



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

---

---

**“EFECTO DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS SOBRE LA  
FORMACIÓN DE ABSCESOS SUBCUTÁNEOS EN UN  
MODELO MURINO CAUSADOS POR *Staphylococcus  
aureus* Y SU DESARROLLO *in vitro*”**

Tesis que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

Presenta:

**L.M.C. YARI JAGUEY HERNÁNDEZ**

Director de Tesis

**DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES**

Codirector de Tesis

**DR. FERNANDO DONADO PÉREZ**

San Agustín Tlaxiaca Hgo., Octubre del 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
 Instituto de Ciencias de la Salud  
 School of Health Sciences  
 Área Académica de Medicina  
 Department of Medicine  
 Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

27/JUNIO/2017

AAMMCBSA077/2017

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Yari Jaguey Hernández

Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada 'Efecto de los campos magnéticos sobre la formación de abscesos subcutáneos en un modelo murino causados por *Staphylococcus aureus* y su desarrollo *in vitro*' con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE DRA. EVA MARÍA MOLINA TRINIDAD
- PRIMER VOCAL DR. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES
- SECRETARIO DR. FERNÁNDO DONADO PÉREZ
- SUPLENTE M EN C. CARMEN BALDERAS DELGADILLO
- SUPLENTE M EN C. CECILIO TAPIA IGNACIO

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

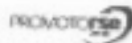


M.C. ESP. ADRIAN MOYA ESCALERA  
 DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO  
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ  
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

UAEH  
 BIBLIOTECA



Instituto de Ciencias de la Salud  
 Exhadavda la Concepción s/n Camino a Tixauhtla  
 San Agustín Tlaxiaco, Hgo. C.P. 42160  
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4306  
 info\_bio\_sci@uah.edu.mx

www.uah.edu.mx

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de manutención durante el desarrollo de estos estudios, número de beca 583012 durante el periodo 01 de agosto de 2015 al 31 de julio del 2017.

Dedicado para ustedes los amores de mi vida

Héctor Roberto Tapia Jaguey y Cecilio Tapia Ignacio

por ayudarme a dejar de temer y acompañarme en el proceso de entender.

## **Agradecimientos**

"Para el logro del triunfo siempre ha sido indispensable pasar por la senda de los sacrificios".

- Simón Bolívar

Agradezco al Dr. Marco A. Becerril Flores por su asesoría durante el desarrollo de este proyecto, al Dr. Fernando Donado Pérez por su ayuda, gran paciencia dedicación e ingenio para resolver los contratiempos enfrentados así como a los integrantes del comité tutorial a la Dra. Eva María Molina Trinidad, al M. en C. Cecilio Tapia Ignacio y a la M. en C. Carmen Balderas Delgadillo por su dedicación.

Agradezco a mi pequeña familia que hayan caminado a mi lado durante este sendero y por este medio les hago saber que todos los sacrificios grandes y pequeños han valido la pena, porque ahora sé que a pesar de todas las dificultades siempre estarán a mi lado gracias por existir y ser parte de mi vida Héctor Roberto Tapia Jaguey y mi compañero de vida Cecilio Tapia Ignacio. De igual manera agradezco a mi mamá Catalina Hernández Pérez por enseñarme que con perseverancia todo se puede lograr, así como a mis hermanas Lizbeth y Brenda por enseñarme que la paciencia siempre es buena compañía, a la señora Ma. Candelaria Ignacio Catarina quien fue como una segunda madre, al señor Roberto Tapia Antonia quien me ha enseñado a nunca perder de vista mi objetivo ambos nos han apoyado en todos los sentidos posibles, así como a Leticia, Mayra y Jaime por su compañía en todo momento.

Detrás de un trabajo de investigación siempre estarán grandes personas que de una u otra manera realiza aportaciones es por eso que quiero agradecer a mis amigas Alicia y Laura por su compañía y apoyo incondicional a lo largo de la maestría, por escucharme y ayudarme a solucionar todos los asuntos personales y académicos; a Paty y José del laboratorio de fisiología por su palabras de aliento y facilitar el uso de equipos de laboratorio; a Rubén y Antonio por sus valiosas aportaciones en la realización del estudio de patología así como al personal del bioterio del ICSa por sus amables atenciones a la Dra. Bárbara y al Dr. Alejandro así como a Emiliano por recibarnos siempre con una sonrisa.

## Resumen

Uno de los grandes problemas en la actualidad es el creciente aumento de la resistencia antibiótica de las bacterias causantes de enfermedades, por lo que es primordial el desarrollo de alternativas de tratamiento como lo es el campo magnético.

El *Staphylococcus aureus* es la segunda causa de infecciones nosocomiales y la primera causa de infecciones causadas por cuerpos implantados, se estima que en la actualidad más del 90 por ciento de las cepas de esta bacteria que causan infecciones son resistentes a meticilina. En el presente trabajo se aplicó campo magnético generado mediante bobinas de Helmholtz a 8 cepas de *Staphylococcus aureus* y en un modelo murino de abscesos subcutáneos. Se encontró que al aplicar 158 Gauss de intensidad de campo magnético constante aplicado al *Staphylococcus aureus* durante 72 horas disminuye hasta en un 93 por ciento su tasa de crecimiento a las 48 horas de exposición. Por otro lado, se observó que, la aplicación de 133 Gauss de intensidad altera la composición química de las bacterias sobre todo de los elementos sodio y calcio, esto último se comprobó mediante análisis elemental de microscopía electrónica de barrido. Así mismo, se encontró que a esta intensidad ocasionó modificaciones en la respuesta a los antibióticos evaluada mediante el estudio de antibiograma. Para el estudio *in vivo* se administró concentrado bacteriano en el muslo de ratones cepa CD-1 vía subcutánea logrando la producción de abscesos subcutáneos. Se formaron 5 grupos, con distintos tratamientos teniendo como objetivo comparar la respuesta del tamaño de los abscesos con un tratamiento a base de amikacina y mediante la exposición a campo magnético obteniendo una disminución en el tamaño de los abscesos en ambos grupos.

Se comprobó por tanto que el efecto de la aplicación de campo magnético sobre bacterias depende de la intensidad y del tiempo de aplicación siendo capaz de inducir cambios en el crecimiento, la respuesta a antibióticos y la composición química de las bacterias.

**Palabras clave:** Campos magnéticos, *Staphylococcus aureus*, absceso, resistencia antibiótica, bobinas de Helmholtz.

## **Abstract**

One of the major problems at present is the increasing increase of antibiotic resistance of disease-causing bacteria, so it is essential develop treatment alternatives such as the magnetic field.

*Staphylococcus aureus* is the second leading cause of nosocomial infections and the leading cause of infections caused by implanted bodies, it is estimated that currently more than 90 percent of the strains of this bacteria that cause infections are resistant to methicillin. In the present work magnetic field generated by Helmholtz coils was applied to 8 strains of *Staphylococcus aureus* and in a murine model of subcutaneous abscesses. It was found that when applying 158 Gauss of constant magnetic field intensity applied to *Staphylococcus aureus* for 72 hours decreases up to 93 percent its growth rate at 48 hours of exposure. On the other hand, it was observed that the application of 133 Gauss of intensity alters the chemical composition of the bacteria mainly of the elements sodium and calcium, this last one was verified by elemental analysis of scanning electron microscopy. Likewise, it was found that at this intensity caused modifications in the response to antibiotics evaluated by the antibiogram study. For the *in vivo* study, bacterial concentrate was administered to the thigh of CD1 strain mice subcutaneously, resulting in the production of subcutaneous abscesses. Five groups were formed, with different treatments aiming to compare the size response of abscesses with an amikacin treatment and by means of exposure to magnetic field obtaining a decrease in abscess size in both groups.

It was therefore verified that the effect of the application of magnetic field on bacteria depends on the intensity and the time of application, able to induce changes in the growth, the antibiotic response and the chemical composition of the bacteria.

**Key words:** Magnetic fields, *Staphylococcus aureus*, abscess, antibiotic resistance, Helmholtz coils.

## CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN .....	16
II	ANTECEDENTES.....	17
	2.1 Generalidades .....	17
	2.1.1 Infecciones.....	17
	2.1.1.1 Infecciones comunitarias y nosocomiales .....	17
	2.1.2 La importancia del <i>S. aureus</i> en la etiología de las infecciones en la actualidad. ....	18
	2.1.2.1 Características generales del <i>S. aureus</i> .....	18
	2.1.2.2 Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> .....	19
	2.1.2.2.1 Intoxicaciones.....	23
	2.1.2.2.2 Infecciones estafilocócicas .....	24
	2.1.3 Patogenia y factores de virulencia del <i>S. aureus</i> .....	24
	2.1.3.1 Moléculas de adhesión .....	25
	2.1.3.2 Formación de biofilm o biopelícula .....	26
	2.1.3.3 Producción de toxinas .....	27
	2.1.3.4 Evasión de la respuesta inmune y persistencia intracelular .....	29
	2.1.4 Características genéticas de <i>S. aureus</i> .....	31
	2.1.4.1 Transposones.....	32
	2.1.4.2 Plásmidos conjugativos.....	32
	2.1.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos .....	34
	2.1.5.1 Resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o $\beta$ -lactamasas).....	35
	2.1.5.2 Resistencia intrínseca.....	35
	2.1.5.3 Modificación de las PBPs .....	37
	2.1.6 Tratamiento para infecciones causadas por <i>S. aureus</i> .....	37
	2.1.6.1 Antibioticoterapia: sus ventajas y desventajas .....	38
	2.1.6.1.1 Vancomicina como fármaco de elección en el tratamiento de infecciones por SARM .....	40
	2.1.6.1.1.1 Farmacocinética de Vancomicina.....	41
	2.1.6.1.2 Desventajas del uso de Vancomicina .....	42
	2.1.7 Campo electromagnético (CEM).....	42
	2.1.7.1 Campo eléctrico (CE).....	43
	2.1.7.2 Campo magnético (CM) .....	44



2.1.7.2.1 <i>Campo geomagnético terrestre</i> .....	45
2.1.7.2.2 <i>Bobinas Helmholtz</i> .....	45
2.2 <i>Antecedentes del problema</i> .....	46
2.2.1 <i>Uso de los CEM</i> .....	46
2.2.2 <i>Efectos biológicos de los CEM</i> .....	47
2.2.3 <i>Utilidad de los campos Magnéticos</i> .....	48
2.2.4 <i>Efectos en salud de los Campos Magnéticos</i> .....	48
2.3 <i>Marco teórico</i> .....	49
<b>III JUSTIFICACIÓN</b> .....	51
<b>IV HIPÓTESIS</b> .....	52
<b>V OBJETIVOS</b> .....	52
5.1 <i>Objetivo General</i> .....	52
5.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	52
<b>VI MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	53
6.1 <i>Tamaño de muestra y muestreo</i> .....	53
6.2 <i>Pruebas bioquímicas para la identificación de S. aureus</i> .....	54
6.2.1 <i>Tinción de gram.</i> .....	54
6.2.2 <i>Siembra en agar sal-manitol</i> .....	56
6.2.3 <i>Siembra en agar para estafilococos No. 110</i> .....	57
6.2.4 <i>Prueba de Catalasa</i> .....	58
6.2.5 <i>Prueba de Coagulasa</i> .....	59
6.3 <i>Curva de crecimiento bacteriano</i> .....	59
6.3.1 <i>Método de Miles y Misra</i> .....	60
6.3.2 <i>Método de la escala de McFarland</i> .....	61
6.4 <i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	63
6.5 <i>Determinación de sensibilidad a antibióticos mediante antibiograma</i> .....	65
6.6 <i>Caracterización de bobina de Helmholtz</i> .....	67
6.7 <i>Diseño experimental</i> .....	69
6.8 <i>Análisis estadístico</i> .....	70
<b>VII RESULTADOS</b> .....	71
7.1 <i>Pruebas bioquímicas</i> .....	71
7.2 <i>Curva de crecimiento</i> .....	73

