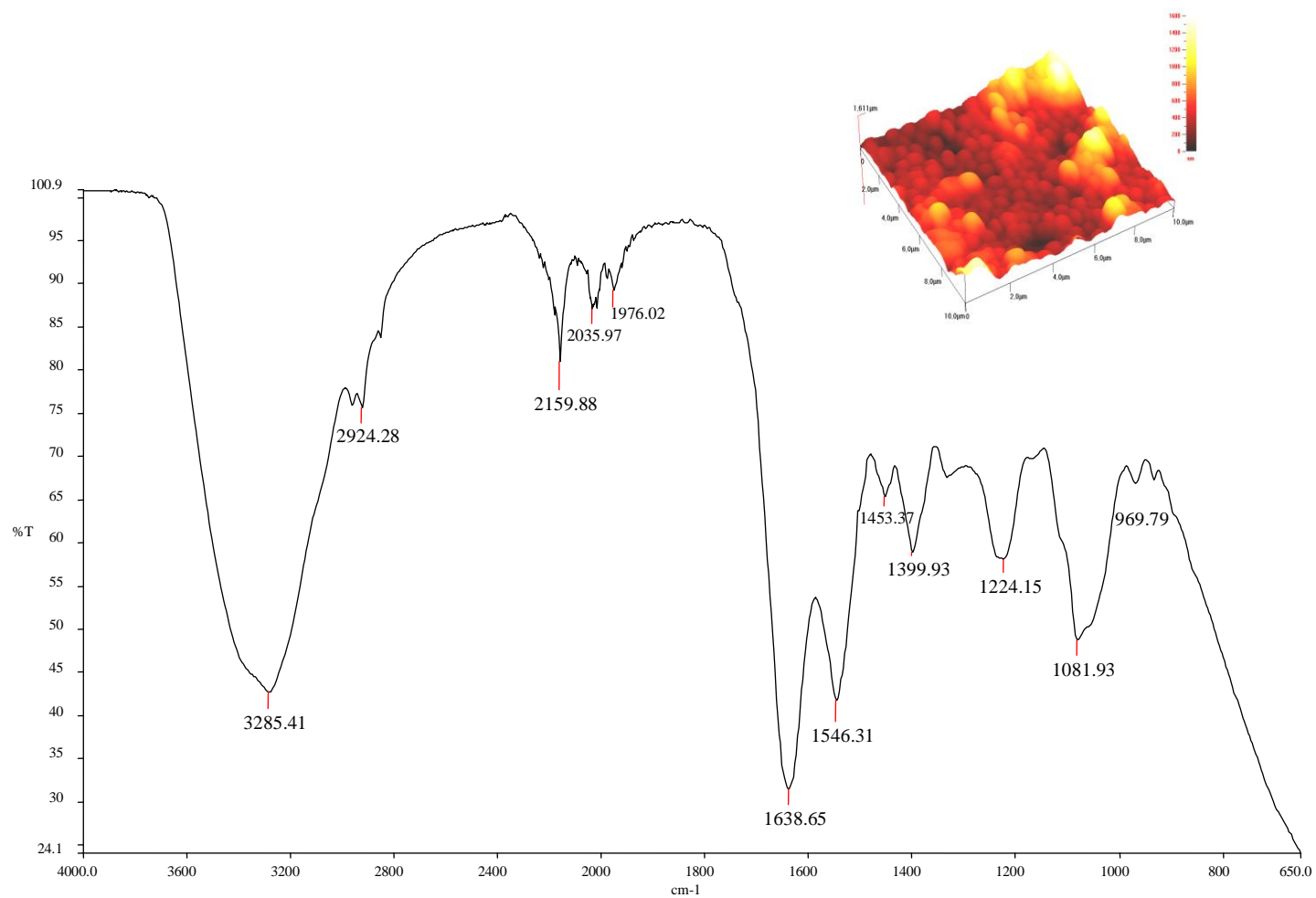
Los resultados de UFC/mL obtenidos coincidieron con los valores UFC/mL esperados, lo que permitió validar esta prueba y establecer para los siguientes ensayos, que realizando las diluciones aquí descritas, se obtiene el conteo de UFC/mL reportado en la tabla 13.

#### 4.1.3 Caracterización por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR) y observación microscopía de fuerza atómica (AFM), de *Staphylococcus aureus*

El espectro IR obtenido para la bacteria *S. aureus* se presenta a continuación en la figura 32. Las bandas obtenidas en escala de transmitancia, indican grupos funcionales de macromoléculas orgánicas y componentes de la pared celular del microorganismo. El pico en  $3285\text{ cm}^{-1}$  puede ser considerado como estiramiento N-H, proveniente del extremo N-terminal de aminoácidos y/o enlace cruzado de

pentaglicina  $\left( \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{H} \end{array} \right)$  de la pared celular. Los picos en  $1638$  y  $1546\text{ cm}^{-1}$  son compatibles con amida primaria y secundaria respectivamente; asimismo, el pico fuerte en  $1638\text{ cm}^{-1}$  en conjunto con uno medio a  $1453\text{ cm}^{-1}$  indica la presencia del ion carboxilato  $\text{COO}^-$  proveniente del extremo C-terminal de proteínas; El pico en  $1081\text{ cm}^{-1}$  es compatible con el estiramiento asimétrico P=O de enlaces fosfodiesteres de peptidoglicano.

La imagen de AFM, muestra la morfología de superficie de un frotis de *S. aureus* sobre una lámina portaobjetos. Esta imagen fue obtenida con el fin de caracterizar la morfología del *S. aureus* cuando se encuentra sétil. El tamaño promedio de las células observadas, es de aproximadamente  $1.0\text{ }\mu\text{m}$ .



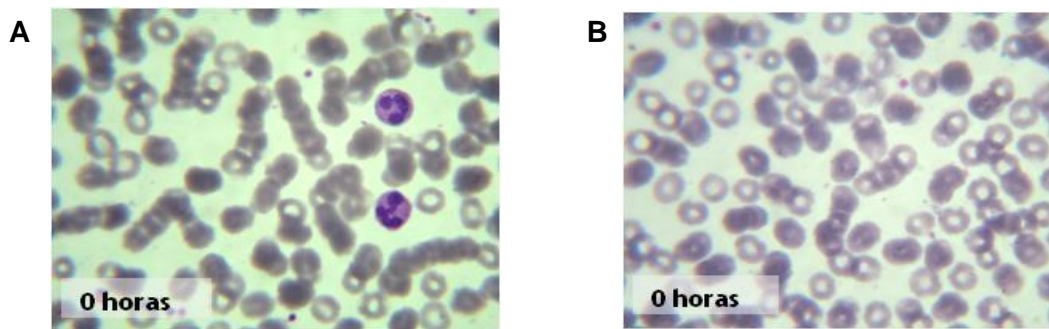
**Figura 32.** Espectro ATR-FTIR e imagen por AFM de *S. aureus* ATCC 29213

## 4.2 DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

### 4.2.1 Generación de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* utilizando un sistema estático

A continuación se describen los cambios macroscópicos observados durante el proceso de generación de la biopelícula en condiciones estáticas. Los cambios microscópicos se presentan en las figuras 33 a 40, comparando el blanco (A) con la sangre inoculada (B).

0 horas: Esta muestra fué tomada al inicio de la prueba, por lo que no se observa ningún cambio en la morfología de las células sanguíneas, como tampoco se observa presencia de células bacterianas. De acuerdo con lo anterior, las imágenes presentadas en la figura 33, fueron consideradas como patrón, para la comparación con las muestras obtenidas posteriormente.

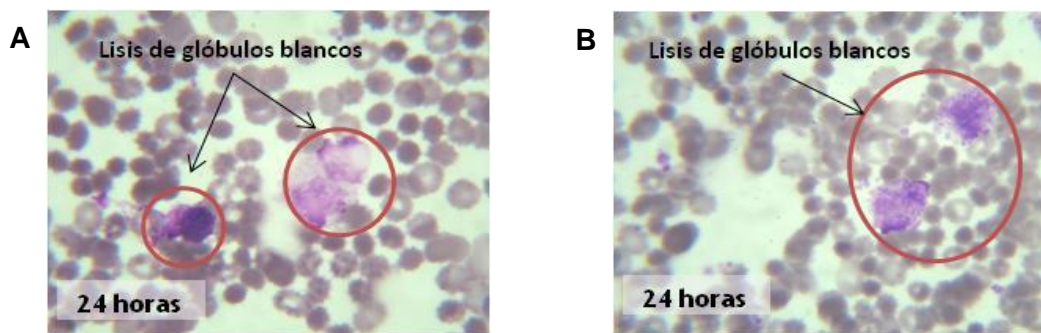


**Figura 33.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo al inicio del experimento ( $t=0$ ) del blanco (A) y sangre inoculada con *S. aureus* (B).

24 horas: No se observó hemólisis ni en la muestra blanco como en la inoculada. Tampoco se observó la presencia de coagulo en la muestra inoculada.

La microscopía óptica (Figura 34) muestra que a partir de las 24 horas, los eritrocitos comienzan a presentar espículas, lo que es conocido como acantocitosis. Esto es debido a que durante el tiempo en que la sangre permanece ex-vivo, los fosfolípidos de la membrana eritrocitaria se alteran y especialmente la fosfatidilserina, en su mayoría situada en la capa interna, es translocada hacia la parte externa. Normalmente la fosfatidilserina funciona como procoagulante y hace trombogénica la pared de los glóbulos rojos. La

exposición de la fosfatidilserina es también una señal para la remoción de los glóbulos rojos de la circulación. Posterior a la formación de acantocitos, algunas de las espículas son removidas como microvesículas, haciendo que los glóbulos rojos pierdan parte de su membrana y a la vez hemoglobina, por lo que la mayor parte de la pérdida de hemoglobina del eritrocito durante la incubación, se da de esta manera. Con relación a los glóbulos blancos, estos tienen el efecto de incrementar la hemólisis de los glóbulos rojos al igual que contribuir a la heterogeneidad en su morfología, la microvesiculación y pérdida intracelular de potasio ( $K^+$ ). Lo anterior es atribuido a la presencia de especies tóxicas de oxígeno y enzimas leucocíticas, incluyendo la elastasa, colagenasa y catepsina G. Por otro lado la apoptosis de los leucocitos, se debe a la liberación del ligando Fas (Fas-L), el cual se encuentra normalmente almacenado en grandes cantidades en dichas células y debido a la ausencia de fagocitos viables en la sangre ex-vivo, la apoptosis progresa a lisis rápidamente<sup>[77]</sup>.



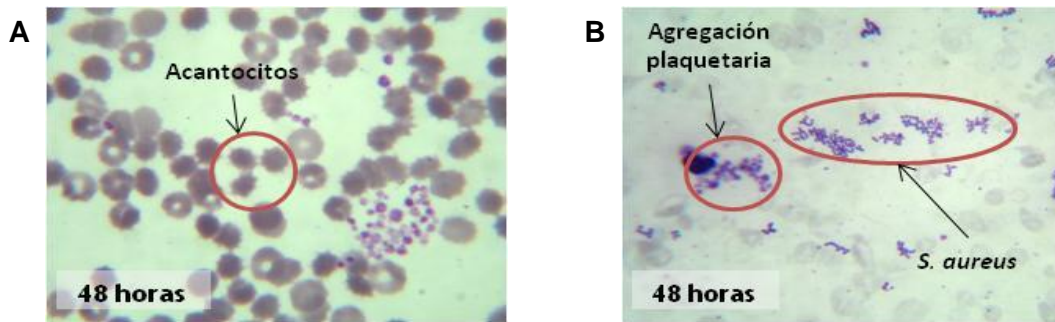
**Figura 34.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 24 horas. (A) blanco (A); (B) sangre inoculada con *S. aureus*.

48 horas: La muestra blanco se observó color rojo intenso, con presencia de hemólisis. La muestra inoculada se observó de color rojo oscuro con alta hemólisis y presencia de coagulo.

De las 48 a las 120 horas (Figuras 35 a 38), en la muestra blanco, se observa la presencia de esferocitos, los cuales se generan cuando el eritrocito pierde parte de su membrana en forma de microvesículas.

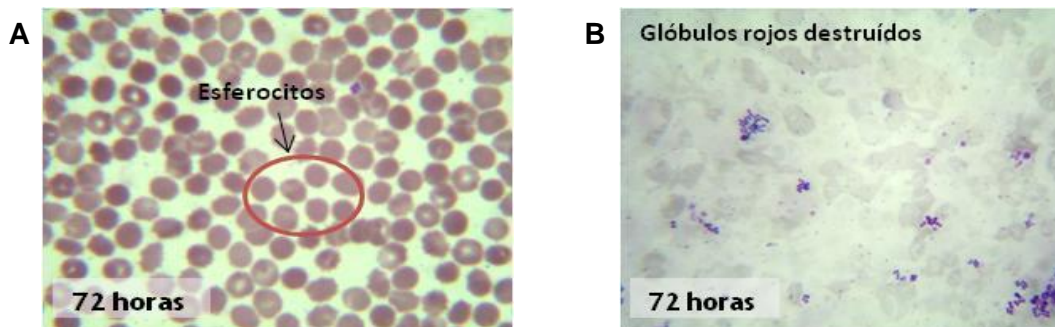
En cuanto a las muestras inoculadas con *S. aureus*, se observa la misma degeneración de las células sanguíneas, con la diferencia de que el proceso se

presenta de forma acelerada, debido a la presencia de las células bacterianas, las cuales comienzan a observarse en mayor cantidad, a partir de las 48 horas. Las imágenes de las 48 y 72 horas (Figuras 35 y 36), muestran glóbulos rojos destruidos, los cuales presentan una coloración bastante tenue debido a la pérdida de hemoglobina.



**Figura 35.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 48 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*.

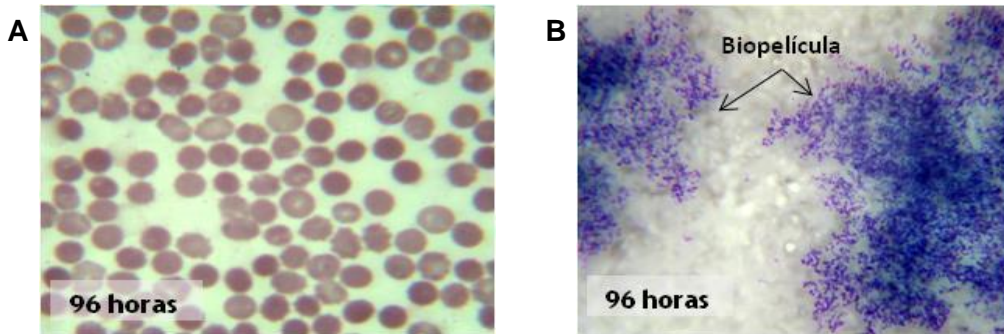
72 horas: La muestra blanco se observó color rojo muy oscuro y altamente hemolizada. La muestra inoculada igualmente se observó de color rojo muy oscuro, con alta hemolisis y presencia de coagulo, el cual se observó un poco más pequeño, probablemente a causa del proceso de fibrinólisis que es iniciado por enzimas generadas por el microorganismo.



**Figura 36.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 72 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*.

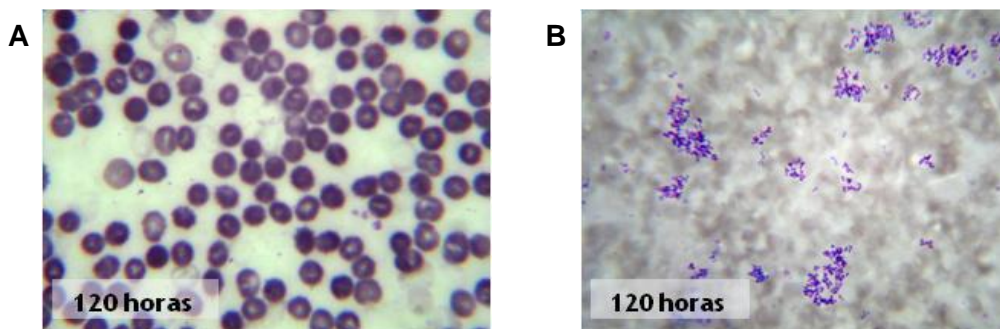
96 horas: Tanto la muestra blanco como la inoculada, continuaron observándose de color rojo muy oscuro y con mayor presencia de hemolisis, prácticamente el plasma se observaba del mismo color del concentrado globular. El coagulo presente en la muestra inoculada continuaba haciéndose más pequeño.

Las imágenes correspondientes a la etapa final de las 96 a las 168 horas (Figuras 37 a 40), además de mostrar un alto número de células bacterianas, y daño celular de eritrocitos y leucocitos, también muestran un alto contenido de residuos. Asimismo, se observa que los microorganismos se encuentran aglutinados dentro de una matriz gelatinosa, corroborándose de esta manera la formación de la biopelícula en sangre total.



**Figura 37.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 96 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*

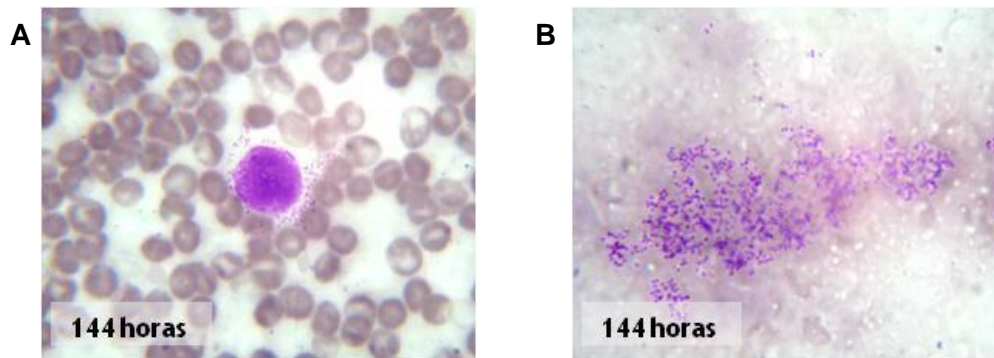
120 horas: En este tiempo ya no se observaron nuevos cambios significativos que pudieran observarse macroscópicamente. El color de la muestra, la intensidad de la hemólisis y el coágulo, se observaron igual que a las 96 horas.



**Figura 38.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 120 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*.

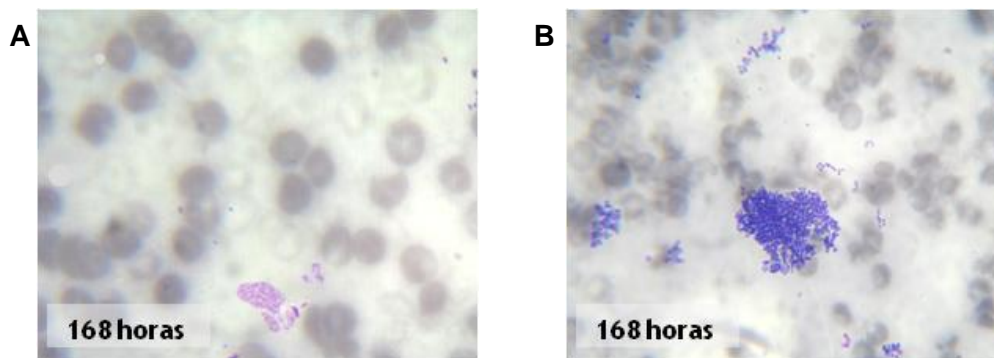
144 horas: El color de la muestra, la intensidad de la hemólisis y el coágulo, se observaron igual que a las 120 horas. El único cambio significativo observado fue el aumento de viscosidad en la muestra inoculada, el cual fue atribuido a la

desintegración gradual del coagulo, por el proceso de fibrinólisis mencionado anteriormente.



**Figura 39.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 144 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*

168 horas: Se continuó observando un color rojo muy oscuro, y alta hemólisis, tanto en la muestra blanco como en la inoculada. El coagulo presente en la muestra inoculada se continuó observando cada vez más reducido.



**Figura 40.** Tinción de Wright de frotis sanguíneo a las 168 horas. (A) blanco; (B) sangre inoculada con *S. aureus*

Las alteraciones físicas que sufre la sangre cuando esta fuera del organismo, es un proceso normal, debido a que dependiendo del hematocrito de la sangre empleada, el volumen de líquido disponible para diluir y neutralizar el ácido láctico generado durante el proceso de glicólisis, es limitado. Dependiendo de la velocidad metabólica, la cual a su vez depende de la temperatura, la composición de la solución anticoagulante y el estado de los eritrocitos, ocurrirá el rápido aumento en la concentración de lactato y dióxido de carbono ( $pCO_2$ )

ocasionando el aumento del pH<sup>[77]</sup>. De igual forma durante la actividad metabólica se generan especies tóxicas de oxígeno, que no pueden ser neutralizadas *in-vitro*, y por ende van a contribuir al daño de la membrana celular del eritrocito.

Por otro lado, las muestras que fueron inoculadas con *S. aureus*, aunque presentan el mismo proceso descrito anteriormente, este es acelerado por el efecto de enzimas estafilocócicas como las hemolisinas, las cuales atacan la membrana celular de los eritrocitos, provocando la lisis celular y consiguiente liberación de hemoglobina.

La formación de coagulo, es debida a la acción de la enzima coagulasa, presente en el *S. aureus*, la cual hace las veces de la trombina presente en la cascada de la coagulación, convirtiendo el fibrinógeno en fibrina. Este proceso es reversible, por la acción de enzimas fibrinolíticas, también presentes en el *S. aureus*, las cuales utiliza para degradar el coagulo de fibrina. Es por esta razón que con el pasar de los días, el coagulo se fue reduciendo gradualmente.

### **Conteo de UFC/mL durante el proceso de desarrollo de la biopelícula**

El desarrollo y viabilidad del microorganismo, se realizó por medio del conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), obteniendo los resultados expuestos en la tabla 13:

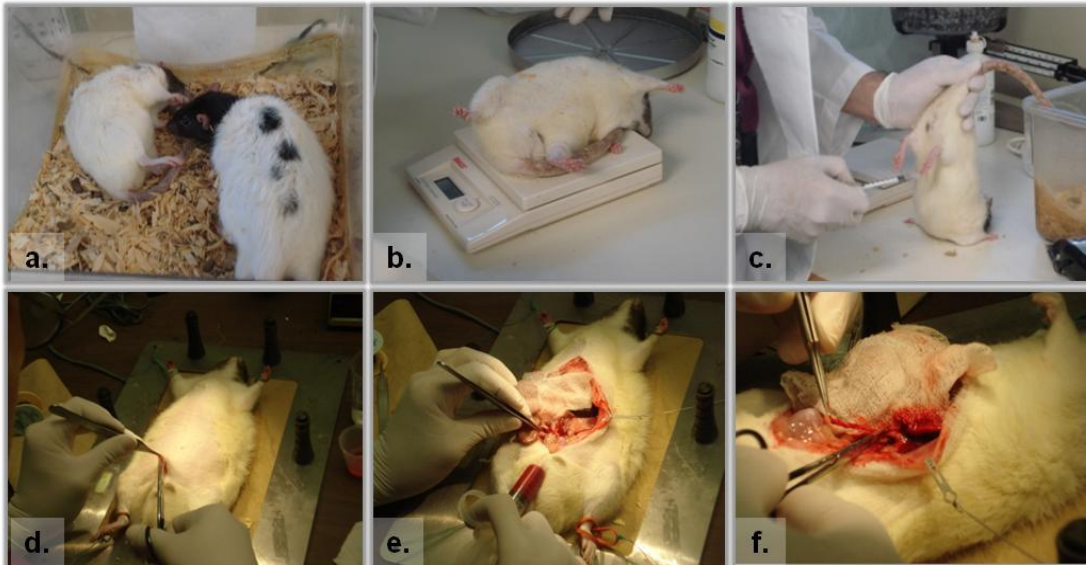
**Tabla 14.** Conteo de UFC/mL en muestras de sangre total inoculadas con *S. aureus*, en diferentes periodos de tiempo.

Hora	UFC/mL	Hora	UFC/mL
0	$2 \times 10^3$	96	$4 \times 10^5$
24	$1 \times 10^4$	120	$3 \times 10^8$
48	$1 \times 10^8$	144	$1 \times 10^8$
72	$4 \times 10^7$	168	$1 \times 10^8$

El conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en conjunto con las observaciones obtenidas por microscopía óptica, permitieron comprobar el crecimiento de la bacteria, aún después de la formación del coagulo, el cual tiene lugar gracias al efecto de la enzima coagulasa del *S. aureus*, que actúa como la trombina, convirtiendo el fibrinógeno en fibrina, y es utilizada por el mismo, como mecanismo de defensa en el proceso de colonización de los tejidos, para protegerse de la acción de los macrófagos del sistema inmunológico. Los resultados confirmaron la viabilidad y replicación de la bacteria en cada muestreo, comenzando a las cero horas con un conteo de  $2 \times 10^3$  UFC/mL, y finalizando con un conteo de  $1 \times 10^8$  UFC/mL a las 168 horas. El conteo máximo fue observado a las 120 horas con un valor de  $3 \times 10^8$  UFC/mL. También se observó cierta variación en el crecimiento posterior a las 48 horas, observándose recuentos menores a las 72 y 96 horas, lo que aparentemente indicaba el inicio de la muerte del microorganismo, debido a las condiciones poco favorables del medio, es decir el agotamiento de nutrientes, la acidificación del medio, la falta de oxígeno y la generación de metabolitos secundarios que pueden ser tóxicos para la bacteria. Sin embargo el conteo mostró la reanudación del crecimiento a las 120 horas, y se mantuvo estable en las siguientes determinaciones a las 144 y 168 horas. El comportamiento anteriormente descrito, se atribuye al acondicionamiento que sufren los microorganismos cuando se encuentran bajo condiciones de stress. Por otro lado, esto también puede ser un indicativo de la etapa de maduración en el que se encuentre la biopelícula, ya que al presentarse el deterioro de su matriz extracelular (glicocálix), se liberan microorganismos de su interior, favoreciendo el reinicio del crecimiento bacteriano.