7.3 Microscopía electrónica de barrido.....	76
7.4 Caracterización de bobina 1 y 2 .....	78
7.4.1 Campo magnético constante .....	78
7.3.2 Campo magnético Variable.....	79
7.5 Efecto del CMV sobre el crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	80
7.6 Efecto del CMC sobre el crecimiento del <i>S. aureus</i> .....	81
7.6.1 Efecto de 133G de intensidad de CMC .....	84
7.7 Análisis de EDS.....	86
7.8 Evaluación del efecto del CMC sobre la respuesta a antibióticos.....	88
7.9 Efecto del CMC sobre la formación de abscesos cutáneos en un modelo murino.....	89
<b>VIII DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>92</b>
8.1 <i>S. aureus</i> crece en medio de cultivo rico en sodio, además de ser catalasa positivo. ....	92
8.2 Curva de crecimiento de la cepa 108F de <i>S. aureus</i> estudiada .....	93
8.3 El CM alcanzado es mayor al generar CMC en la bobina 1 al emplear corriente directa. ...	93
8.4 El CMC a 158G de intensidad demostró afectar el crecimiento de <i>S. aureus</i> .....	94
8.5 Cambios en la composición química de las muestras expuestas a 133G de CMC .....	94
8.6 Cambios en el antibiograma después de la exposición a 133G de CMC durante 24h .....	95
8.7 Cambio en el crecimiento in vitro de las cepas expuestas a CM comparadas con sus controles .....	96
8.8 Disminución del tamaño de los abscesos.....	98
<b>IX CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>X BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>102</b>
<b>XII ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i>	22
Tabla 2. Composición de los tubos de McFarland	62
Tabla 3. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>S. aureus</i>	71
Tabla 4. Análisis EDS de las cepas 106F y 119A al ser expuestas a CMC a diferentes tiempos	87
Tabla 5. Antibiograma comparativo al ser expuesto a CMC	89
Tabla 6. Absceso cutáneo en los diferentes grupos de experimentación	90

## Índice de figuras

Fig. 1 Modelo de producción de factores de virulencia en infecciones estafilocócicas	20
Fig. 2 Mecanismos de daño de <i>S. aureus</i>	21
Fig. 3 Factores de virulencia de <i>S. aureus</i>	25
Fig. 4 Mecanismos antimicrobianos de neutrófilos contra <i>S. aureus</i>	29
Fig. 5 Mecanismo propuesto para explicar la inhibición de la fagocitosis por Efb	31
Fig. 6 Modelo de transferencia del DNA durante la conjugación	33
Fig. 7 Algoritmo para la elección de tratamiento antibiótico empírico ante la sospecha de infecciones causadas por SARM	38
Fig. 8 Tinción de gram	55
Fig. 9 Prueba de catalasa	58
Fig. 10 Procedimiento para realizar la curva de crecimiento	61
Fig. 11 Equipo utilizado en el MEB	64
Fig. 12 Resultado de antibiograma después de 24 h de incubación a 37°C	66
Fig. 13 Caracterización del CM generado por las bobinas	68
Fig. 14 Monitoreo de la temperatura en las bobinas del Helmholtz	69
Fig. 15 Formación de biofilm	72
Fig. 16 Hemólisis	73
Fig. 17 Regresión lineal	74
Fig. 18 Curva de crecimiento cepa 108F método de McFarland	75
Fig. 19 Curva de crecimiento cepa 108 F mediante la técnica Miles y Misra	76
Fig. 20 MEB de la cepa 106 F	77
Fig. 21 Fotomicrografía MEB 10 000X de la cepa 119A	77
Fig. 22 CM generado por las bobinas de Helmholtz	78
Fig. 23 CMV generado por la bobina 1	79

Fig. 24 CMV bobina 1 durante 60 min	80
Fig. 25 Curva de crecimiento cepa 108 F sometida a CMV	81
Fig. 26 Crecimiento comparativo durante 48h exponiendo la cepa 119A a diferente intensidad de CM	82
Fig. 27 Curvas de crecimiento de las 8 cepas de <i>S. aureus</i> sometidas a 158 G de intensidad de CMC comparadas con su control	83
Fig. 28 Comparación de curva de crecimiento de la cepa 106F expuesta a 156 G de intensidad de CMC y no expuesta	84
Fig. 29 Curva de crecimiento de 4 cepas sometidas a 133G	85
Fig. 30 Análisis de elementos mediante EDS	86
Fig. 31 Tamaño de los abscesos en los grupos de experimentación	91

## Abreviaturas

°C Grados Celsius

ARN Ácido desoxirribonucleico

ARNt Ácido ribonucleico de transferencia

BAP Proteínas Asociadas a biofilm

CDC Centers for Disease Control and Prevention

CHIPS Proteína de estafilococos inhibidora de quimiotaxis

C Citosina

ClfA Factor aglutinante A

ClfB Factor aglutinante B

CHIPS Proteína de estafilococos inhibidora de quimiotaxis

CMC Campo magnético constante

CMV Campo magnético variable

eADN ADN extracelular

EAP Proteína de adhesión extracelular

EDS Energy dispersive X-ray spectroscopy

EFB Proteína de unión a fibrinógeno

ETA Exfoliative Toxin A

ETB Exfoliative Toxin B

ETD Exfoliative Toxin D

Fc Fracción constante

eV Electron-volts

FnbpA Proteína A de unión a fibronectina

FnbpB Proteína B de unión a fibronectina

G Guanina

ICAM-1 Intercellular Adhesion Molecule 1

IS Secuencia de inserción

Kv Kilo-electronvolts

m metro

MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad

mm Milímetro

MSCRAMMs Moléculas adhesivas de matriz que reconocen componentes de superficie microbiana

µm Micrómetros

µT Microteslas

nm Nanómetros

NGAL Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

PIA Adhesina Intracelular de Polisacárido

pH Potencial de Hidrógeno

PMN Polimorfonucleares

PNAG Exopolímero de N-actetylglucosamine

PVL Panton Valentine Leukocidin

SAIV *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina

SaPIs Islas de patogenicidad

SSSS Staphylococcal scalded skin síndrome. Síndrome de piel escaldada estafilocócica

SASM *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina

SARM *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

SARM-CA Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquired in the community

SARM-H Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquired in the hospital

Tn Transposón



## I INTRODUCCIÓN

La evolución de las bacterias hacia la resistencia de antibióticos es una de los principales problemáticas de la terapéutica actual, específicamente el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es de gran importancia toda vez que es una bacteria de diseminación mundial causante de diversas enfermedades en animales y humanos. Debido a su gran capacidad para evadir las defensas naturales del huésped y que coloniza múltiples partes del cuerpo puede ocasionar numerosas enfermedades algunas de las cuales pueden derivar hasta en la muerte del paciente. Es la principal causa de enfermedades supurativas y la segunda causa de enfermedades nosocomiales, por lo que es necesario implementar terapias alternativas que sean capaces de disminuir la capacidad de proliferar y causar enfermedades, o que potencialice las terapias actuales. Una de tales alternativas es la terapia basada en la aplicación de campos magnéticos (CM).

Los campos magnéticos en la actualidad tienen múltiples aplicaciones en salud, por ejemplo, son la base del método diagnóstico por resonancia magnética, también se usan en terapia física para la rehabilitación de fracturas mediante magnetoterapia. Además recientemente se ha estudiado su influencia en microorganismos observándose una mejoría adicional al usarse en combinación con antibióticos.

## II ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Infecciones

Se define como *infección* al proceso de invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en un órgano de un cuerpo vivo que cursa con limitación de las defensas<sup>1</sup>.

Cabe señalar que no se consideran infecciones a la colonización ni a la inflamación. La colonización implica la presencia de microorganismos en la piel, membranas mucosa, heridas, en excreciones o secreciones, pero que no causan sintomatología. A diferencia de la inflamación que es el resultado de la respuesta tisular frente a traumatismos o estimulación por agentes infecciosos o no infecciosos<sup>2</sup>.

##### 2.1.1.1 Infecciones comunitarias y nosocomiales

La infección comunitaria es un tipo de infección que se propaga en el seno de una población reagrupada en un espacio relativamente restringido y confinado si el paciente no ha estado recientemente en una institución de salud. Puede presentarse en pacientes hospitalizados si hay indicios de que el paciente la tuviera en fase preclínica o en incubación en el momento del ingreso a la institución de salud<sup>3</sup>.

La OMS define las infecciones nosocomiales como una infección contraída en el hospital y que se desarrolla después de 48 horas de ingreso hospitalario<sup>4</sup>, por un paciente internado por una razón distinta de esa infección, o bien si la infección ocurre dentro de los 3 días después del alta hospitalaria o dentro de los 30 días posteriores a una intervención quirúrgica. La CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta las define como “toda infección que no esté presente o incubándose en el momento del ingreso en el hospital, que se manifieste clínicamente, o sea descubierta por la observación directa durante la cirugía, endoscopia y

otros procedimientos o pruebas diagnósticas, o que sea basada en el criterio clínico. Se incluyen aquellas que por su período de incubación se manifiestan posteriormente al alta del paciente y se relacionen con los procedimientos o actividad hospitalaria, y las relacionadas con los servicios ambulatorios"<sup>5</sup>.

### *2.1.2 La importancia del S. aureus en la etiología de las infecciones en la actualidad.*

El *S. aureus* es un microorganismo que forma parte de la microflora humana. Se estima que coloniza la piel y mucosas en el 30 al 50% de adultos y niños asintomáticos; el 20% de forma permanente y hasta 30% de forma intermitente siendo la tasa más alta en diabéticos insulino dependientes, inmunodeprimidos, y personas con lesiones cutáneas<sup>2</sup>. Esta bacteria se encuentra ampliamente diseminada en el ambiente por lo que su distribución se extiende a nivel mundial<sup>6</sup>, tiene una gran capacidad de adaptación por lo que afecta a todas las especies conocidas de mamíferos y pueden transmitirse de una especie a otra por lo que son frecuentes los casos de contagio humano-animales y viceversa <sup>6,7</sup>. *S. aureus* puede comportarse como comensal o patógeno, por lo que debe considerarse que la colonización aumenta el riesgo de infecciones<sup>8</sup>. En los humanos las zonas habituales de la colonización son las fosas nasales anteriores, la región inguinal, las axilas, el periné y la faringe<sup>9</sup>.

Debe destacarse la capacidad que tiene la bacteria de adherirse no solo a los tejidos del huésped sino también a los materiales plásticos (como catéteres intravasculares y material protésico), donde es capaz de crecer y persistir. En estos sitios puede formar biopelículas o biofilm lo cual le permite aumentar su sobrevivencia y evadir de mejor manera las defensas del huésped <sup>6</sup>.

#### *2.1.2.1 Características generales del S. aureus*

*S. aureus* es también conocido como estafilococo dorado por la coloración que adquieren sus colonias las cuales en un medio sólido son de coloración dorado blanquecinas, redondas y

sobre elevadas de bordes regulares. Es una bacteria gram positiva que mide de 0.5 – 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un genoma que mide 2.8 Mb<sup>10</sup>, tiende a agruparse en “racimos de uvas”<sup>11</sup> debido a la división celular irregular en distintos planos. Es un anaerobio facultativo (sólo forma citocromos en condiciones aeróbicas) no móvil, clasificado como catalasa positiva, es  $\beta$ -hemolítico, capaz de fermentar la glucosa y el manitol con producción de ácido<sup>11</sup>.

El *S. aureus* tolera amplios intervalos de temperatura (30-40°C) y pH (4.2 a 9.3), así como concentraciones de sal hasta 10%<sup>6,12,13</sup>, posee una pared relativamente amorfa que mide 20-40nm de espesor compuesto de peptidoglicanos (50%), ácido teicoico (40% ácido teicoico asociado a la pared celular y ácido lipoteicoico asociado a la membrana) y proteínas de superficie exoproteínas y autolisinas (10%). Se ha demostrado que más del 90% de las cepas clínicas de *S. aureus* poseen polisacáridos capsulares (cápsula) que disminuye la fagocitosis *in vitro* y aumenta su virulencia<sup>11</sup>.

*S. aureus* posee dos factores sigma ( $\sigma$ ), que son proteínas que se unen a la ARN polimerasa del núcleo para formar la holoenzima que se une a promotores específicos:

- Factor sigma primario  $\sigma_A$ , responsable de la expresión de los genes de mantenimiento, cuyos productos son necesarios para el crecimiento.
- Factor sigma alternativo  $\sigma_B$ , que regula la expresión de muchos genes implicados en funciones celulares<sup>11</sup>.