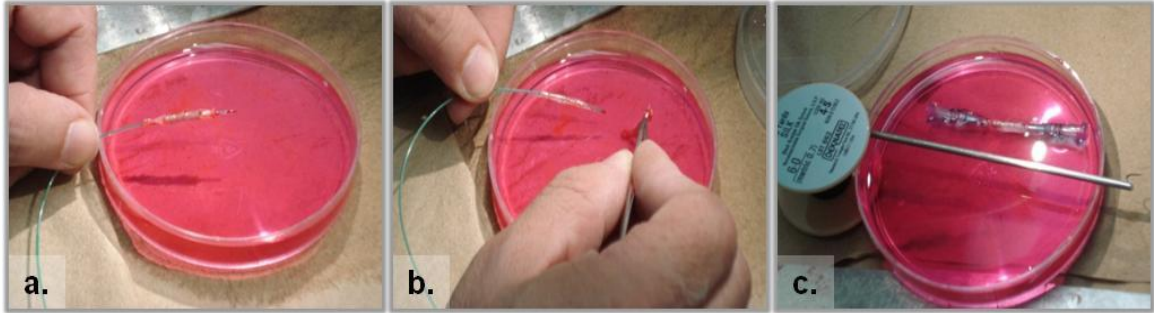
#### 4.2.2 Generación de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* utilizando un sistema de flujo

El procedimiento quirúrgico realizado para la extracción de sangre y la obtención del fragmento de arteria adaptada al sistema de flujo, se presenta a continuación en la figura 41:



**Figura 41.** Procedimiento quirúrgico de roedores. **a)** Selección de roedores entre los 300 y 600 g. **b)** Pesaje de cada animal. **c)** Inyección de la solución anestésica. **d)** Diseción del animal. **e)** Extracción de sangre. **f)** Extracción de un fragmento de arteria aorta abdominal.

Posterior al procedimiento quirúrgico, se llevó a cabo la preparación de la arteria para adaptarla al sistema de flujo. Los pasos llevados a cabo durante dicho proceso, se presentan a continuación en la figura 42:



**Figura 42.** Preparación de la arteria para su adaptación al sistema de flujo. **a)** Preparación del stent. **b)** Colocación del stent dentro de la arteria. **c)** Adaptación de la arteria a dos punzocats e inmovilización de la misma, fijando la preparación a una barra metálica.

Una vez ensamblado el sistema de flujo, se encendió la bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 50mL/min durante 12 horas, con el fin de evaluar su funcionamiento y permitir el acondicionamiento de la arteria y la superficie del stent. Durante la evaluación del funcionamiento se monitorearon los siguientes aspectos:

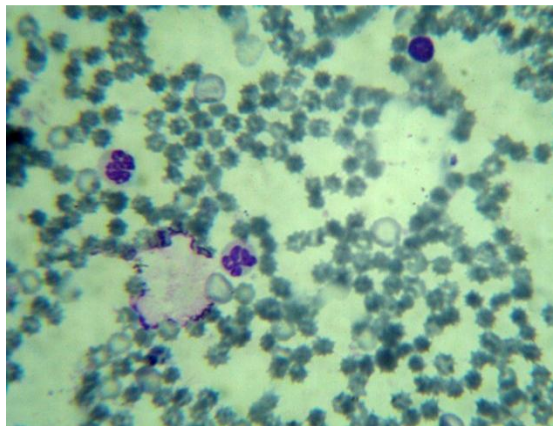
- **Circulación continua:** Para este fin debía se garantizó la ausencia de coágulos en la sangre y la correcta colocación de la arteria, de tal manera que permitiera el paso continuo de la sangre
- **Ajuste de la temperatura:** La temperatura del baño de agua fué ajustada para mantener una temperatura constante de 37°C, de tal forma que la cámara externa del baño de tejidos se mantuviera atemperada.
- **Fugas a través de la arteria:** Durante el tiempo de monitoreo se acomodó la arteria de tal forma que no ocurrieran fugas de sangre durante el tiempo de corrida.
- **Muestras de sangre:** Fueron realizados con el fin de observar las características de las células sanguíneas y la ausencia de agentes contaminantes, al inicio de la corrida.

A continuación en la figura 43, se presenta el sistema de flujo ya ensamblado y puesto en funcionamiento.



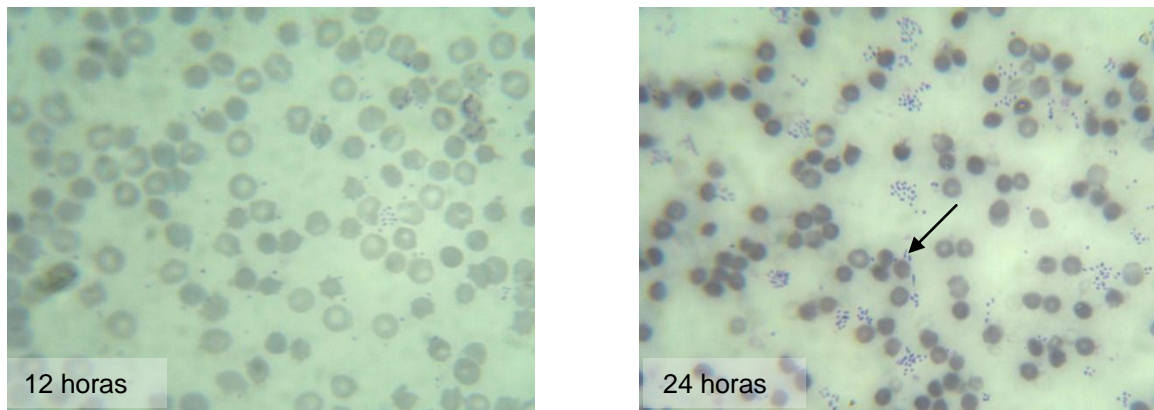
**Figura 43.** Sistema de flujo puesto en funcionamiento.

Una vez garantizado el correcto funcionamiento del sistema de flujo, se adicionó el inóculo bacteriano, que dió como resultado en la prueba confirmatoria,  $8 \times 10^2$  UFC/mL. Este se dejó circular por el sistema durante una hora, posteriormente se tomó una muestra de sangre, a partir de la cual se realizó coloración de Wright para la observación por microscopía óptica (figura 44) y la determinación conteo de UFC/mL que en ese momento se encontraba en circulación, obteniéndose como resultado un valor de  $9 \times 10^8$  UFC/mL.



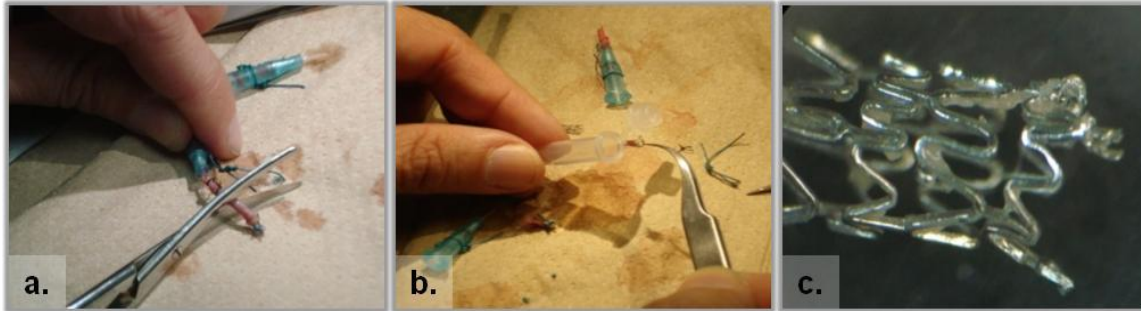
**Figura 44.** Coloración de Wright de la muestra tomada a la hora 1 en el sistema de flujo.

El sistema continuó siendo monitoreado por 12 horas más (tiempo total: 25 horas), tiempo durante el cual la arteria se bloqueó en dos ocasiones; sin embargo la arteria fue desbloqueada y el sistema se mantuvo en funcionamiento por 12 horas más, hasta que se cumplieran las 37 horas, tiempo para el cual la arteria colapsó y el sistema tuvo que ser desmontado. Como se muestra en la figura 40, el stent fue retirado del sistema y procesado para sus respectivos análisis. Durante el tiempo en el que sistema de flujo estuvo en funcionamiento, también se tomaron muestras de sangre para monitorear el cambio de las células sanguíneas y el aumento de células bacterianas. Las imágenes captadas, se presentan en la figura 45.



**Figura 45.** Observación por microscopía óptica durante el monitoreo del sistema de flujo a las 12 horas y 24 horas. La flecha en las 24 horas, indica la distribución del microorganismo dentro de la biopelícula.

Como se muestra en la figura 46, el stent fue retirado del sistema y procesado para sus respectivos análisis.



**Figura 46.** Proceso para el retiro del stent. **a)** Separación de los punzocats de la arteria. **b)** Extracción del stent de la arteria e inmersión del mismo en solución salina. **c)** Observación de los compones adheridos al stent y fragmentación del mismo para los análisis respectivos.

En la figura 46-c, se puede observar durante el tiempo en el que el stent se mantuvo en el sistema de flujo, diferentes componentes, provenientes de la sangre, así como células bacterianas y metabolitos generados por las mismas, se adhirieron a la malla que compone el stent, lo demuestra el proceso de acondicionamiento que sufre la superficie del material. Para determinar y cuantificar dichos componentes, se realizó el cultivo del stent, al igual que fragmentos del mismo, fueron procesados para la cuantificación de azúcares y proteínas, así como para su observación y análisis por SEM/EDX y espectroscopía infrarrojo.

#### **4.2.3 Cuantificación de azúcares y proteínas durante el desarrollo de biopelículas**

##### **Sistema estático**

Los resultados obtenidos en las determinaciones colorimétricas de azúcares y proteínas, al inicio y al final del periodo de incubación de las muestras, se presentan a continuación en la tabla 15:

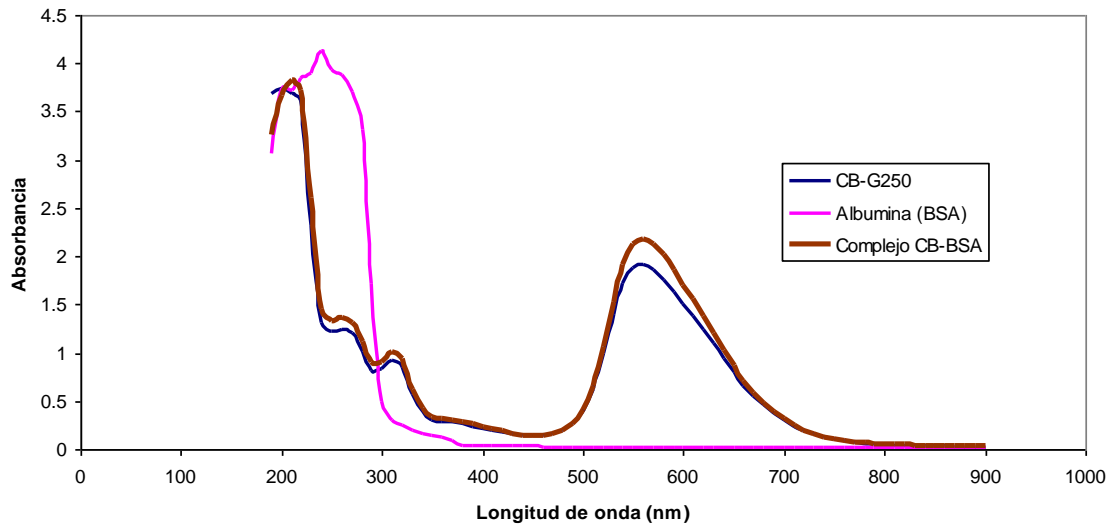
**Tabla 15.** Cuantificación de azúcares y proteínas por métodos colorimétricos, en las muestras analizadas para el sistema estático.