#### 2.1.2.2 Enfermedades causadas por *S. aureus*

*S. aureus* constituye una de las principales causas de enfermedades adquiridas en la comunidad siendo la etiología del 70-80% de las infecciones supurativas de la piel. A nivel hospitalario es la segunda causa de enfermedades nosocomiales y la primera en cuerpos extraños implantados (catéteres, prótesis, marcapasos, etc.)<sup>6,14</sup> además es la primera causa de brotes de intoxicaciones de origen alimentario en el territorio nacional mexicano<sup>15</sup>.

El crecimiento bacteriano medido mediante cultivo discontinuo, es decir, en donde las bacterias crecerán hasta que un factor de los nutrientes necesarios se agote y limite el

crecimiento <sup>16</sup> pueden identificarse tres fases: de retraso, exponencial y post-exponencial o de mantenimiento, algunos autores consideran una cuarta fase, la de muerte celular.

En la fase de retraso, la bacteria se adapta a las condiciones para iniciar su crecimiento. En la fase exponencial el metabolismo de la bacteria es rápido y eficiente, durante esta fase las bacterias sintetizan proteínas de superficie y proteínas esenciales para el crecimiento, la división celular y la adhesión para asegurar un crecimiento constante; en esta fase causan infección. La fase post-exponencial se caracteriza por envejecimiento bacteriano y porque se detiene el crecimiento, el metabolismo se adapta para sobrevivir a largo plazo. Durante esta fase el “apiñamiento” celular originado por el aumento de la población activa un mecanismo de detección de la densidad llamado quorum sense (QS), dando como resultado la producción de toxinas y exoproteínas por lo que durante esta fase la bacteria es capaz de causar intoxicaciones. Adicionalmente las exoproteínas que son producidas permiten a las bacterias escapar del foco de infección (absceso) durante la fase estacionaria y se diseminen a nuevos sitios, donde el ciclo se repite.

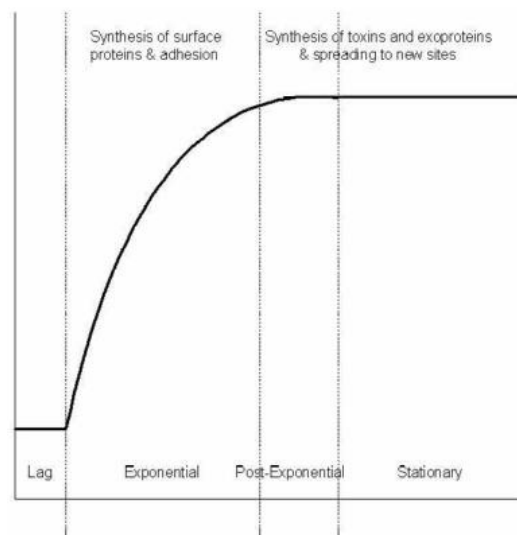


Fig. 1 Modelo de producción de factores de virulencia en infecciones estafilocócicas. En la fase exponencial es capaz de iniciar infección mientras que en la fase post-exponencial causa intoxicaciones. Tomado de la referencia <sup>11</sup>.

Como ya se mencionó, durante estas fases se llevan a cabo la expresión de factores de virulencia que determinan el tipo de enfermedad causada dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria<sup>11</sup> tal como se muestra en la Fig. 1 los factores de virulencia asociados a la superficie bacteriana se expresan preferentemente en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que los factores de secreción (toxinas) son liberados en la fase post-exponencial.

Esta expresión bifásica de los factores de virulencia cumple con la función de organizar el proceso de infección: inicialmente, las adhesinas de superficie reconocerían las estructuras del huésped facilitando la colonización, lo cual sería seguido por la multiplicación del microorganismo y la secreción de toxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxinas) y enzimas (serina proteasas, cisteína proteasas, lipasas)<sup>17</sup>, en la Fig. 2 se muestran los mecanismos mediante los cuales el *S. aureus* causa enfermedad en el huésped.

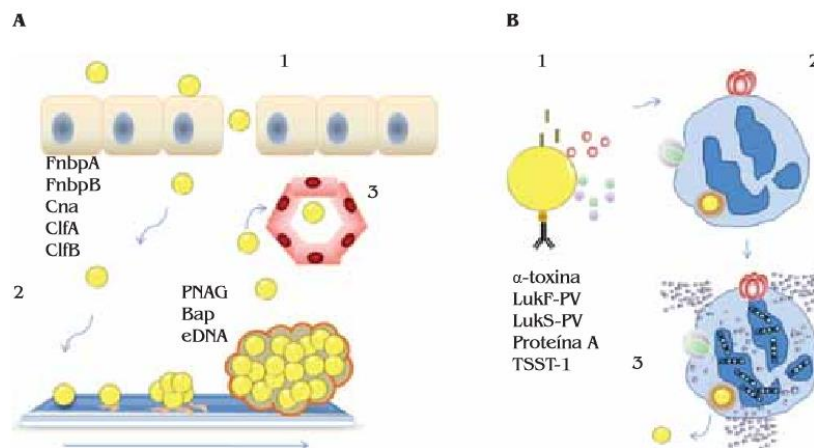


Fig. 2 Mecanismos de daño de *S. aureus*. A) Una herida en epitelio permite la interacción de la bacteria con componentes de la matriz extracelular a través de la participación de diferentes adhesinas (1). Esta asociación favorece la agrupación bacteriana en focos localizados denominados biofilms, con la finalidad de limitar la respuesta inmune del hospedero (2) y para su eventual diseminación a través del torrente sanguíneo. B) *S. aureus* es capaz de limitar la presencia de anticuerpos específicos (1) y de células del sistema inmune (2), mediante la secreción de proteínas formadoras de poros que tienen como función principal provocar la muerte de sus células blanco (3). Tomado de <sup>8</sup>.

Las intoxicaciones se atribuyen a la acción de toxinas, las cuales pueden desencadenar manifestaciones clínicas en ausencia del microorganismo; las toxinas pueden producirse *in vivo* tal como sucede en el síndrome de la piel escaldada o en un vector que la suministra al huésped como en la intoxicación alimentaria estafilocócica.

Las infecciones implican la proliferación bacteriana, la invasión o destrucción de los tejidos del anfitrión y respuestas inflamatorias locales y generalizadas del hospedador en respuesta a estos acontecimientos <sup>2,13</sup>. En la tabla I se observa que la gama de enfermedades causadas a los seres humanos por el *S. aureus* es muy amplia, incluye desde infecciones locales hasta enfermedades sistémicas que ponen en riesgo la vida de los pacientes.

Tabla I. Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i>		
Síndrome tóxico	Síndrome de choque tóxico	
	Intoxicación alimentaria	
	Síndrome de dermatitis exfoliativa o de la piel escaldada SSSS	
Síndrome infeccioso	Bacteremia y sus complicaciones	Septicemia, choque séptico.
		Focos metastásicos de infección (en riñones, articulaciones, huesos, pulmones)
		Endocarditis infecciosa.
	Infecciones en dispositivos	Catéteres o prótesis articulares
	Infecciones invasoras extra hospitalarias por MRSA	Fascitis necrotizante
		Síndrome de Waterhouse-Friderichsen
		Neumonía necrosante
		Púrpura fulminante
	Infecciones de tejidos musculoesqueléticos	Artritis séptica
		Osteomielitis
		Piomiositis
		Absceso del psoas
	Infecciones de vías respiratorias	Neumonía por respiradores
		Émbolos pulmonares sépticos

		Neumonía post-viral
		Empiema
	Infecciones de piel y tejidos blandos	Foliculitis
		Forunculosis, ántrax
		Celulitis
		Impétigo
		Mastitis
		Infecciones de incisiones quirúrgicas
		Hidradenitis supurativa
Tomado de <sup>2,13</sup> .		

#### 2.1.2.2.1 Intoxicaciones

Después de la colonización de los tejidos del huésped, en la fase post-logarítmica se inicia la expresión de toxinas tales como enterotoxina A-E<sup>18</sup>, toxina 1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxinas exfoliativas A y B, leucocidina de Pantón Valentine (LPV), catalasa, coagulasas así como hialuronidasas<sup>19</sup> (las cuales se describirán a detalle más adelante) y exoenzimas. Estas a su vez, causan inflamación que deriva en la formación de poros y muerte celular que conducen a la degradación de los tejidos del huésped, invasión tisular y la metástasis a otros sitios<sup>20</sup>.

La ingestión de la enterotoxina B producida por *S. aureus* en alimentos contaminados puede causar intoxicación alimentaria, la presentación de los síntomas (nauseas vómito y diarrea) por lo general se presentan entre 1 a 6 h posteriores a la ingesta del alimento contaminado. Sin embargo, debido a que la enterotoxina B es termoestable pudiendo resistir la ebullición si se encuentra en un medio acuoso, esta toxina es activa por inhalación por lo que, pasadas de 3 a 12 h se presenta un cuadro clínico con inicio súbito de fiebre, cefalea, escalofrío, mialgias y tos no productiva, en los casos más severos puede presentarse disnea y dolor retroesternal. La dosis que por inhalación produce signos severos es de 0.4 ng/kg de peso<sup>18</sup>.



La TSST-1 es la toxina responsable del síndrome de choque tóxico (TSS) y sólo es causada por cepas portadoras del gen TSST-1. Las infecciones por TSS se asocian comúnmente con las mujeres que están menstruando, particularmente aquellas que usan tampones. Las toxinas exfoliativas están asociadas con el síndrome de piel escaldada estafilocócica (SSS) el cual se compone de tres entidades que dañan la epidermis: la necrólisis epidérmica tóxica, el eritema escarlatiniforme y el impétigo bulboso<sup>11</sup>.

#### *2.1.2.2 Infecciones estafilocócicas*

Las infecciones estafilocócicas tienen un período de incubación sumamente variable. Específicamente las causadas por *S. aureus* son conocidas por la formación de abscesos en focos de infección locales y metastásicos siendo el absceso piógeno la característica histológica de la infección causada<sup>2</sup>, la cual se caracteriza por desencadenar una reacción inflamatoria, que al principio ocasiona una intensa respuesta por parte de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y una infiltración posterior de macrófagos y fibroblastos. Si la respuesta inmune del huésped no frena la infección, ésta es capaz de propagarse a los tejidos vecinos o al torrente circulatorio<sup>2,8</sup>.

La transmisión de *S. aureus* puede ser causada a través de contaminación de tejido traumatizado (escoriaciones, heridas, quemaduras) o por introducción de objetos extraños (catéteres, prótesis, etc.). El mecanismo de transmisión más importante es el contacto directo siendo las principales fuentes de infección las personas infectadas, menos frecuente los portadores asintomáticos, manos y fómites contaminados<sup>9</sup>.

#### *2.1.3 Patogenia y factores de virulencia del S. aureus*

El *S. aureus* posee diversos elementos que le proporcionan su extrema virulencia, tales como la pared celular, proteínas de membrana, enzimas y toxinas. Tiene la capacidad de invadir el interior de las células fagocíticas y no fagocíticas, y de permanecer viable, por lo que podrá producir infecciones a distancia del foco inicial u ocasionar recidiva de las infecciones

estafilocócicas<sup>21</sup>. Las bacterias regulan factores de virulencia, producción de antibióticos y formación de biofilm en respuesta a la señalización célula-célula. Así mismo regulan la densidad de la población, este sistema es conocido como percepción de quórum (QS). En estafilococos, el sistema QS es regulado por el agr (gene accesorio regulador) el cual al detectar aumento de la población bacteriana sobrerregula la expresión de toxinas y la degradación de exoenzimas como las proteasas al tiempo que regula a la baja la expresión de proteínas de adhesión (Ver Fig. 3)<sup>22-24</sup>.