Muestra	Azúcares (mg/mL)	Proteínas (mg/mL)
Sangre total 0 horas	3.54	>20.0
ST. Blanco 168 horas	1.54	27.40
ST. Muestra 168 horas	1.68	43.72
Biopelícula 168 horas	0.40	<0.01

Los resultados obtenidos muestran el alto contenido de azúcares y proteínas que había en el plasma antes de inocular la sangre total con *S. aureus* (hora 0). Al final del proceso de incubación a las 168 horas, tanto en la muestra blanco como en la muestra inoculada, se observó disminución en el contenido de azúcares y proteínas comparado con el plasma, debido al consumo especialmente de glucosa, por parte de las células sanguíneas y células bacterianas; sin embargo comparando el contenido de los mismos entre el blanco y la muestra inoculada, es mayor la cantidad de azúcares y proteínas totales en la muestra inoculada, lo que se atribuye a los exopolisacáridos generados durante el desarrollo de la biopelícula y al crecimiento del microorganismo, respectivamente.

En cuanto a la biopelícula se observa la presencia de azúcares, los cuales indican la generación de exopolisacáridos durante el desarrollo de la misma. Con respecto a las proteínas, el contenido fue menor al límite de sensibilidad de la técnica, por lo que no fue posible cuantificarlas. La utilización de dicha técnica para la cuantificación de proteínas no fue favorable, debido a que no se logró obtener una curva de calibración con una buena correlación, no obstante que se consideraron los diferentes factores que podrían afectarle, tales como la dilución de los estándares, el tratamiento de las muestras, la preparación del reactivo de Bradford, así como el efecto ejercido por cada uno de sus componentes. Para

verificar la formación del complejo colorante-proteína, se realizaron barridos en un rango de longitud de onda de 900-190 nm. Los resultados de estos barridos se muestran en la figura 47.



**Figura 47.** Espectros obtenidos en la región 900-190 nm en donde se muestran los picos máximos de absorción de la proteína BSA 1mg/ml (—), colorante (—) y complejo colorante-proteína (—).

Los espectros obtenidos para el colorante y el complejo colorante-proteína, muestran un pico entre los 500 y 600 nm debido a que el colorante azul de Coomassie G250, tiene una absorbancia máxima de 590 nm y el complejo colorante-proteína presenta su absorbancia máxima a 595 nm, de acuerdo con lo descrito en el método de Bradford<sup>[74]</sup>. Por otro lado la proteína, en este caso la albúmina, presenta su absorbancia máxima a una longitud de onda de 280 nm, lo cual es congruente con el pico observado en la figura 47.

## Sistema de flujo

La cuantificación de azúcares y proteínas de la biopelícula formada en el sistema de flujo, se muestra a continuación en la tabla 16:

**Tabla 16.** Cuantificación de azúcares y proteínas por métodos colorimétricos en las muestras analizadas para el sistema de flujo.

Muestra	Azúcares (ug/mL)	Proteínas (ug/mL)
Biopelícula 37 horas	11.82	2.65

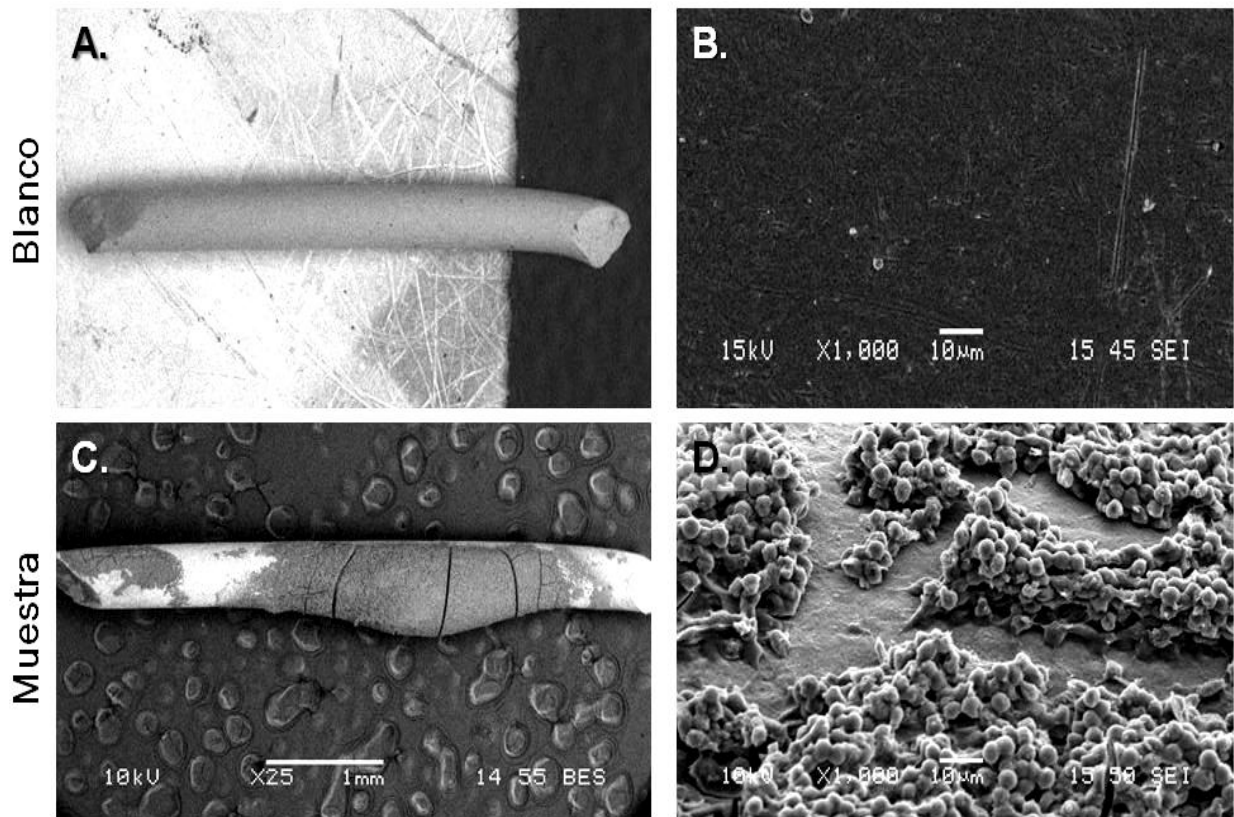
Los resultados obtenidos permitieron confirmar la presencia de exopolisacáridos en la biopelícula formada, los cuales son el principal componente de las mismas y les permite tanto sostener la comunidad microbiana en su interior, como adherirse a la superficie del stent de Nitinol, al igual que propiciar la adherencia y agregación entre células bacterianas. La presencia de proteínas encontrada en esta biopelícula, comparada con el valor obtenido de azúcares, evidencia que aunque existen proteínas en la matriz extracelular (glicocálix), éstas últimas se encuentran en una menor proporción, comparado con los exopolisacáridos, hallazgos que concuerdan con lo reportado en la literatura.

### 4.2.4 Análisis de la biopelícula por microscopía de barrido electrónico (SEM)

#### Sistema estático

Tanto el fragmento de stent sumergido en la sangre sin inocular, como el fragmento sumergido en la sangre inoculada, fueron analizados por SEM. La **figura 41-A**, muestra el fragmento de stent que fue sumergido en la sangre total sin inóculo bacteriano, como se puede observar, no hay ninguna sustancia adherida a la superficie, lo cual se confirmó con un acercamiento a un aumento de 1000x, como se observa en la **figura 41-B**. En cuanto a la muestra inoculada,

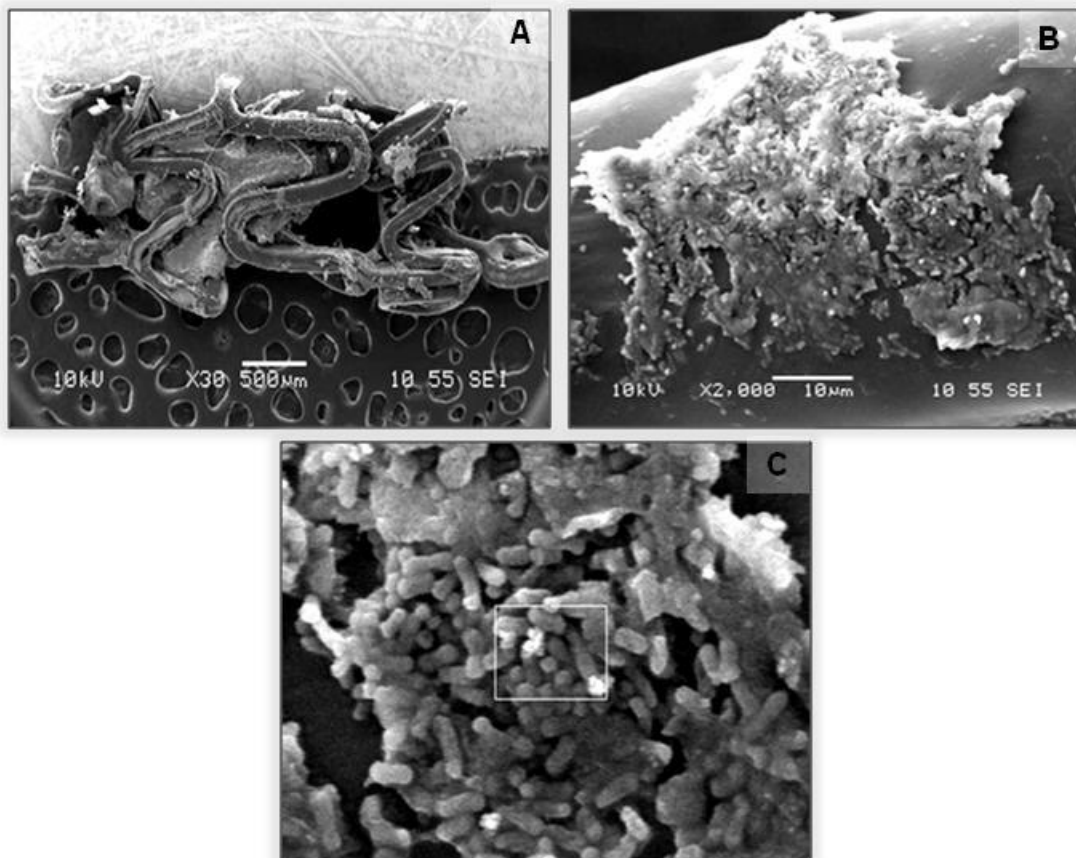
la **figura 41-C**, muestra la formación de un coágulo en la superficie del fragmento de Nitinol, por lo que se obtuvieron imágenes de mayor aumento que permitieran observar el interior del mismo. **La figura 41-D**, a un aumento de 1000x, presenta en el interior del coágulo la biopelícula de *S. aureus*, así como la distribución del mismo en forma de racimos. Es posible apreciar como se encuentran unidas las bacterias entre si por los exopolisacáridos generados, los cuales propician su adhesión. También es posible observar la matriz de exopolisacáridos y la red de fibrina, que recubre la superficie las células bacterianas y la superficie del fragmento de Nitinol. Por tanto, en la etapa inicial de generación de la biopelícula, es de gran importancia la unión de la coagulasa del *S. aureus* al fibrinógeno, además de la generación de exopolisacáridos por parte del microorganismo.



**Figura 48.** Observación por SEM de las muestras obtenidas a partir del sistema estático.

## Sistema de flujo

En la figura 49, se presenta el stent que fue colocado en el sistema de flujo, el cual fue retirado a las 37 horas. Las imágenes muestran la biopelícula formada, la cual se encuentra formada por una comunidad mixta de *Staphylococcus aureus* y un cocobacilo Gram negativo, de acuerdo con las imágenes obtenidas por SEM y las observaciones por microscopía óptica.



**Figura 49.** Observación por SEM del stent colocado en el sistema de flujo.

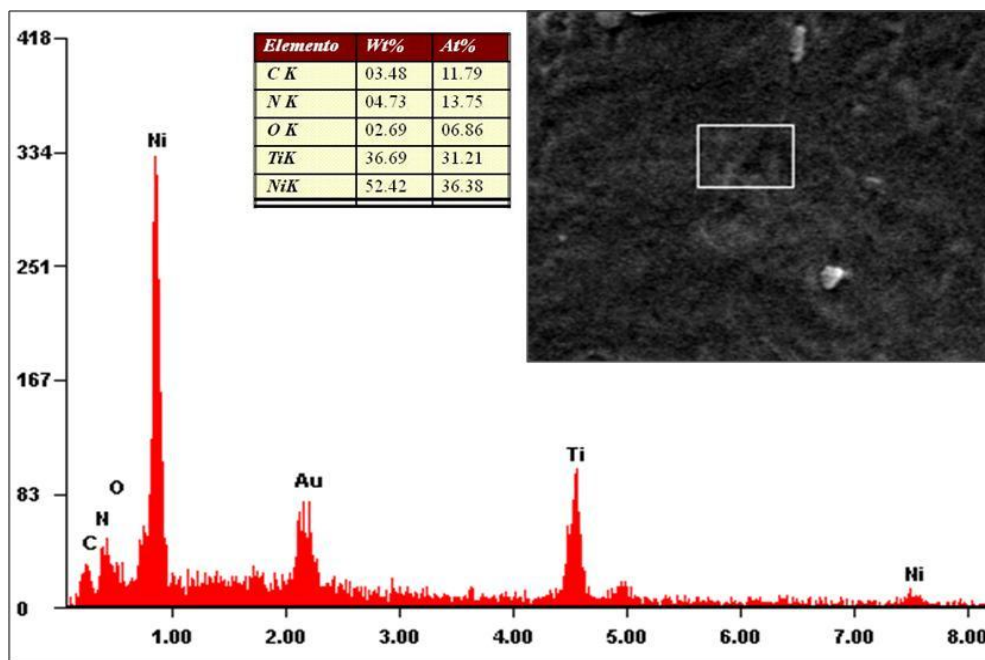
En la figura 49, también se puede observar la capa gelatinosa, conocida como glicocálix, en la cual se encuentran atrapados los microorganismos. Con el sistema de flujo, se confirmó finalmente, que a pesar de incluir la variable del flujo constante, los microorganismos tienen la tendencia a adherirse a las superficies sólidas, a través de las uniones ligando específicas con las proteínas

del plasma y la generación de EPS, que no sólo favorece su adherencia, sino que además los protege de los factores externos que puedan causales algún daño.

#### 4.2.5 Análisis de la biopelícula por rayos de X de electrones dispersados (EDS)

##### Sistema estático

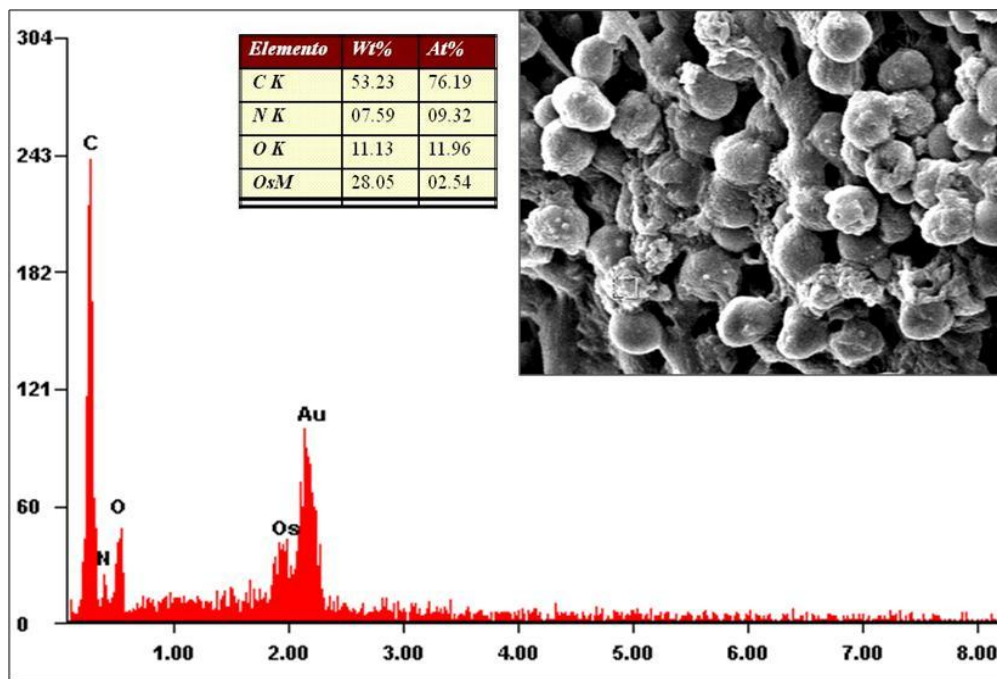
La figura 50, presenta el análisis realizado por EDS al fragmento de Nitinol que fue sumergido en la sangre sin inocular (blanco). Los resultados muestran la presencia de componentes orgánicos, los que se relacionan con la presencia de los elementos carbono (C), nitrógeno (N), y oxígeno (O). También se observa la presencia de Niquel (Ni) y Titanio (Ti), elementos que componen el Nitinol y la presencia de Oro (Au), proveniente del tratamiento que se le realiza a la muestra para facilitar la conductividad de electrones, lo que permite generar la imagen.



**Figura 50.** Análisis por EDS del fragmento de Nitinol sumergido en sangre total sin inocular (blanco).

La presencia de componentes orgánicos, se relaciona con la capa acondicionadora que se forma en la superficie del material, al estar en contacto con las proteínas del plasma. Este es un proceso que ocurre *in-vivo*, donde se genera una capa de pasivación en la superficie del metal, que impide la activación de la cascada de la coagulación y consecuente agregación plaquetaria que provoca la restenosis.

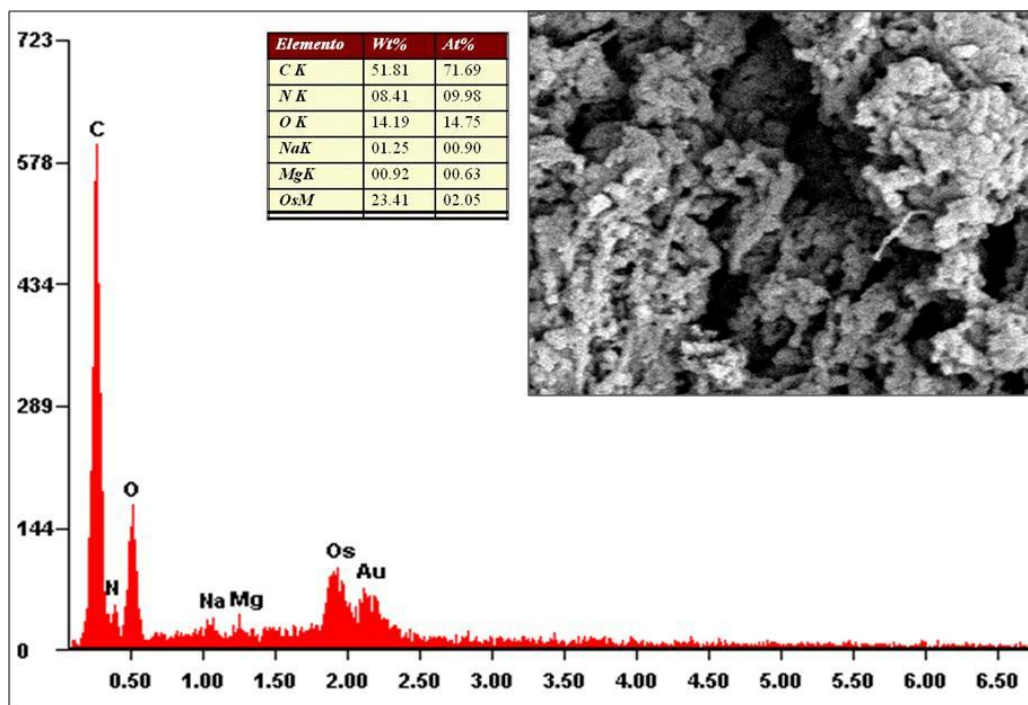
La figura 51, presenta el análisis por EDS, del fragmento de Nitinol que fué sumergido en sangre total inoculada con *S. aureus*. Al cabo de 7 días de incubación, se observó la formación de un coagulo, el cual contenía en su interior, la presencia de una biopelícula formada por *S. aureus*. El análisis por EDS, muestra la presencia de componentes orgánicos, de acuerdo con los picos de los elementos carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O). En comparación con el blanco, el pico correspondiente al carbono es mucho más grande, lo que se atribuye a la presencia no sólo de las proteínas del plasma, sino también de las EPS, generadas por la bacteria.



**Figura 51.** Análisis por EDS del fragmento de Nitinol sumergido en sangre total inoculada con *S. aureus*.

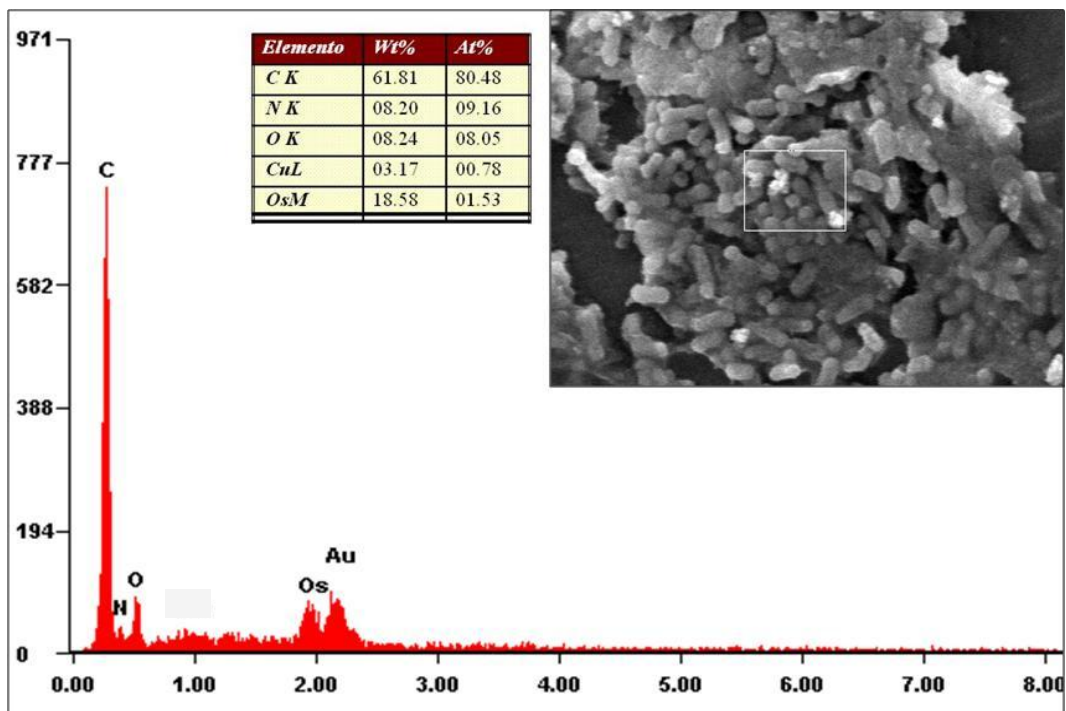
## Sistema de flujo

El stent retirado del sistema de flujo, fue observado y analizado por EDS en 3 acercamientos diferentes. La figura 52, muestra el primer acercamiento del agregado formado en la superficie del stent, el cual evidenció la presencia de picos de carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O), los cuales se relacionan con la presencia de componentes orgánicos, provenientes de las proteínas del plasma y la generación de EPS por parte de los microorganismos. A diferencia de los elementos encontrados en las muestras del sistema estático, en el sistema de flujo se observó también la presencia de sodio y magnesio, los cuales se relacionan con la solución de Ringer lactato (solución de Hartman), en la que se sumergió el fragmento de arteria en el que se encontraba insertado el stent. Los elementos osmio (Os) y oro (Au), provienen de las sustancias utilizadas para el acondicionamiento de las muestras antes de su observación por microscopía de barrido electrónico (SEM).



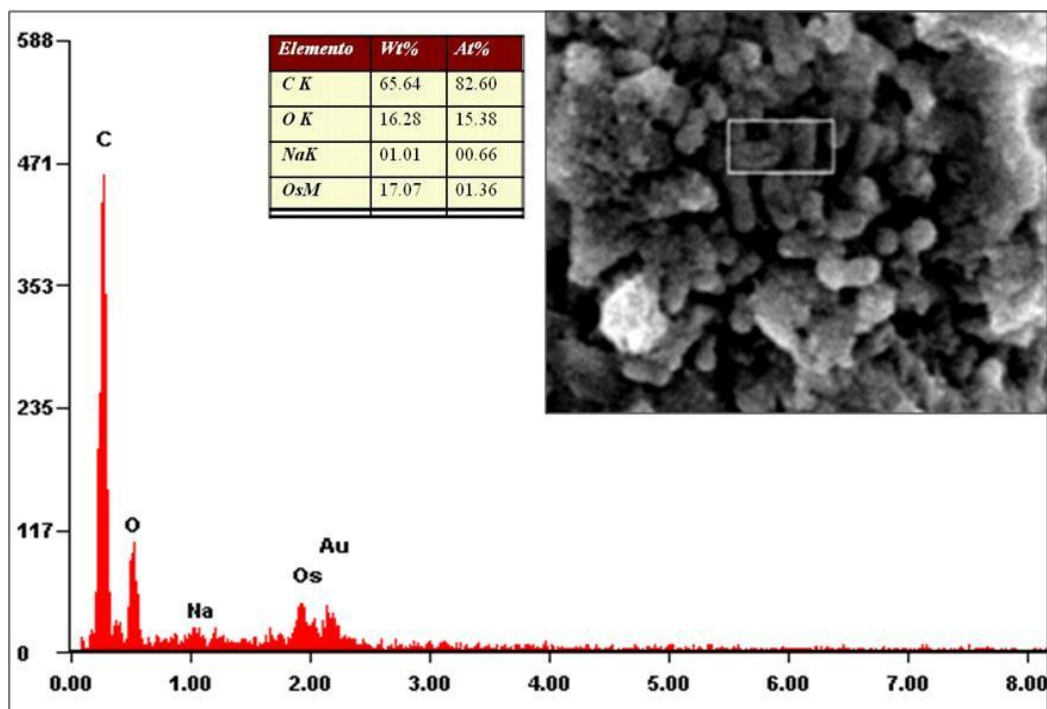
**Figura 52.** Análisis de EDS del agregado formado en la superficie del stent colocado en el sistema de flujo.