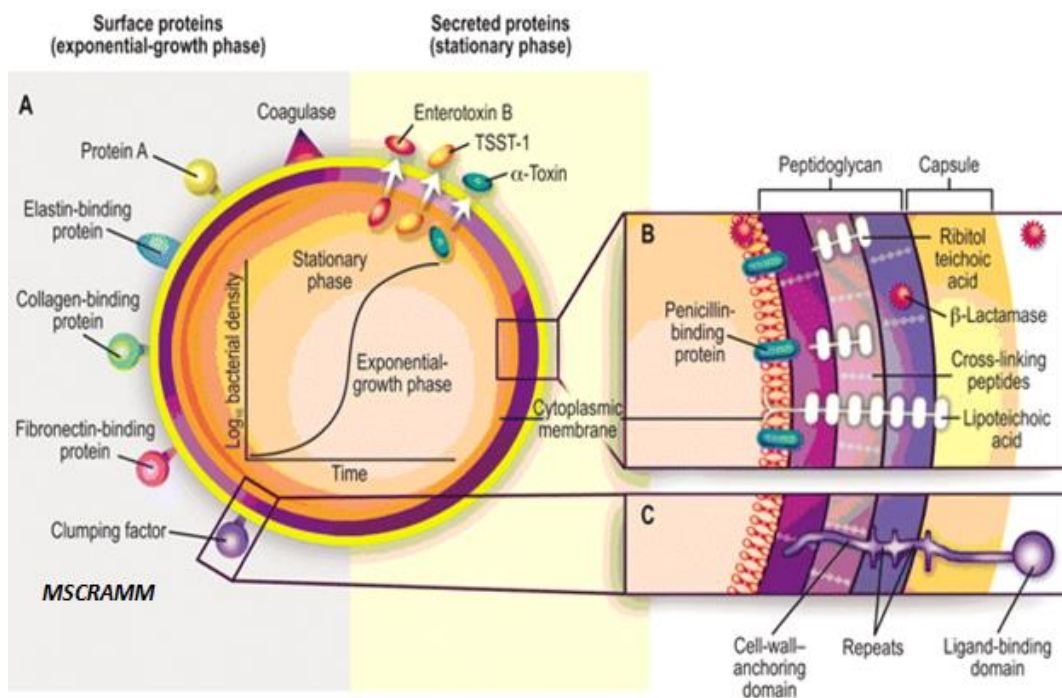


Fig.3 Factores de virulencia de *S. aureus* A. izquierda: Proteínas secretadas durante la fase exponencial asociadas principalmente a adhesión, Derecha toxinas secretadas durante la fase estacionaria. B Componentes de la pared celular: peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, ácido ribitol teicoico. C Sección transversal del factor de aglutinación. Tomado de<sup>23</sup>.

### 2.1.3.1 Moléculas de adhesión

La producción de adhesinas estafilocócicas permite la unión eficaz para la colonización de los tejidos del huésped.

*S. aureus* posee moléculas adhesivas de matriz que reconocen componentes de superficie microbiana (MSCRAM Ms, por sus siglas en inglés) que median la adherencia a los tejidos del huésped e inician la colonización, que podrá conducir al establecimiento de una infección<sup>8,9</sup>. Ejemplo de ello son las proteínas A y B de unión a fibronectina (FnbpA y FnbpB), cuya función es favorecer la unión de la bacteria a los componentes de la matriz extracelular como la fibronectina.

La proteína A es característica de este microorganismo, se encuentra asociada a la pared celular y su función más importante es la de llevar a cabo el reconocimiento y la unión de la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (IgG) disminuyendo la opsonización<sup>24,25</sup>. Dicha proteína es capaz de unirse al factor Von Willebrand (una proteína presente en el sitio de daño a endotelios) por lo que puede tener un papel importante en la adherencia y en la inducción de enfermedad endovascular<sup>24</sup>.

*S. aureus* también posee la capacidad de unirse a superficies de biomateriales y subsecuentemente de formar biofilm<sup>8</sup>.

#### 2.1.3.2 Formación de biofilm o biopelícula

Un biofilm puede ser definido como una comunidad sésil derivada de microorganismos. Está formado por células que están adheridas a un sustrato, interfase o unidas unas con otras, impregnadas en una sustancia polimérica de matriz extracelular y que exhibe fenotipos alterados respecto al crecimiento, expresión de genes y producción de proteínas<sup>26</sup>.

Algunas cepas de *S. aureus* utilizan un exopolímero de N-acetylglucosamine (PNAG), también referido como Adhesina Intracelular de Polisacárido (PIA, por sus siglas en inglés) para formar biofilms<sup>8</sup> que dificulta la fagocitosis y limita la interacción con los antimicrobianos administrados. Las bacterias del interior del biofilm toman como mecanismo de supervivencia formas fenotípicas con metabolismo mínimos (durmientes) las cuales expresan una mayor tolerancia a los antibióticos<sup>21</sup>.

El operón Ica codifica para la maquinaria que sintetiza el PNAG; sin embargo, no todas las cepas poseen dicho elemento genético. Existe una vía independiente de este operón para formar el biofilm en el que *S. aureus* expresa una variedad de adhesinas que le permiten unirse y colonizar un gran número de superficies diferentes<sup>27</sup>.

Se ha descrito la presencia de un grupo de proteínas denominadas BAP (proteínas asociadas a biofilm) las cuales se encuentran ancladas en la pared celular y que favorecen la unión de la bacteria al biofilm probablemente interactuando con otras proteínas en la superficie de sus células vecinas. Además de los exopolisacáridos y las proteínas, los biofilms poseen ADN extracelular (eADN) el cual proporciona estabilidad estructural al biofilm<sup>8,24-26</sup>.

### 2.1.3.3 Producción de toxinas

Una de las características importantes del *S. aureus* es su capacidad para secretar toxinas que dañan las membranas de las células del huésped. Las toxinas están clasificadas con base en los efectos biológicos que producen en las células: citotoxinas, tóxina exfoliativa, enterotoxinas y toxinas del choque tóxico.

- Citotoxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -hemolisina y leucocidina de PV)

Actúan mediante un mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos. Las toxinas citolíticas forman poros  $\beta$ -barril en las membranas citoplasmáticas, provocando la liberación del contenido y la muerte de la célula<sup>8,19</sup>.

La  $\alpha$ -hemolisina se encuentra codificada por el gen Hla y, una vez liberada al medio, se asocia con su célula blanco, ya sea por un mecanismo dependiente de receptores específicos o favorecidos por la presencia de colesterol. Es citotóxica para una gran variedad de células eucariotas, en particular células del sistema inmune por lo que es considerado un importante factor de virulencia<sup>6,8</sup>.

El gen de PVL codifica para la liberación de una citotoxina responsable de la necrosis del tejido y la destrucción de leucocitos. La presencia de este gen se ha asociado con infecciones de mayor gravedad<sup>1,19</sup>. La leucocidina PVL es una citolisina de dos componentes, debido a que depende de que dos proteínas sean secretadas por *S. aureus*: las proteínas LukF-PV y LukS-PV. Estas proteínas se liberan como monómeros y se insertan en la membrana plasmática del hospedero en una proporción estequiométrica 1:1, lo que conduce a la formación de un poro, la presencia de este poro tiene como consecuencia la liberación de iones y finalmente la muerte de la célula<sup>27</sup>.

- Toxinas exfoliativas (ETA, ETB y ETD)

Son proteasas que tienen la capacidad de romper la desmogleina-1, la cual normalmente mantiene unidos los estratos granulosos y espinosos de la piel ocasionando el desprendimiento de la epidermis<sup>28,29</sup>.

- Enterotoxinas (A, B, C, D, E, G, Q)

Son súper antígenos que estimulan la proliferación de células T y la liberación de citocinas: estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo<sup>6</sup>. Estas proteínas son resistentes a la desnaturalización por calor y al efecto de proteasas. Tienen la capacidad para reaccionar con moléculas del MHCII (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) en las células presentadoras de antígenos con los receptores de las células T, formando un complejo trimolecular<sup>24</sup>, la formación del complejo induce intensa proliferación de células T de una manera independiente de antígeno, lo que resulta en una producción y liberación masiva de citosinas que favorecen el daño epitelial<sup>30</sup>.

- Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1

Actúa como un superantígeno que estimula la proliferación de células T y la liberación de citocinas, produce extravasación o la destrucción de las células endoteliales. Se considera que la función primaria de los superantígenos se enfoca en debilitar el sistema inmune del hospedero lo suficiente para que el patógeno pueda propagarse y conducir a la progresión de la enfermedad<sup>27,31</sup>.

### 2.1.3.4 Evasi3n de la respuesta inmune y persistencia intracelular

En una respuesta inmune adecuada, cuando *S. aureus* o cualquier otra bacteria entra en el citoplasma de los neutr3filos se encuentran con un complejo de prote3nas encargadas de la destrucci3n de las bacterias, entre ellas la calprotectina, que inhibe su crecimiento a trav3s de la quelaci3n de  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ . Los neutr3filos liberan p3ptidos antimicrobianos, proteasas y la cromatina a trav3s de trampas extracelulares de neutr3filos (TNE) que inducen la captura y muerte del *S. aureus*<sup>25</sup>

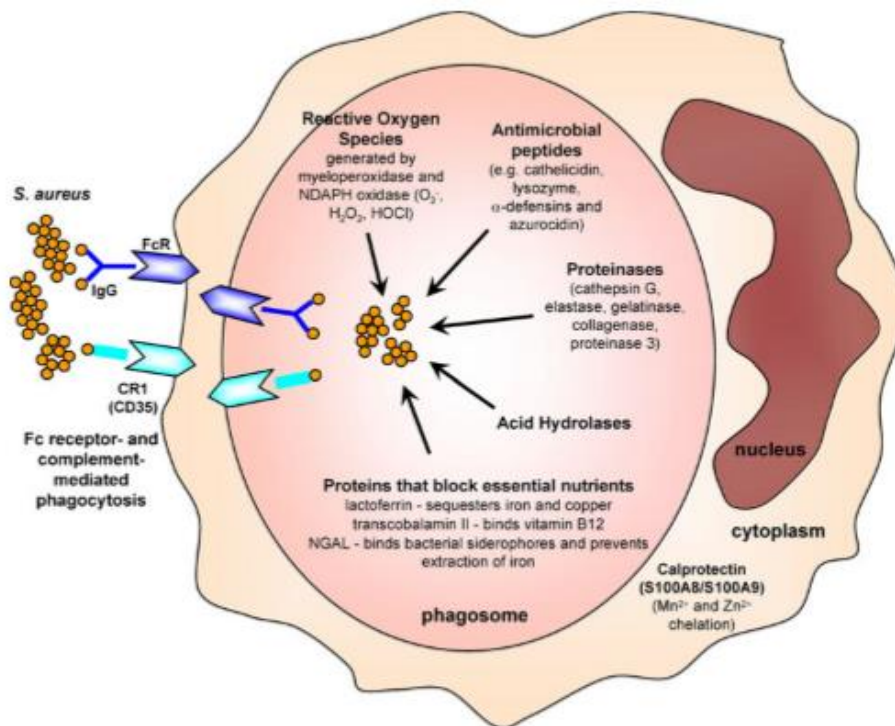


Fig. 4 Mecanismos antimicrobianos de neutr3filos contra *S. aureus*. Los neutr3filos fagocitan las bacterias opsonizadas mediante uniones con Fc y receptores del complemento en los fagosomas. Dentro de los fagosomas, los neutr3filos poseen m3ltiples mecanismos distintos para promover la eliminaci3n de bacterias. La mieloperoxidasa y NADPH oxidasa generan radicales libres y especies reactivas de ox3geno (como  $O_2$ ,  $H_2O_2$ , y  $HOCl$ ) que pueden matar directamente a las bacterias, y tambi3n producir una carga en la membrana del fagosoma para inducir la muerte enzim3tica. Adem3s posee p3ptidos y prote3nas con propiedades antimicrobianas tales como: catelicidina, lisozima,  $\alpha$ -defensinas, azurocidina, catepsina G, calprotectina. Tomado de <sup>25</sup>.

Esta bacteria ha desarrollado mecanismos de evasión muy eficientes que van desde la modificación de su superficie para evitar su reconocimiento hasta la liberación de toxinas<sup>24</sup> que inducen la destrucción de los neutrófilos o inhiben su actividad. Evitan la activación de la cascada del complemento, interrumpen la fagocitosis, limitan la eficacia de los péptidos antimicrobianos, e interfieren con la función de las células T<sup>20,32</sup> (ver Fig. 4).

Entre los factores que produce *S. aureus* capaces de bloquear la quimiotaxis se encuentra la proteína de estafilococos inhibidora de quimiotaxis (CHIPS) y la proteína de adhesión extracelular (EAP)<sup>8</sup>.

La CHIPS interactúa con el C5aR y el receptor del péptido formilado para bloquear la quimiotaxis de neutrófilos. La proteína de adhesión extracelular (EAP), que se une a ICAM1 y bloquea la adhesión de neutrófilos al endotelio y la posterior diapédesis y extravasación<sup>25</sup>.

Los microbios se interiorizan en los fagosomas, los cuales se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas en donde los microbios mueren por la acción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno así como por la acción de enzimas proteolíticas tales como la elastasa, la catepsina G. Así mismo, las proteínas como la gelatinasa, colagenasa y ácido hidrolasas degradan componentes bacterianos. Los neutrófilos también expresan las proteínas que secuestran nutrientes esenciales a partir de bacterias para limitar su crecimiento como la lactoferrina (que secuestra hierro y cobre), transcobalamina II (que se une a vitamina B12), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL; que se une a sideróforos bacterianos impidiendo la extracción de hierro) y calprotectina, que secuestra  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  del medio<sup>25</sup>.

*S. aureus* secreta la proteína de unión extracelular a fibrinógeno (EFB) que se une a las proteínas plasmáticas (fibrinógeno y factores del complemento). La unión se lleva a cabo utilizando dominios separados: el EFB N-terminal se une al fibrinógeno, mientras que el EFB C-terminal se une al fragmento b del C3 del complemento.

Cuando el complemento ha opsonizado al *S. aureus*, el EFB que secreta, atrae fibrinógeno el cual se une en su dominio N y del lado contrario se une a los anticuerpos unidos a su superficie, generando algo parecido a un escudo que protege a C3b y a los anticuerpos unidos a su superficie evitando así el reconocimiento por los factores fagocíticos (Ver Fig. 5)<sup>32</sup>. El 85% de las cepas de *S. aureus* expresan EFB por lo que en la actualidad representa un importante blanco en la creación de una vacuna.

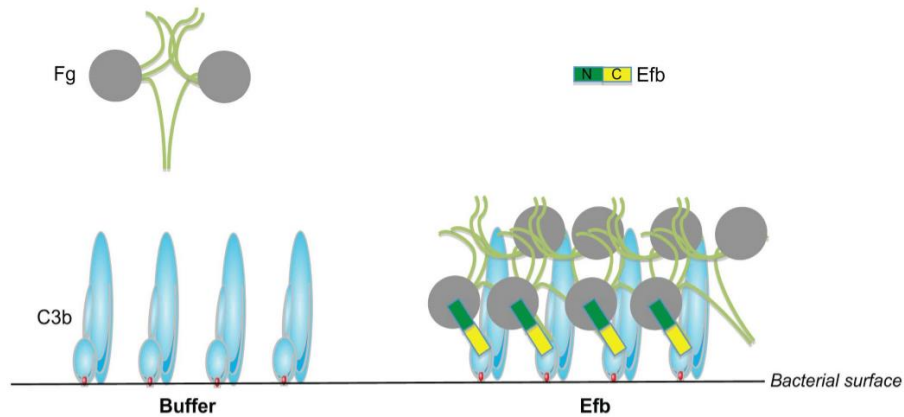


Fig. 5 Mecanismo propuesto para explicar la inhibición de la fagocitosis por Efb. A la izquierda, se muestra la superficie bacteriana unida a C3b. En ausencia de EFB el fibrinógeno (Fg) se encuentra libre. A la derecha *S. aureus* secreta Efb el cual se une a C3b (que a su vez se encuentra unida a la superficie bacteriana) a través de su dominio C (de color amarillo) y se une al fibrinógeno a través de su dominio N (verde). De esta manera, *S. aureus* queda protegida con una cubierta de fibrinógeno que impide la unión de los receptores fagocíticos a opsoninas importantes como C3b e IgG. Tomado de <sup>32</sup>.

*S. aureus* no sólo penetra, sino también sobrevive en el interior de diversos tipos de células del hospedero, incluyendo fagocitos y células no fagocíticas. Esta capacidad de persistir en el interior de las células juega un papel importante en la patogénesis de las infecciones producidas por este microorganismo<sup>24</sup> especialmente en las recidivas.

#### 2.1.4 Características genéticas de *S. aureus*

El genoma de *S. aureus* es circular, compuesto de aproximadamente 2.8 kb, con una concentración baja de G-C (33%), presenta homología del 50% de las proteínas codificadas con las del *Bacillus subtilis* por lo que se sugiere que tienen un ancestro común<sup>33</sup>. La



mayoría de los genes homólogos son un grupo de genes conocidos como *housekeeping* que son necesarios para el crecimiento y división de la bacteria, además presenta elementos móviles (moviloma): plásmidos conjugativos (elementos genéticos autorreplicativos extracromosomales), secuencias de inserción (IS) y transposones (Tn) que contienen factores de virulencia y resistencia a diversos antibióticos<sup>34</sup>. El análisis del genoma de *S. aureus* demostró que contiene varias islas de patogenicidad (SaPIs), las cuales varían en tamaño y son un importante factor de virulencia.

#### 2.1.4.1 Transposones

Los transposones son fragmentos del genoma que pueden cambiar de forma autónoma su ubicación dentro del mismo genoma, por lo que son fuente de variabilidad genética y en bacterias pueden transportar uno o varios marcadores de resistencia antibiótica como los que se mencionan a continuación:

- Tn551: codificado por el gen *ermB* confiere resistencia a eritromicina.
- Tn4001: resistencia a kanamicina, tobramicina y gentamicina.
- Tn4003: resistencia a trimetoprim.
- Tn552: contiene el operon *bla* el cual resistencia a la penicilina a través de la producción de penicilinasas.
- Tn554: resistencia a meticilina.

#### 2.1.4.2 Plásmidos conjugativos

Los plásmidos conjugativos son secciones del ADN extracromosómico, capaces de replicarse y transmitirse con independencia del ADN cromosómico<sup>35</sup>. Los que se conocen hasta el momento tienen funciones de transferencia debido a que disponen de genes y proteínas que les permiten transmitir información genética<sup>16</sup>. Frecuentemente confieren características que

representan ventajas en el crecimiento de la célula, representando una característica de selección positiva<sup>36</sup>.

Los plásmidos R, confieren resistencia a antibióticos, son transferibles a otras bacterias por contacto. Frecuentemente la resistencia antibiótica determinada por plásmidos se debe a modificaciones químicas catalizadas enzimáticamente. La estreptomycinina es inactivada por adenilación, el cloranfenicol es acetilado, la kanamicina y la neomicina son fosforiladas y acetiladas, y la penicilina se inactiva por una penicilinasas.

Los genes *Ira* permiten transmisión genética por contacto directo. Codifican para la formación de pili sexuales (que sirven para establecer contacto entre las células conjugantes) y para la síntesis de proteínas necesarias en la estabilización de las células conjugantes, la transferencia de DNA, su regulación y para ayudar a otros plásmidos. La transferencia de DNA se completa en cuatro fases<sup>16</sup> como se muestra en la Fig. 6.

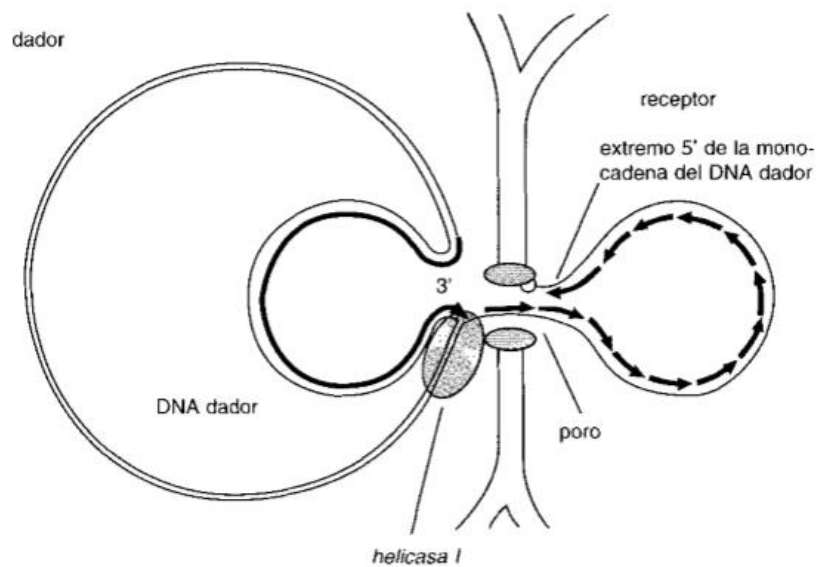


Fig. 6 Modelo de transferencia del DNA durante la conjugación. A la izquierda se muestra el “dador” el cual inicia la transferencia mediante la formación de un pili. A la derecha se muestra el “receptor”, con flechas cortas se muestra la transferencia del plásmido con el extremo 5’ por delante. Tomado de <sup>16</sup>.

Fase I. Una célula sintetiza un pili especial iniciando el proceso de conjugación para transferir el plásmido, el cual se replica produciendo un fragmento monocatenario en una cadena en el origen de transferencia-replicación (OriT, distinto del origen de replicación vegetativo).

Fase II. La helicasa I abre la doble cadena de ADN partiendo del OriT, desenrollándola en sentido 5'-3'.

Fase III. Se forma un poro en la membrana plasmática de ambas células permitiendo que se transfiera el ADN monocatenario a la célula receptora con el extremo 5' por delante.

Fase IV. Se sintetiza la cadena complementaria en ambas células. En el “dador” por síntesis continua a partir del extremo 3' y en el receptor por síntesis discontinua.

La mayoría de los plásmidos tiene un limitado número de huéspedes, sin embargo, el plásmido pCI94 de *S. aureus* tiene un amplio espectro de huéspedes, entre los que se encuentran *B. subtilis*, *E. Coli* y *Saccaromyces cervisiae*. No están definidas con claridad las propiedades que determinan que un plásmido tenga un espectro amplio de huéspedes, pero en se sabe que estos plásmidos codifican para varias funciones de replicación, que probablemente les hacen independientes de las actividades del huésped<sup>16</sup>.

#### 2.1.5 Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La aparición de la resistencia a antibióticos es inevitable; después del uso de un antimicrobiano por tiempo prolongado, los microorganismos más aptos sobreviven gracias a la adquisición de los mecanismos de resistencia (ya sea por alguna mutación o por aceptar material genético de otros microorganismos similares) que les permiten evadir la acción del medicamento<sup>37</sup>. La resistencia a antibióticos se pueden clasificar como:

- a) Resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o  $\beta$ -lactamasas)
- b) Resistencia intrínseca
- c) Modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBPs).

#### 2.1.5.1 Resistencia mediada por enzimas (penicilinasas o $\beta$ -lactamasas)

La presencia de estas enzimas inactiva al antibiótico. Ejemplo de ello es la resistencia a la penicilina la cual se debe en gran medida a la síntesis bacteriana de  $\beta$ -lactamasa (codificada por el gen *blaZ*) conferida por una penicilinasas plasmídica inducible. La  $\beta$ -lactamasa descompone vía enzimática el anillo  $\beta$ -lactámico de la penicilina G con lo que desactiva el fármaco antes de que interaccione con las proteínas de unión a la penicilina<sup>2</sup>, también es capaz de inactivar carboxipenicilinas y ureidopenicilinas.

El mecanismo de inducción consiste en que la penicilina y sus análogos favorecen la producción de una proteína antirrepresora que, al inhibir el gen represor de la betalactamasa (la proteína *BlaI* reprime la transcripción del gen *BlaZ* y de *blaR1-blaI*<sup>34</sup>), aumenta la síntesis de penicilinasas.

Esta penicilinasas es inactivada por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), en ausencia de penicilina, la  $\beta$ -lactamasa se expresa a bajo nivel<sup>28,34</sup>.