La figura 53, muestra el segundo acercamiento realizado, en el que se pueden observar igualmente los picos del carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O), debidos a la presencia de componentes orgánicos provenientes de los exopolisacáridos y proteínas de la biopelícula, al igual que de las proteínas plasmáticas. Aparece también el osmio (Os), que como se mencionó anteriormente, proviene de las sustancias utilizadas en el pre-tratamiento de las muestras antes su observación por SEM.



**Figura 53.** Análisis de EDS de la biopelícula formada en el stent colocado en el sistema de flujo.

En la figura 54, se presenta el tercer acercamiento realizado al agregado formado en la superficie del stent, con el fin observar y analizar con mayor detalle la composición de la biopelícula. Los picos de carbono (C) y oxígeno (O) encontrados, señalan la presencia de compuestos orgánicos, los cuales al igual que en las figuras 52 y 53, se relacionan con la presencia de azúcares y proteínas, provenientes de las proteínas plasmáticas así como de las sustancias exopoliméricas extracelulares (EPS), originadas por los microorganismos para la formación de la biopelícula.



**Figura 54.** Análisis de EDS a un mayor acercamiento, de la biopelícula formada en el stent colocado en el sistema de flujo.

#### 4.2.6 Caracterización de la biopelícula por espectroscopía infrarrojo (ATR-FTIR)

El análisis por espectroscopía infrarrojo permitió detectar las vibraciones de los grupos funcionales presentes en las muestras obtenidas a partir del sistema de flujo, y de esta forma corroborar la presencia de elementos que no fueron detectados por EDS debido que la profundidad del haz de electrones no fue suficiente.

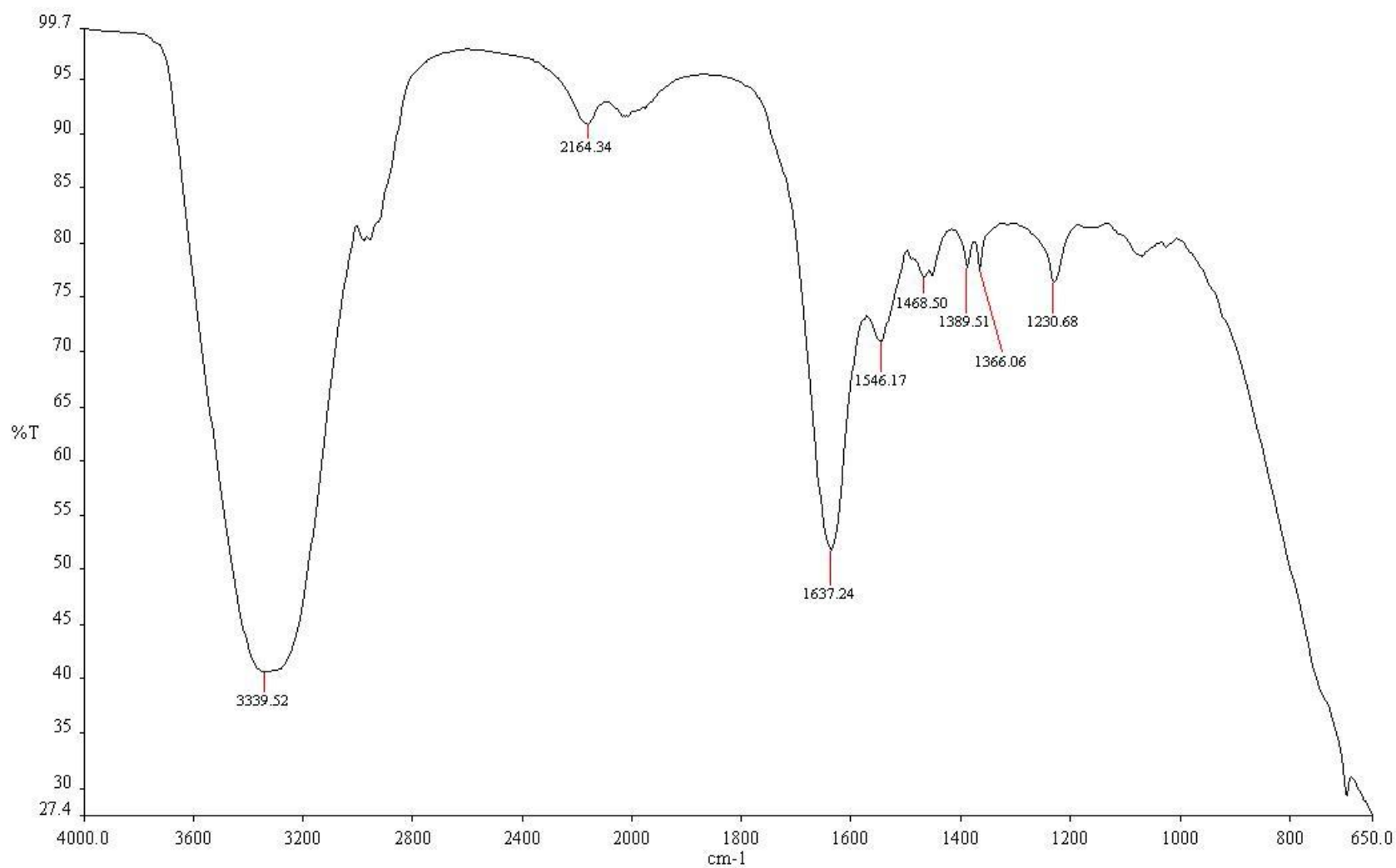
Las figuras 55 y 56, presentan el desarrollo de un pico bien definido en 3339 y 3351  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, lo cual indica la presencia del grupo amida proveniente de la unión del ácido carboxílico con la amina primaria (R-NH-CO-R), unión conocida como enlace peptídico, característica en péptidos y proteínas. Otro pico observado claramente en ambas figuras, es el encontrado en 1637  $\text{cm}^{-1}$ , el cual es compatible con amida primaria. Lo anterior se relaciona

con la presencia de proteínas plasmáticas y las proteínas provenientes de las EPS, que componen en menor proporción la biopelícula bacteriana.

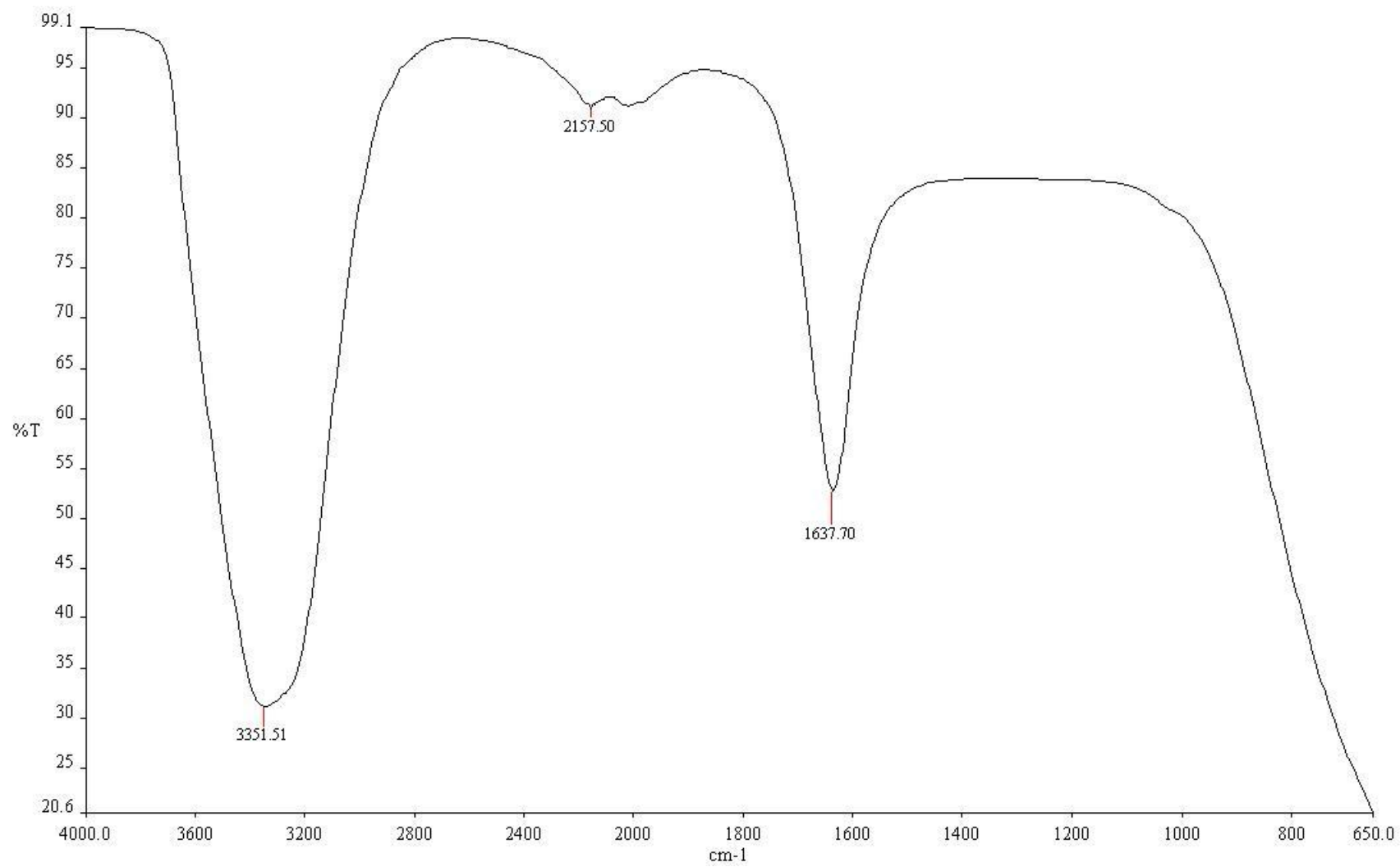
En la figura 55 se observan otros picos más débiles, como los encontrados entre los 1600 y 1400  $\text{cm}^{-1}$  que podrían relacionarse con la de amida secundaria y el ion carboxilato  $\text{COO}^-$  proveniente del extremo C-terminal de proteínas; y los picos encontrados entre los 1400 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ , que se relacionan con la presencia de amidas terciarias, también componentes de las proteínas, el estiramiento asimétrico  $\text{P=O}$  de enlaces fosfodiesteres, proveniente del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, y las uniones C-O-C dominada por las vibraciones de los anillos provenientes de carbohidratos, principales componentes de los exopolisacáridos de la biopelícula.

**Tabla 17.** Asignación de los picos observados en los espectros IR de las figuras 55 y 56.

Figura No.	Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación
55	3351	Grupo amida proveniente de la unión del ácido carboxílico con la amina primaria (R-NH-CO-R)
56	3339	
55 y 56	1637	Amida primaria
55	1600-1400	Amida secundaria y el ion carboxilato $\text{COO}^-$ proveniente del extremo C-terminal de proteínas
55	1400-1200	Amidas terciarias. Estiramiento asimétrico $\text{P=O}$ de enlaces fosfodiesteres Uniones C-O-C dominada por las vibraciones de los anillos provenientes de carbohidratos.



**Figura 55.** Espectro IR del coágulo formado en la superficie del stent a las 12 horas de la adición del inóculo al sistema de flujo.