La presión ejercida por el amplio uso de la penicilina hizo que las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se hicieran más prevalentes<sup>6,7,9,27,32</sup>. El incremento de la resistencia a penicilina en *S. aureus*, no se debió sólo a la selección de unos pocos microorganismos mutantes que eran capaces de producir  $\beta$ -lactamasas sino también a que genes que codifican su producción se encuentran en plásmidos que pueden ser transferidos por transducción *in vivo*<sup>34</sup>.

#### 2.1.5.2 Resistencia intrínseca

Este tipo de resistencia no es debida a la inactivación de drogas, ejemplo de ello es la resistencia a meticilina.

La resistencia a la meticilina se desarrolla una vez que *S. aureus* adquiere un elemento genético móvil grande: el casete cromosomal estafilocócico *mec* (SCC*mec*). Dentro de este

casete, los genes CCRA y CCRB median movilización y el gen *mecA* media la resistencia  $\beta$ -lactamasas. Específicamente, *mecA* codifica para una proteína de unión a penicilina con actividad transpeptidasa de muy baja afinidad por los betalactámicos: PBP2a<sup>6,38</sup>.

Las PBPs son enzimas que catalizan las reacciones de transpeptidación (para realizar los enlaces cruzados en la formación de las cadenas que constituyen al peptidoglicano) en la síntesis de la pared celular. *S. aureus* produce al menos cuatro PBPs (PBP1-PBP4), las cuales son inhibidas por los  $\beta$ -lactámicos<sup>34</sup>. Cuando la proteína PBP2a se encuentra en la superficie de la bacteria permite que, en presencia de la meticilina (que inhibe las PBP normales) continúe la síntesis de la pared celular al permitir continuar con el proceso de transpeptidación al tiempo que bloquea la unión de cualquier antibiótico  $\beta$ -lactámico a su sitio activo<sup>39</sup>.

La resistencia a meticilina en *Staphylococcus spp.* es sinónimo de la resistencia a toda clase de antibióticos  $\beta$ -lactámicos<sup>7,19</sup> incluyendo penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Además se asocia a la resistencia múltiple a antibacterianos no relacionados estructuralmente como tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, lincosamidas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos<sup>37</sup>.

No se ha informado el elemento SCCmec en bacterias de otros géneros y su origen es aún desconocido al igual que su mecanismo de transferencia pero está demostrado que ocurre en forma horizontal entre especies de *Staphylococcus*<sup>40</sup>. Ambos mecanismos de resistencia no son excluyentes por lo que en una misma cepa suelen presentarse más de uno de los mecanismos de resistencia.

Cabe mencionar que en ausencia de *mecA*, la resistencia a oxacilina en *S. aureus* puede deberse a la hiperproducción de  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos, estas se conocen como cepas con resistencia borderline (Borderline resistant *Staphylococcus aureus*-BORSA) resistencia fronteriza o resistencia de bajo nivel<sup>38</sup>.

### 2.1.5.3 Modificación de las PBPs

Corresponde a una modificación mínima de las PBPs de tal modo que los antibióticos no tengan acceso a la cadena de peptidoglicano, otra alternativa es la pérdida de las PBPs que muestren mayor afinidad a los  $\beta$ -lactámicos. Estas cepas no producen  $\beta$ -lactamasas pero presentan baja afinidad por los antibióticos<sup>34</sup>.

Estrictamente la modificación de PBP2a forma parte de este grupo, sin embargo en este grupo sólo se muestran las pequeñas modificaciones estructurales realizadas en las PBPs normales.

### 2.1.6 Tratamiento para infecciones causadas por *S. aureus*

El tratamiento de las enfermedades causadas por *S. aureus* dependerá de la cepa causante de la enfermedad (SASM o SARM) la gravedad, las enfermedades concomitantes y en caso de ser infecciones de la piel el sitio y extensión de la infección. Es necesario determinar el antibiótico de elección (asociaciones farmacológicas), la duración del tratamiento o la necesidad de emplear medidas adicionales a la antibioterapia (retirada del catéter, desbridamiento o drenaje del foco primario o metastásico, entre otras)<sup>2,12</sup>. En la Fig. 7 se muestra un algoritmo para el tratamiento de las infecciones causadas por *S. aureus*.

Los principales factores de riesgo de colonización por SARM son:

- Ingreso hospitalario en el último año o procedencia de residencia geriátrica o centro sociosanitario en un área que se sabe endémica de SARM
- Tratamiento con una quinolona en los 6 meses previos
- Insuficiencia renal crónica en tratamiento con diálisis
- Edad >65 años

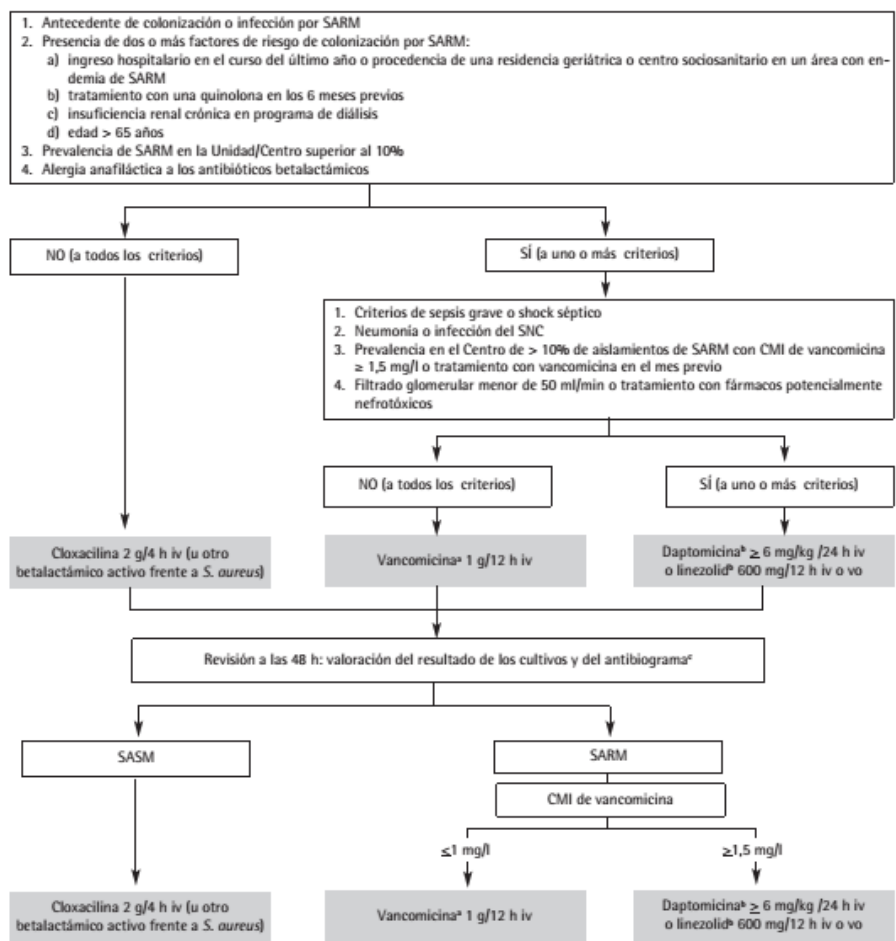


Fig.7 Algoritmo para la elección de tratamiento antibiótico empírico ante la sospecha de infecciones causadas por SARM. SNC, Sistema nervioso central. iv, intravenoso. vo, vía oral. CMI Concentración mínima inhibitoria. Tomado de <sup>12</sup>.

### 2.1.6.1 Antibioticoterapia: sus ventajas y desventajas

Desde la introducción de la penicilina, los antibióticos son la mejor opción de tratamiento ante la presencia de enfermedades infecciosas<sup>37</sup>. Sin embargo, su uso indiscriminado ha derivado en un aumento de la resistencia antibiótica en diversos microorganismos, de tal modo que ya en el año 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) apuntaba hacia el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, definiéndolo como: “Un problema complejo, impulsado por múltiples factores que exigía la búsqueda de respuestas multisectoriales” <sup>4</sup>.

Se sabe que la resistencia a los antibióticos es un fenómeno evolutivo esperado, pero éste fenómeno se ha acelerado debido al uso indiscriminado de los antibióticos<sup>33</sup> derivando en un aumento de dicha resistencia encontrando en la actualidad reportes de bacterias multi-resistentes y panresistentes<sup>41</sup>. Por lo que se hace menester, a nivel clínico solicitar un estudio de cultivo bacteriológico ante la sospecha de infecciones para así, ofrecer el tratamiento antibiótico específico al que la bacteria aislada presentó sensibilidad<sup>37</sup>; pero esta conducta a pesar de ser la más adecuada es poco eficiente debido a que tiempo requerido para obtener el resultado de un cultivo retrasa el tratamiento.

Hasta la década de 1970, se desarrollaron muchos fármacos antibacterianos a los que los patógenos más comunes eran inicialmente susceptibles. Las últimas clases nuevas de fármacos antibacterianos fueron descubiertas durante los años ochenta y desde entonces sólo se desarrollaron compuestos producto de las modificaciones de los antibióticos iniciales<sup>42</sup>. Sin embargo, en la actualidad el desarrollo de nuevos antibióticos se encuentra estancado y la velocidad con la que las bacterias evolucionan los ha rebasado por mucho, de tal modo que se habla del fin de la era de los antibióticos<sup>33,43</sup>.

Dependiendo de la cepa aislada de *S. aureus* se sugiere el uso de clindamicina, nafcilina, dicloxacilina, cefalexina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefazolina, cefalotina, cefuroxima, ciprofloxacina, trimetropima-sulfametoxazol, teicoplanina, vancomicina. Se suelen utilizar terapias combinadas de rifampicina más fluoroquinolonas (ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino)<sup>12,37,44</sup>.

Por último cabe mencionar que, en el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* debe tenerse en cuenta que el empleo de ciertos antibióticos favorecen el aumento de algunos factores de virulencia tales como la síntesis de toxinas estafilocócicas, y la expresión de adhesinas. La presencia de determinados antibióticos como la nafcilina y las fluoroquinolonas aumentan la expresión de  $\alpha$ -toxina, mientras que la aplicación de concentraciones sub-inhedoras de ciprofloxacina a cepas de *S. aureus* resistentes a fluoroquinolonas incrementa la expresión de adhesinas de unión a fibronectina<sup>8,45</sup>.



En México, un estudio realizado con cepas SARM arrojó como resultados que los tratamientos combinados tales como: dicloxacilina más amikacina y, cefalotina más amikacina presentaron sinergismo total o parcial en 90 y 100% de las cepas estudiadas. La sinergia de la combinación de vancomicina más amikacina solamente se encontró para una cepa, y para el 40% de las cepas fue indiferente<sup>37</sup>. Debe considerarse entonces el uso de terapia combinada antes de iniciar el tratamiento con antibióticos de segunda elección.

#### *2.1.6.1.1 Vancomicina como fármaco de elección en el tratamiento de infecciones por SARM*

La vancomicina es un antibiótico bactericida glicopeptídico obtenido de la *Nocardia orientalis*, es eficaz sólo contra bacterias gram-positivas. Su mecanismo de acción es dual inhibiendo tanto la síntesis de la pared bacteriana como la síntesis de ARN bacteriano<sup>21</sup>. Debido a este mecanismo es muy efectivo su uso en el tratamiento de infecciones cuando la bacteria se encuentra en fase replicativa, sin embargo, presenta escasa actividad para la erradicación de biofilm.

Aunque la vancomicina ha sido utilizada desde 1956, se mantiene como antibiótico de reserva para los casos en que las bacterias muestran resistencias a otros antibióticos o cuando se encuentra contraindicado el uso de  $\beta$ -lactámicos<sup>12</sup>, por lo que este antibiótico constituye el fármaco de preferencia para el manejo de infecciones por SARM<sup>5</sup>.

Desde 1996 se tiene registro de una cepa con sensibilidad reducida a vancomicina (SAIV *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina)<sup>19</sup> y en el 2002 se reportó la primera cepa resistente a vancomicina (VRSA)<sup>37</sup>. No se ha determinado el tratamiento óptimo para estas cepas, pero se sabe que las cepas con sensibilidad reducida o intermedia son sensibles a los fármacos alternativos como linezolid o daptomicina<sup>19</sup>.

#### *2.1.6.1.1.1 Farmacocinética de Vancomicina*

Su administración es por vía intravenosa debido a que la absorción oral es muy baja para que el fármaco alcance niveles en el plasma para ejercer efectos bactericidas a nivel sistémico. Su uso por vía oral sólo es útil en tratamiento de infecciones del tracto digestivo como la colitis pseudomembranosa.

Con un volumen de distribución aproximado de 0.62-0.8 L/kg se distribuye por la mayor parte de los tejidos corporales, incluyendo el líquido pericárdico, pleural, ascítico, y sinovial, sin embargo, no atraviesa la barrera hematoencefálica por lo que no es útil en el tratamiento de meningitis<sup>46</sup>.

Se une en 55% a las proteínas de plasma, cuando la función renal está conservada tiene una semivida de 4-6 horas la cual aumenta en ancianos y en pacientes que tienen la función renal disminuida llegando hasta las 146 horas. Sólo una pequeña porción se metaboliza en hígado, el resto no se metaboliza y su excreción es mayormente por filtración glomerular en 80% y el resto es por las heces.

#### Reacciones adversas

Las principales son la nefrotoxicidad y ototoxicidad. Su uso debe estar bajo estrecha vigilancia sobre todo en paciente con insuficiencia renal ya que aumenta el riesgo de ototoxicidad si se administra en combinación con salicilatos, furosemida, paromomicina o antibióticos aminoglucosidos.

La vancomicina inhibe la liberación de acetilcolina en placa neuromotora por lo que puede aumentar el bloqueo neuromuscular si se administra con miorrelajantes no despolarizantes, el efecto aditivo puede derivar en parálisis respiratoria. Puede inducir la liberación de histamina y producir reacciones anafilácticas además de flebitis, leucopenia y trombocitopenia.

Aumenta el riesgo de acidosis láctica debido a que compite con la metformina y disminuye su excreción renal. La vancomicina disminuye la excreción renal de metformina al competir

en los sistemas de transporte tubulares renales por lo que aumenta el riesgo de acidosis láctica.

Su administración con AINES como el ketorolaco o la indometacina aumenta la semivida de la vancomicina por interacción de tipo farmacocinético aumentando el riesgo de presentar reacciones adversas<sup>47</sup>.

#### *2.1.6.1.2 Desventajas del uso de Vancomicina*

Una de las más importantes desventajas es su vía de administración, como ya se mencionó con anterioridad es vía intravenosa por lo que su uso debe estar estrechamente vigilado toda vez que requiere acceso venoso y por lo tanto administración por personal calificado.

La vancomicina ha sido el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones causadas por SARM, llegando incluso al uso indiscriminado.

Se observó que el uso de vancomicina en el tratamiento de la infección debida a *S. aureus* sensible a meticilina (SASM), la mortalidad atribuible, la duración de la bacteriemia y la frecuencia de las recaídas son significativamente superiores a las observadas con el empleo de un betalactámico. El principal inconveniente del tratamiento con vancomicina es su potencial nefrotoxicidad motivo por el cual el tratamiento siempre debe ser estrechamente vigilado solicitando pruebas de función renal sobre todo a pacientes tratados altas dosis (>4 g/día), la nefrotoxicidad suele presentarse, en la mayoría de casos, a partir del 10-12º día de tratamiento<sup>12</sup>.

#### *2.1.7 Campo electromagnético (CEM)*

Se denomina campo a una zona del espacio que tiene la propiedad de que en él se manifieste un fenómeno físico<sup>48</sup>.

El campo electromagnético es una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, que se propagan a través del espacio transportando energía de un lugar a otro y puede manifestarse como radiación, luz visible, rayos X o rayos gamma<sup>49</sup>. Depende de la energía que transporta para generar ionizaciones a nivel molecular, y generar radicales libres que suelen ser muy dañinos para la célula. También puede causar daño estructural en el DNA, como es el caso de los rayos X y rayos gamma<sup>50-52</sup>.

Los campos eléctricos y magnéticos variables en el tiempo pueden ser caracterizados por su longitud de onda, su frecuencia y su amplitud (que viene a determinar su intensidad o potencia).

#### *2.1.7.1 Campo eléctrico (CE)*

Es un campo del espacio que tiene la propiedad física de que si se coloca una carga eléctrica en uno de sus puntos sobre ella aparece una fuerza<sup>48</sup>. Los campos eléctricos se producen por partículas, o conductores cargados positivamente o negativamente, se denota por  $\vec{E}$ . Las unidades del campo eléctrico son voltios sobre metro (V/m)<sup>52,53</sup>. La intensidad de un campo eléctrico puede depender de la distancia y el tiempo.

Se define vectorialmente en cualquier punto del espacio como  $\vec{E} = \vec{F}/q$ . Donde  $\vec{F}$  es la fuerza sobre la carga puntual,  $q$  la carga de una carga puntual. Puede interpretarse como una cantidad tal que cuando se multiplica por una carga puntual, el resultado es la fuerza sobre esa carga puntual. Si las cargas están distribuidas de manera continua el campo eléctrico se define en términos de densidades de carga volumétrica, superficial y lineal respectivamente<sup>54</sup>.

### 2.1.7.2 Campo magnético (CM)

Se define como un vector que se representa como  $\vec{B}$ , cuya dirección en un punto dado se puede definir como aquella a la que apuntaría el polo norte de una brújula si se colocara en ese punto<sup>55</sup>.

En su forma más simple un campo magnético se genera por el movimiento de una partícula cargada. Si queremos determinar el campo total  $\vec{B}$  producido por la distribución total de corriente en un alambre puede realizarse mediante la Ley de Biot-Savart (Ec. 1).

Ley de Biot-Svart.

$$\vec{B} = \frac{\mu_0}{4\pi} \int \frac{id\vec{s} \times \vec{r}}{r^3} \quad (1)$$

Donde:

$i$  es la corriente eléctrica

$d\vec{s}$  es el vector de desplazamiento en el intervalo  $dt$

$\vec{r}$  es el vector que apunta el punto de observación.

Los campos magnéticos en general se generan por el movimiento de cargas eléctricas a través de un conductor, la cantidad de carga que fluye a través de un área de sección transversal de un conductor por unidad de tiempo nos produce una corriente y esta corriente a su vez genera un campo de inducción magnética  $\vec{B}$ , el campo de inducción magnética también se le conoce como densidad de flujo magnético (o simplemente campo magnético). La densidad de flujo magnético aumenta en función de la intensidad de la corriente eléctrica. Las unidades de medida del campo magnético son Gauss (G) o Tesla (T)<sup>52,53</sup>. Es posible generar y manipular campos magnéticos mediante selenoides como en el caso del electroimán y las bobinas Helmholtz<sup>52</sup>.

#### 2.1.7.2.1 *Campo geomagnético terrestre*

En el siglo XII se observó que un polo de un imán siempre se dirigía hacia el norte y desde entonces se utilizó en la orientación geográfica. William Gilbert se basó en los estudios del magnetismo y dijo que el mundo era como un gran imán iniciando así con la descripción del campo geomagnético terrestre el cual es utilizado por numerosas especies para orientarse, siendo más evidente en las grandes migraciones<sup>56</sup>. Hoy se sabe que la tierra se comporta como un gran imán y que el campo magnético es generado en el núcleo y corteza terrestre, su intensidad varía de 25μT en el ecuador a 65μT en los polos y nos protege de las radiaciones solares.

#### 2.1.7.2.2 *Bobinas Helmholtz*

Es una bobina idealizada por Hermann Ludwig Ferdinand Von Helmholtz (1821-1894), conocida actualmente como bobina Helmholtz, la cual consta de dos bobinas circulares coaxiales planas, cada una conteniendo N espiras (vueltas), la separación entre estas bobinas es igual al radio (R) de ambas. Llevan igual corriente (i) en la misma dirección.

Al pasar una corriente eléctrica por una bobina se crea un campo magnético proporcional al número de espiras por unidad de longitud y a la intensidad de la corriente, dando valores máximos en su eje central (P) a la mitad de distancia entre las dos bobinas (ver Fig. 9) puede calcularse con la Ec. 2. La alimentación de corriente eléctrica puede ser continua (CC) o alterna (CA)<sup>57</sup>.

Campo magnético generado por las bobinas de Helmholtz

$$B = \frac{8N\mu_0 i}{5\sqrt{5}R} \quad (2)$$

Dónde: N número de vueltas

R radio de la bobina

i corriente

$\mu_0$  constante de permeabilidad  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \frac{T \cdot m}{A}$

T tesla

m metro

A ampere

## 2.2 Antecedentes del problema

En el campo de la salud, se han utilizado frecuentemente tanto tecnologías emergentes como alternativas en el tratamiento o diagnóstico de diversas enfermedades. Es así que se comenzaron a utilizar los CEM con fines diagnósticos y terapéuticos, por ejemplo en Estados Unidos de Norteamérica a partir de 1928 se utilizaba el “Therenoid”, el cual consiste de un enrollado de alambre conductor en forma toroidal (que tiene forma de dona) de aproximadamente 50 cm de diámetro, con el cual se aplicaban los CEM en terapias y debido a que no se demostraron sus efectos benéficos, fue prohibido en 1933<sup>58</sup>. En la actualidad debido a la necesidad de diferentes alternativas de tratamiento se ha retomado su investigación demostrando que tiene efectos sobre el crecimiento de organismos de tal modo que se ha aprovechado su capacidad de aumentar el crecimiento de plantas y levaduras en tanto que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias tales como *E. Coli*, *S. aureus* y *P. aureginosa*.

### 2.2.1 Uso de los CEM

Debido al amplio espectro que abarcan los CEM han sido de utilidad en diferentes áreas desde la creación y análisis de materiales hasta el desarrollo de tecnologías útiles en la industria de alimentos<sup>59</sup>, diagnóstico y tratamiento de enfermedades tales como los rayos X,

la imagen por resonancia magnética<sup>60</sup>, la magnetoterapia en rehabilitación física<sup>61</sup> y el uso de láser en cirugías.

### 2.2.2 Efectos biológicos de los CEM

Los efectos biológicos son las respuestas medibles a un estímulo o cambio en el medio; un efecto biológico se produce cuando la exposición a los CEM provoca una respuesta detectable en un sistema biológico. Cuando un sistema vivo es sensible a determinada frecuencia de CEM, esta exposición puede generar modificaciones funcionales o estructurales del sistema que pueden ser reversibles<sup>62,63</sup>. Dependiendo de la frecuencia del campo electromagnético los efectos varían desde cefalea, vómito y fiebre (si hay exposición a frecuencias industriales de 50 y 60 Hz de corriente alterna (CA) hasta pasar imperceptibles para los humanos<sup>51,53,64</sup>.

Algunos estudios sobre los efectos de los CEM en salud los consideran un importante factor de riesgo de padecer cáncer<sup>65-67</sup>, mientras que algunos otros asociaron la capacidad de los CEM de modificar organismos vivos (en plantas y levaduras<sup>68-71</sup>) para utilizarlo en el campo de la medicina específicamente en rehabilitación con favorables resultados<sup>61</sup>.

Recientemente se comenzó a estudiar más a fondo dichos efectos de los CEM para describir los mecanismos por los que afectan a los organismos, realizando estudios en la orientación de plantas bacterias y animales<sup>56,72</sup>. Además se realizaron estudios en microorganismos en los cuales se observó aumento en el rendimiento de levaduras para su aprovechamiento<sup>69,73</sup>, mejoras en las semillas<sup>68</sup>, e incluso se observó la disminución del crecimiento bacteriano dependiendo de la frecuencia y tiempo de exposición<sup>63,74-86</sup> demostrando así la efectividad para disminuir la viabilidad de diversas bacterias aplicando CEM, entre ellas: *Echerichia Coli* (*E. coli*), *Leclercia adexcarboxilata*, y *S. aureus*, también se concluyó que la disminución de viabilidad es dependiente del tiempo de exposición<sup>74</sup>. En 2012 Balderas<sup>77</sup> demostró la sensibilidad del *S. aureus* a los CEM al disminuir su capacidad de formar biopelícula y observó cambios estructurales en la morfología bacteriana; en 2014 Hussein<sup>75</sup>



demonstró el control de infección por el *S. aureus* en un modelo *in vivo* al aplicar CEM a ratones, mientras que Segatore<sup>87</sup> mostró el aumento de la eficacia de tratamiento antibiótico combinado con la aplicación de campos magnéticos en cultivos de *E. coli* y *Pseudomona aureginosa*.