**Figura 56.** Espectro IR del material obtenido posterior a la sonicación del stent retirado del sistema de flujo.

---

# Capítulo 5

---

## Conclusiones

---

- Las curvas de crecimiento realizadas en diferentes medios, demostraron la capacidad del *S. aureus* para desarrollarse de manera óptima, tanto en suero como en sangre total.
- El desarrollo de biopelículas sobre la superficie de fragmentos de implantes intravasculares de Nitinol, utilizando un sistema estático, fue comprobado finalmente de acuerdo con las imágenes obtenidas por SEM, donde se pudo apreciar que el fragmento de Nitinol expuesto a la sangre total inoculada con *S. aureus*, se encontraba recubierto en gran parte, por una capa gelatinosa de exopolisacáridos y fibrina. De acuerdo con ello, la interacción inicial que ocurre entre la coagulasa y el fibrinógeno, para la formación de coágulo, es un paso importante en la formación de biopelículas por *S. aureus*.
- Las observaciones por microscopía óptica en las muestras obtenidas a partir del sistema estático, permitieron realizar el seguimiento de la formación de la biopelícula, indicando que el inicio de la adhesión bacteriana sobre el Nitinol, se dio a las 48 horas.
- El conteo de UFC/mL, alcanzó un valor máximo de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, demostrando la viabilidad y continuo crecimiento del *S. aureus* durante el tiempo de incubación utilizando un sistema estático.
- La cuantificación de azúcares y proteínas reforzada con el análisis de EDS en las muestras obtenidas a partir del sistema estático, mostraron un alto contenido de los mismos en la muestra inoculada comparada con la muestra blanco. En cuanto a la biopelícula, se confirmó la presencia de azúcares, lo que se relaciona con los exopolisacáridos, que de acuerdo con la literatura, componen en mayor parte la biopelícula y favorecen su adhesión.
- Con las pruebas realizadas en el sistema de flujo, se obtuvo la formación de la biopelícula a las 24 horas, con lo que se demostró, que a pesar de incluir la variable del flujo constante, los microorganismos tienen la tendencia a

adherirse a las superficies sólidas, a través de las uniones ligando específicas con las proteínas del plasma y la generación de EPS, que no sólo favorece su adherencia, sino que además los protege de los factores externos que puedan causarles algún daño.

- Los análisis colorimétricos, de EDS y ATR-FTIR, realizados tanto a los fragmentos de Nitinol sumergidos en sangre total sin inocular e inoculada, así como al agregado orgánico formado en el interior del stent colocado en el sistema de flujo, confirmaron la presencia de componentes orgánicos, concluyendo que además de las sustancias exopoliméricas extracelulares (EPS) generadas durante proceso de formación de las biopelículas, las proteínas plasmáticas, también jugaron un papel importante en el acondicionamiento de las superficies de Nitinol y en el proceso de unión del *S. aureus* a las mismas.
- A pesar de haber tenido la presencia de un segundo microorganismo en el ensayo realizado con el sistema de flujo, cabe destacar la capacidad de las bacterias para convivir en comunidades mixtas, situación que se presenta comúnmente en la naturaleza y que en ocasiones da lugar a una relación simbiótica, que favorece ambos microorganismos. Es así como también las bacterias pueden transferir información genética entre sí, a través de plásmidos, lo que favorece la adopción de nuevos mecanismos de resistencia a medicamentos antimicrobianos.
- Los resultados aquí obtenidos, destacan la originalidad de este trabajo, ya que a la fecha no existen estudios que demuestren el desarrollo de biopelículas por *S. aureus* en fluidos biológicos. Estudios previos han demostrado la habilidad de este microorganismo en el desarrollo de biopelículas sobre implantes médicos. Sin embargo, para la reproducción “*in-vitro*”, únicamente han sido utilizadas soluciones sintéticas tales como medios de cultivo, soluciones fisiológicas, etc. Al utilizar sangre total y sus derivados (suero y plasma), fue posible demostrar que *S. aureus*, no

obstante de inducir la coagulación sanguínea, es capaz de crecer “*in-vitro*” en el interior de dicho coágulo, formando una biopelícula.

- Se recomienda el diseño de experimentos a futuro, utilizando modelos animales, a fin de observar la respuesta inmunológica del huésped y su efecto en la formación de la biopelícula sobre implantes intravasculares metálicos (stents). Igualmente, sería interesante incluir análisis más específicos, que permitan determinar la clase de proteínas que median la adhesión bacteriana, así como los polisacáridos que componen principalmente las biopelículas generadas por *S. aureus*.

---

# Capítulo 6

---

## Referencias

---

1. Donlan, R.M., *Biofilms and device-associated infections*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(2): p. 277-81.
2. Katsikogianni, M. and Y.F. Missirlis, *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions*. Eur Cell Mater, 2004. **8**: p. 37-57.
3. Kaufmann, B.A., et al., *Coronary stent infection: a rare but severe complication of percutaneous coronary intervention*. Swiss Med Wkly, 2005. **135**(33-34): p. 483-7.
4. Bukhari, R.H., et al., *Bilateral Renal Artery Stent Infecyion and Pseudoaneurysm formation*. JVIR, 2000. **11**(3): p. 337-341.
5. Chambers, S.T., *Diagnosis and management of staphylococcal infections of vascular grafts and stents*. Intern Med J, 2005. **35 Suppl 2**: p. S72-8.
6. Thibodeaux, L.C., et al., *Infection of Endovascular Stents in a Swine Model*. The American Journal of Surgery, 1996. **172**: p. 151-154.
7. Hearn, A.T., et al., *Endovascular stent infection with delayed bacterial challenge*. Am J Surg, 1997. **174**(2): p. 157-9.
8. Dosluoglu, H.H., et al., *Stent-Related Iliac Artery and Iliac Vein Infections*. Journal of Endovascular Therapy, 2001. **8**: p. 202-209.
9. Alonso, J.L. and W.H. Goldmann, *Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology*. Life Sci, 2003. **72**(23): p. 2553-60.
10. Bowen, W.R., et al., *Direct measurement of the force of adhesion of a single biological cell using an atomic force microscope*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1998. **136**(1-2): p. 231-234.

11. Beech, I.B., et al., *The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces*. . Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2002. **23**(2-3): p. 231-247.
12. Bunt, T.J., et al., *Infection of a chronically implanted iliac artery stent*. Ann Vasc Surg, 1997. **11**(5): p. 529-32.
13. Therasse, E., et al., *Infection with fatal outcome after endovascular metallic stent placement*. Radiology, 1994. **192**(2): p. 363-5.
14. Valdez, B.S., et al., *Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano*. Ciencia y desarrollo en Internet, 2005.
15. Devices, A.C. *Drug Coated Stent*. 2008 [cited 2008 Septiembre 11 ]; Available from: [http://advancedcardiovasculardevices.com/drug\\_stent.html](http://advancedcardiovasculardevices.com/drug_stent.html).
16. Badimon, L. and G. Vilahur, *Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario*. Revista española de cardiología, 2008. **61**(5): p. 501-513.
17. Rosas, R.A., et al., *¿La longitud del stent modifica la evolución clínica de los pacientes sometidos a intervencionismo coronario percutáneo (ICP)?* Revista Mexicana de Cardiología, 2005. **16**(4): p. 139-145.
18. Matadamas, Z.C., et al., *Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocisteinemia*. Rev Med IMSS, 2003. **41**(3): p. 235-249.
19. Palmaz, J.C., *Intravascular stents: tissue-stent interactions and design considerations*. AJR Am J Roentgenol, 1993. **160**(3): p. 613-8.
20. Mazumder, M.M., et al., *Corrosion resistance of polyurethane-coated nitinol cardiovascular stents*. J Biomater Sci Polym Ed, 2003. **14**(12): p. 1351-62.

21. Pelton, A.R., D. Stockel, and T.W. Duerig, *Medical Uses of Nitinol*, in *Proceedings of the International Symposium on Shape Memory Materials*. 2000: Kanazawa. p. 63-70.
22. Vascular, A. *Absolute 0.035 Biliary Self Expanding Stent System*. 2006-2008 [cited 2008; Cordis SMART, stent para uso biliar]. Available from: [http://www.abbottvascular.com/av\\_dotcom/url/content/en\\_US/10.10.30.10:10/general\\_content/Abtdiv\\_General\\_Content\\_0000081.htm](http://www.abbottvascular.com/av_dotcom/url/content/en_US/10.10.30.10:10/general_content/Abtdiv_General_Content_0000081.htm).
23. Outlook. *Nitinol- A NiTi Material Usual Properties*. 2000 [cited 2008 Septiembre 19]; SciMed Radius indicado para aplicaciones coronarias]. Available from: [http://www.wahchang.com/pages/outlook/html/bkissues/20\\_04.htm](http://www.wahchang.com/pages/outlook/html/bkissues/20_04.htm).
24. Medtronic. *AneuRx AAA Advantage Stent graft System*. 2008 [cited 2008 Septiembre]; Available from: <http://www.medtronic.com/physician/aneurx/>.
25. Palmaz, J.C., *New advances in endovascular technology*. Tex Heart Inst J, 1997. **24**(3): p. 156-9.
26. Maeng, M., et al., *Negative Vascular Remodelling After Implantation of Bioabsorbable Magnesium Alloy Stents in Porcine Coronary Arteries*. Heart, 2008. **o**: p. Abstract.
27. Medcompare. *Escape Nitinol Stone Retrieval Device*. 2003-2008 [cited 2008 Septiembre 19]; Available from: <http://www.medcompare.com/showcase.asp?showcaseid=223>.
28. Dichek, A.D., et al., *Seeding of Intravascular Stent with Genetically Engineered Endothelial Cells*. Circulation, 1989. **80**(5): p. 1347-1353.
29. Bangher, M., P. Livia, and J. Baccaro, *Infecciones asociadas a stent coronario: presentación de un caso y definición*. Revista española de cardiología, 2003. **56**(3): p. 325-326.

30. Parsek, M.R. and P.K. Singh, *Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis*. *Annu Rev Microbiol*, 2003. **57**: p. 677-701.
31. Craig, R.B., S.J. David, and G.T. Ian, *The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of Escherichia coli evaluated by BATH and HIC methods*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995. **113**: p. 257-261.
32. Murray, P.R., E.J. Baron, and M.A. Pfaller, *Manual of clinical microbiology*. 1995, Washington, D. C American Society of Microbiology.
33. Kayser, H.F., et al., *Medical Microbiology*. 2005, New York: Thieme Stuttgart.
34. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition ed. 2005.
35. Madigan, T.M., M.J. Martinko, and J. Parker, *Brock Biología de los Microorganismos*, ed. P.H. Hispanoamericana. Vol. 10 ed. 1999.
36. Palma, M., A. Hagggar, and J.I. Flock, *Adherence of Staphylococcus aureus is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(9): p. 2840-5.
37. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* *Clin Microbiol Rev*, 2002. **15**(2): p. 155-66.
38. Friedman, R.J. and Y.H. An, *Handbook of bacterial adhesion: Principles, methods and applications*. Mechanism and pathogenesis of implant and tissue infections, ed. Y.H. An, R.B. Dickison, and R.J. Doyle. 2000, Totowa N.J.: Humana Press.
39. Carpentier, B. and O. Cerf, *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. *J Appl Bacteriol*, 1993. **75**(6): p. 499-511.

40. Elder, M.J., et al., *Biofilm-related infections in ophthalmology*. Eye, 1995. **9** (Pt 1): p. 102-9.
41. Costerton, J.W., et al., *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annu Rev Microbiol, 1987. **41**: p. 435-64.
42. Scheuerman, T.R., A.K. Camper, and M.A. Hamilton, *Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion*. J Colloid Interface Sci, 1998. **208**(1): p. 23-33.
43. Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley, *Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens*. Trends Microbiol, 2005. **13**(1): p. 7-10.
44. Govan, J.R. and V. Deretic, *Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev, 1996. **60**(3): p. 539-74.
45. Koch, C. and N. Hoiby, *Pathogenesis of cystic fibrosis*. Lancet, 1993. **341**(8852): p. 1065-9.
46. Rivera, T.J.A. and M.C. Román, *Biopelículas y salud pública*. Anales Medicos, 2005. **50**(4): p. 172-176.
47. King, J.S., Jr. and W.H. Boyce, *In vitro production of simulated renal calculi*. J Urol, 1963. **89**: p. 546-51.
48. Berger, R.E., et al., *Bacteria in the prostate tissue of men with idiopathic prostatic inflammation*. J Urol, 1997. **157**(3): p. 863-5.
49. Nickel, J.C. and J.W. Costerton, *Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis*. The Prostate, 2006: p. 107-114.
50. Lai, C.W., et al., *Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis*. Am J Gastroenterol, 1992. **87**(9): p. 1198-9.

51. Noiri, Y., et al., *Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis*. J Endod, 2002. **28**(10): p. 679-83.
52. Yokoi, N., et al., *Acute conjunctivitis associated with biofilm formation on a punctal plug*. Jpn J Ophthalmol, 2000. **44**(5): p. 559-60.
53. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
54. Yuehei, H.A. and J.F. Richard, *Laboratory Methods for Studies of Bacterial Adhesion*. Journal of Microbiological Methods, 1997. **30**: p. 141-152.
55. Christensen, B.B., et al., *Molecular tools for study of biofilm physiology*. Methods Enzymol, 1999. **310**: p. 20-42.
56. Anderson, N.B., et al., *Weak Rolling adhesion enhances Bacterial Surface Colonization*. Journal of Bacteriology, 2007. **189**(5): p. 1794-1802.
57. Donlan, R.M., et al., *Model System Growing Quantifying Streptococcus pneumonia Biofilms In Situ and in Real Time*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(8): p. 4980-4988.
58. Cross, A.S., et al., *Choice of bacteria in animal models of sepsis*. Infect Immun, 1993. **61**(7): p. 2741-7.
59. Nozohoor, S., J.I. Flock, and A. Heimdahl, *Experimental endocarditis in the rat secondary to septic arthritis induced by Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 1999. **5**(3): p. 158-163.
60. Yao, L., et al., *Correlation of Histopathologic and bacteriologic changes with cytokine expression in an experimental murine model of bacteremic Staphylococcus aureus infection*. Infection and immunity, 1997. **65**(9): p. 3889-3895.

61. Kropec, A., et al., *Poly-N-acetylglucosamine production in Staphylococcus aureus is essential for virulence in murine models of systemic infection*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6868-76.
62. Weiss, W.J., et al., *Effect of srtA and srtB gene expression on the virulence of Staphylococcus aureus in animal models of infection*. J Antimicrob Chemother, 2004. **53**(3): p. 480-6.
63. Surman, S.B., et al., *Comparison of microscope techniques for the examination of biofilm*. Journal of Microbiological Methods, 1996. **25**: p. 57-70.
64. Álvarez, C.L., *Aumentando nuestro poder de visión: microscopios convencionales de barrido por sonda*, in *Tecnología en la UABC*, V.B. Salas, Editor. 2006, Miguel Angel Purrua: Mexicali, BC.
65. PurdueUniversity. *Scanning electron Microscope (SEM)*. 2006 [cited 2008 Octubre 9]; Available from: <http://www.purdue.edu/REM/rs/sem.htm>.
66. Drenkow, G. *What is atomic force microscope*. 2007 [cited 2008 Octubre 9]; Available from: <http://nano.tm.agilent.com/blog/2007/06/21/what-is-an-atomic-force-microscope/>.
67. Dufrene, F.Y. and J.D. Muler, *Microbial surfaces Investigated Using Atomic Force Microscopy*. Methods in microbiology, 2005. **34**: p. 163-197.
68. Erukhimovitch, V., et al., *FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections*. J Pharm Biomed Anal, 2005. **37**(5): p. 1105-8.
69. Donlan, R.M., et al., *Model system for growing and quantifying Streptococcus pneumoniae biofilms in situ and in real time*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(8): p. 4980-8.
70. Skoog, A.D., M.D. West, and J.F. Holler, *Química Analítica*. 6 ed, ed. M.C. Ramirez. 1996, Mexico: Mc Graw Hill.

71. Bosch, A., et al., *Characterization of Bordetella pertussis growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **71**(5): p. 736-47.
72. Zhang, X., L.P. Bishop, and M.J. Kupferle, *Measurement of Polysaccharides and Proteins in Biofilm Extracellular Polymers*. Water Science and Technology, 1995. **37**(4): p. 345-348.
73. Dubois, M., et al., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(3).
74. Kruger, J.N., *The Bradford Method for Protein Quantitation*, in *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 1996, Humana Press Inc.: Totowa, NJ.
75. Aitken, A. and M. Learmonth, *Protein determination by UV absorption*, in *The protein Protocols Handbook*, W.M. J., Editor. 1996, Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey.
76. Jawetz, E., J. Melrick, and E.A. Adelberg, *Crecimiento y muerte de los microorganismos*, in *Microbiología Médica* E.M. Moderno, Editor. 1983. p. 85-94.
77. Hogman, C.F. and H.T. Meryman, *Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion*. Transfus Med Rev, 1999. **13**(4): p. 275-96.

# GLOSARIO

*Español (inglés)*

**Angioplastia Percutánea Trasluminal (Angioplasty):** Procedimiento mediante el cual se inserta un catéter de balón, el cual permite empujar la placa ateromatosa contra la pared y de esta forma abrir los vasos sanguíneos obstruidos, mejorando así la circulación sanguínea. Por medio de este procedimiento también se insertan los stents, los cuales sirven como soporte para mantener abiertas las arterias<sup>[1]</sup>.

**Adhesión (Adhesion or attachment):** Interacción estable de una célula con una superficie, la cual está mediada por la excreción activa de químicos desde la superficie de las células viables, para unirse a un sustrato<sup>[2]</sup>. Esta adhesión puede ser reversible (adhesión primaria) o irreversible (adhesión secundaria).

**Ateroesclerosis:** Proceso que ocasiona el estrechamiento de la luz arterial (estenosis), y que tiene lugar a partir de una disfunción del endotelio, que facilita la acumulación y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y estimula la infiltración de monocitos circulantes, donde estos se diferencian a macrófagos que captan lípidos en gran cantidad (células espumosas). Adicionalmente, los factores de crecimiento, las citoquinas, las plaquetas y los linfocitos T, favorecen el desarrollo de la lesión endotelial, y potencian la migración, proliferación y síntesis de la matriz extracelular por las células lisas vasculares. Esta respuesta inflamatoria y fibroproliferativa crónica, es la responsable del progreso de las lesiones, a ateroescleróticas<sup>[3]</sup>.

**Biopelícula (biofilm):** Estructura comunitaria de células bacterianas, incluidas en una matriz polimérica, la cual se encuentra adherida a una superficie inerte o viva<sup>[4]</sup>.

**Cardiopatía Isquémica:** Se refiere a un grupo de síndromes íntimamente relacionados, que se deben a un desequilibrio entre la demanda de Oxígeno y el aporte de sangre del miocardio. La causa más común es un estrechamiento de las luces de las arterias coronarias por ateroesclerosis, por lo que también se denomina cardiopatía coronaria o enteropatía coronaria<sup>[5]</sup>.

**Coagulasa (Coagulase):** Enzima característica del *S. aureus*, que funciona como la trombina para convertir el fibrinógeno en fibrina, lo que da como resultado la formación del coágulo.

**Desprendimiento (Detachment):** La pérdida de células individuales o agrupadas desde la biopelícula. El desprendimiento puede ser un proceso activo (dispersión), un proceso mecánico inducido pasivamente (fuerza ejercida por el flujo) o un proceso químico (presencia de agentes que disuelven la matriz de EPS)<sup>[2]</sup>.

**Glicocálix (Glicocálix, slime or polymer matrix):** Es la sustancia gelatinosa que sostiene la biopelícula y está compuesto en su mayor parte por agua, al igual que por Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) de origen bacteriano. El glicocalix es predominantemente aniónico por lo que crea un sistema eficiente, que atrapa y concentra minerales esenciales y nutrientes del ambiente que lo rodea. Por otro lado, el glicocálix también sirve como barrera protectora contra amenazas ambientales, como lo son los biocidas, antibióticos, anticuerpos, surfactantes, bacteriófagos y predadores foráneos, tales como amebas de vida libre y leucocitos<sup>[4]</sup>.

**Hemostasia:** Es el resultado del conjunto de procesos bien regulados, que mantienen la sangre en un estado líquido y sin coágulos, en el interior de los vasos normales, aunque con capacidad para desencadenar con rapidez, la formación de un tapón hemostático en el lugar de la lesión vascular<sup>[5]</sup>.

**Infarto Agudo del Miocardio, IAM (Acute myocardial infarction):** Comúnmente conocido como ataque cardíaco. Oclusión de una arteria coronaria por aterosclerosis o embolia, que provoca un área de necrosis en el miocardio<sup>[6]</sup>.

**Implanes intravasculares ó endoprotesis (Stent):** Son finos tubos de malla de alambre, hechos de diferentes aleaciones, que al final del proceso son tratados en su superficie, para promover la formación de una capa de óxido metálico, el cual una vez en contacto con el fluido biológico, provoca una atracción inicial de las proteínas plasmáticas, lo que pasiva la superficie del implante y evita la agregación plaquetaria, al igual que la reacción leucocitaria<sup>[7]</sup>. Son indicados en pacientes con aterosclerosis<sup>[5]</sup>.

**Nitinol:** Aleación compuesta por Níquel 55% y Titanio 45%. Fue descubierto por el Naval Ordnance Laboratory, de donde provienen las iniciales NOL. Este material se caracteriza por tener memoria de forma a ciertas temperaturas.

**Peptidoglucano (Peptidoglycan or murein):** Componente rígido de la pared celular bacteriana, compuesto por dos derivados de azúcares: N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico, al igual que por los aminoácidos L-alanina, D-alanina, D-glutámico, y Lisina o ácido diaminopimélico (DAP)<sup>[8]</sup>.

**Planctónica (Planktonic):** Término utilizado para referirse a las bacterias que se encuentran en estado libre y flotante, y no forman parte de la biopelícula.

**Quorum Sensing:** Sistema por el cual las bacterias se comunican. Estas señales moleculares, son químicas similares a las feromonas, producidos por las células bacterianas y tienen la capacidad de afectar el comportamiento de las bacterias circulantes<sup>[2]</sup>.

**Reestenosis (Restenosis):** Recurrencia del estrechamiento arterial.

**Sésil (Sessile):** Término utilizado para referirse a las bacterias que se encuentran unidas a la superficie formando parte de una biopelícula.

**Síndrome Coronario Agudo, SICA:** Se aplica al conjunto de las tres manifestaciones catastróficas agudas de la cardiopatía isquémica: Angina Inestable, Infarto del Miocardio y Muerte Cardíaca Súbita<sup>[5]</sup>.

**Superficies abióticas (abiotic surfaces):** Hace referencia a la superficie de materiales inertes.

**Superficies bióticas (biotic surface):** hace referencia a la superficie de tejidos o células.

**Sustancias Poliméricas Extracelulares (Extracellular Polymeric Substances, EPS):** Polímeros de variada composición química, que son excretados por las células al interior de la biopelícula. Los EPS componen el glicocalix y además de dar estabilidad a la biopelícula, sirven como mediadores en la adherencia a las superficies. Aunque generalmente se asume que los EPS están compuestos principalmente por exopolisacáridos, también pueden contener proteínas y ácidos nucleicos<sup>[2]</sup>.

## REFERENCIAS

1. Corporation, C., *La seguridad de los Stents Coronarios*. Cordis Cypher (Folleto), 2007(155-5501-1): p. 1-9.
2. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 95-108.
3. Badimon, L. and G. Vilahur, *Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario*. Revista española de cardiología, 2008. **61**(5): p. 501-513.
4. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 155-66.
5. Kumar, V., S.P. Cotran, and L.S. Robbins, *Robbins, Patología Humana*. 7 ed, ed. E. España. 2004, Madrid
6. Oceano, *Diccionario de Medicina, Óceano Mosby 4 ed*, G.e. Oceáno, Editor.
7. Palmaz, J.C., *Intravascular stents: tissue-stent interactions and design considerations*. AJR Am J Roentgenol, 1993. **160**(3): p. 613-8.
8. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth Edition ed. 2005.

## ANEXO

### SOLUCIONES EMPLEADAS

**Infusión Cerebro Corazón:** Medio de cultivo utilizado para el cultivo de microorganismos fastidiosos como estreptococos, neumococos y meningococos y es recomendado por la CLSI para preparar el inóculo de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Este medio está compuesto por: Infusión de cerebro corazón, peptona, dextrosa, cloruro de sodio y fosfato disódico. En el caso del medio de cultivo sólido, el medio contiene agar. pH:  $7.4 \pm 2$ .

**CPDA:** Solución anticoagulante y preservante, compuesta por citrato, fosfato, dextrosa y adenina. Existen 2 variedades, CPDA-1 y CPDA-2 la cual es una fórmula mejorada de la anterior, con mayor concentración de dextrosa y adenina. Se ha observado que la sangre conservada con CPDA-1 tiene una viabilidad de 35 días, mientras que la conservada con CPDA-2, puede tener una viabilidad de hasta 49 días.

**Medio de transporte Stuart:** Este medio es utilizado para la recolección, transporte y preservación de muestras microbiológicas. Está compuesto por: Tioglicolato de sodio, glicerofosfato de sodio, agar, cloruro de calcio y azul de metileno. En este medio el cloruro de calcio proporciona iones esenciales para mantener el balance osmótico. El tioglicolato de sodio evita los cambios oxidativos y provee una atmósfera reducida. El glicerofosfato de sodio actúa como buffer. El azul de metileno es un colorante indicador del estado de óxido-reducción. pH:  $7.4 \pm 2$ .

**Solución de Dulbecco's (Dulbecco's modified eagle médium):** Solución utilizada comúnmente para cultivos celulares. Está compuesta por D-glucosa: 1,000 mg/L, L-glutamina y Piruvato de Sodio: 110 mg/L.

**Solución de Hartman:** Solución isotónica que se utiliza de forma intravenosa como fluidoterapia. Está compuesta por Cloruro de Sodio: 0.6 g, Cloruro de Potasio: 0.03 g, Cloruro de Calcio: 0.02 g y Lactato de Sodio: 0.310 g.