### 2.2.3 Utilidad de los campos Magnéticos

Los campos magnéticos son de mucha importancia y utilidad en nuestra vida cotidiana, en los últimos 100 años han surgido numerosas aplicaciones del magnetismo y de los materiales magnéticos: el electroimán, por ejemplo, es la base del motor eléctrico y el transformador<sup>88</sup>. En épocas más recientes, el desarrollo de nuevos materiales magnéticos como las ferritas ha influido notablemente en la revolución de los ordenadores o computadoras. Los materiales magnéticos como las ferritas también son componentes importantes de las cintas y discos para almacenar datos<sup>89</sup>.

Los imanes grandes y potentes son cruciales en muchas tecnologías modernas. Los trenes de levitación magnética utilizan poderosos imanes para elevarse por encima de los rieles y evitar el rozamiento. En 1946, Purcell y Bloch desarrollaron la resonancia magnética nuclear (RMN) que es una importante herramienta de diagnóstico empleada en medicina en donde se utilizan campos magnéticos de gran intensidad<sup>89</sup>.

### 2.2.4 Efectos en salud de los Campos Magnéticos

El efecto biológico más importante producido por la emisión de radiofrecuencia es el depósito calórico, un claro ejemplo de ello es la IRM (Imagen por Resonancia Magnética) en la cual la potencia de la radiofrecuencia (RF) utilizada se transforma en calor dentro de los tejidos del paciente debido a pérdidas resistivas. Se ha calculado que 8W/kg puede incrementar la temperatura en 1°C de 1mm<sup>3</sup> de agua por lo que organizaciones como la FDA

(Food and Drug Administration) recomiendan que en condiciones controladas se tome la mitad del límite para evitar generar daño<sup>60</sup>.

### 2.3 Marco teórico

El vertiginoso ritmo al que avanzan las tecnologías sólo es comparable con el ritmo que adquieren resistencias algunas bacterias tales como el *S. aureus* el cual es uno de los patógenos que adquiere más rápidamente elementos para aumentar su virulencia por lo que es menester que la solución avance al mismo ritmo que el problema, es por ello que la medicina se ha apoyado en otras ciencias tales como la física la cual estudia el electromagnetismo que gracias a su comprensión ha permitido el desarrollo de la microelectrónica y de otras áreas de alta tecnología que utilizan sus principios en el diseño de aparatos y sistemas de información, medición, etc. El magnetismo por ejemplo comienza a ser muy utilizado en la medicina, tal es el caso de la resonancia magnética nuclear y la magnetoterapia.

Dentro de los cientos de agentes infecciosos a los que el ser humano se enfrenta día a día se encuentra el *S. aureus*, el cual puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis y neumonía. Por esta razón es importante buscar la manera de evitar que las colonias de dichas bacterias se reproduzcan o evitar que colonicen a nuevos huéspedes y los que son portadores asintomáticos evitar que les cause algún tipo de enfermedad. Se han reportado por ejemplo trabajos en los que se menciona que mediante la aplicación de campos magnéticos variables se ha logrado combatir uno de los factores de virulencia de esta bacteria: la biopelícula, pero si bien es cierto que dichos trabajo reportan avances importantes muchos resultan confusos pues no hacen diferencia en la terminología de si utilizan campos magnéticos o electromagnéticos. Más aún los equipos que utilizan son muy costosos. Otro problema fundamental que han encontrado otros estudios realizados es poder mantener la temperatura fija, pues la inhibición de dicha bacteria podría deberse más bien a una temperatura alta y no por el campo magnético aplicado.

En el presente trabajo se propone utilizar las bobinas de Helmholtz para producir campos magnéticos variables en el tiempo a una frecuencia de 60 Hz mediante un “dimmer” de alta potencia y producir además campos constantes mediante dos fuentes de poder conectadas en serie y con ello encontrar los parámetros adecuados de intensidad de campo magnético a la cual el *S. aureus* disminuye o detiene el crecimiento de colonias en muestras *in vitro* y en un modelo de absceso *in vivo*.

### III JUSTIFICACIÓN

Alrededor del 70 al 80 % de las infecciones supurativas en la piel son causadas por el *S. aureus*, éste es la segunda causa más frecuente de infecciones nosocomiales y la primera en cuerpos extraños implantados (catéteres, prótesis, marcapasos, etc.). Los reportes de cepas resistentes a antibióticos se han incrementado rápidamente, se estima que para el año 2000 ceca del 90% de las cepas de *S. aureus* causantes de enfermedades eran resistentes a penicilinas.

Los antibióticos específicos usados para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA tienen un costo alto, algunas veces encontrándose fuera del alcance económico de la mayoría de la población. Consideremos que el antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones causadas por cepas MRSA es la vancomicina la cual debe administrarse por vía intravenosa, su uso se restringe a paciente que se encuentren hospitalizados y requiere acceso venoso además de ser altamente nefrotóxico por lo que el paciente sometido a este tratamiento debe tener estrecha vigilancia de la función renal. Es por ello que se torna de gran importancia implementar terapias alternativas capaces de disminuir la virulencia bacteriana o que potencialicen las terapias actuales para combatir infecciones.

En estudios recientes se ha señalado que una buena alternativa es el uso de campos electromagnéticos los cuales han demostrado reducir la presencia de bacterias tales como: *Entamoeba invadens*, *E. coli*, *Leclercia adecarboxylata* y *S. aureus*. En estudios *in vitro* se observó una menor viabilidad al exponer a las bacterias al CM, observando disminución de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Es posible aprovechar esta cualidad de los CM para disminuir y/o eliminar la capacidad infectiva del *S. aureus* disminuyendo así la incidencia de enfermedades causadas por esta bacteria o mejorar la sensibilidad a antibióticos. Por esto se estudia un modelo murino de absceso subcutáneo para comparar la efectividad del tratamiento farmacológico (antibioticoterapia) frente a la aplicación de CM.

## IV HIPÓTESIS

*S. aureus* responderá a la aplicación de CM con disminución de la cuenta viable en el modelo *in vitro* y con disminución del número y/o tamaño de abscesos en el modelo *in vivo*.

## V OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de los campos magnéticos sobre la presencia y capacidad de formar abscesos del *S. aureus* en un modelo *in vitro* e *in vivo* en ratones CD-1.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar las cepas de *S. aureus* del cepario existente en el laboratorio anexo de histología mediante pruebas bioquímicas para confirmar que sea la bacteria con la que se desea trabajar.
- Determinar su curva de crecimiento mediante la técnica de turbidimetría y por cuenta viable en condiciones favorables y compáralo con las cepas expuestas a CM.
- Construir una bobina Helmholtz con capacidad para contener y mantener ratones para evaluar la respuesta del *S. aureus* en un modelo *in vivo*.
- Caracterizar el CM producido por las bobinas de Helmholtz para establecer los parámetros a los que serán sometidas las cepas.
- Estandarizar los parámetros de intensidad, frecuencia y tiempo de exposición a CM en un modelo *in vitro* para observar su efectividad y aplicarlo en el modelo *in vivo*.
- Estandarizar la técnica de producción de absceso cutáneo en ratones CD-1 para obtener el modelo biológico.
- Aplicar la técnica de absceso inducido en ratones por inoculación de la cepa seleccionada de *S. aureus* para evaluar el efecto sobre los abscesos subcutáneos al exponer a los ratones a CM.

## VI MATERIALES Y MÉTODO

Se trata de un estudio básico de tipo experimental. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 6.1 Tamaño de muestra y muestreo

Para el experimento *in vitro* se seleccionaron un total de 11 cepas de *Staphylococcus sp.* del cepario del laboratorio anexo de histología del Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Para el experimento *in vivo*: se realiza con 36 ratones machos CD-1 de 10-12 semanas de edad y >25 g de peso. Se formaron 5 grupos (n=6 ratones), denotados como: G1, G2, G3, G4 y G5 respectivamente;

- G1 Control de inóculo, en este caso se practica una inoculación por vía subcutánea de 200 µl de solución salina al 0.85% y misma solución por vía intraperitoneal.

- G2 Control positivo, inóculo de concentrado bacteriano (dosis  $1 \times 10^{10}$  UFC en 200µl) pasadas 72 horas tratamiento placebo con solución salina vía intraperitoneal.

- G3 Control negativo, inóculo de concentrado bacteriano, pasadas 72 horas tratamiento a base de amikacina (2.5 mg en 200 µl vía intraperitoneal cada 24h durante 5 días).

- G4 Inóculo de concentrado bacteriano, pasadas 72 horas tratamiento con CM durante 5 días continuos.

- G5 Inóculo de concentrado bacteriano, pasadas 72 horas tratamiento con amikacina (2.5 mg en 200 µl vía intraperitoneal cada 24h durante 5 días) y CM durante 5 días continuos.

Durante los días de exposición a CM los ratones se mantuvieron en el interior de la bobina 2 con monitoreo constante de la temperatura para mantenerla en un rango de 20-24°C, con acceso libre a alimento y agua.

## 6.2 Pruebas bioquímicas para la identificación de *S. aureus*

Con el fin de identificar las cepas seleccionadas, se realizan pruebas bioquímicas tales como tinción de gram, siembra en agar selectivo y otras, las cuales se detallan a continuación.

### 6.2.1 Tinción de gram.

Es una tinción diferencial, se utilizan dos colorantes. Mediante esta técnica se clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas o gram negativas. *S. aureus* es una bacteria gram positiva por lo que se espera que con la tinción se muestren cocos organizados en racimos de uvas de color azul-morado.

#### 6.2.1.1 Fundamento

Se basa en las características de la pared celular de las bacterias: las bacterias gram negativas tienen una pared constituida por peptidoglicano y una membrana celular externa; las bacterias gram positivas tienen una pared celular gruesa formada por peptidoglicano, sin membrana celular externa<sup>16</sup>.

En la tinción de gram se utiliza un colorante primario usando cristal violeta el cual tiene afinidad con el peptidoglicano. Posteriormente se agrega lugol el cual funciona como fijador, formando un complejo cristal violeta-yodo que es insoluble al agua el cual satura los espacios del peptidoglicano y evita la salida del colorante primario. Luego se agrega una combinación previa de alcohol acetona (1:1) la cual cierra los poros y deshidrata la pared bacteriana, además destruye la membrana externa de las bacterias gram negativas. Finalmente se coloca un colorante secundario, útil para teñir las bacterias que no retuvieron el complejo cristal violeta-yodo<sup>90</sup>.

Se requiere contar con cultivos de 24 horas en agar nutritivo de las 8 cepas bacterianas, mechero, asa bacteriológica, portaobjetos, charola para tinciones, pizeta con agua destilada, colorantes cristal violeta, safranina, lugol mezcla de alcohol-acetona 1:1.

### 6.2.1.3 Procedimiento

- Preparación un frotis. Se coloca una gota de agua en el centro del portaobjetos, con ayuda del asa bacteriológica y en condiciones asépticas (flamear el asa en la llama del mechero y dejar enfriar). Luego, se toma una pequeña cantidad del cultivo y se coloca en la gota de agua, se remueve la mezcla para homogeneizar y se extiende en el portaobjetos. Para fijar la muestra se pasa por la flama del mechero en varias ocasiones (pases rápidos para evitar que las células se deformen) con esto se logra detener los procesos vitales de los microorganismos<sup>16,90</sup>.
- Posteriormente se colocan las laminillas en la charola para tinciones (ver Fig. 8 izquierda) y se agrega cristal violeta hasta cubrir toda la muestra, se deja actuar durante 60 s y se enjuaga con agua destilada con ayuda de la pizeta. Se agrega yodo y se deja actuar por 60 s, seguidamente se enjuaga con agua destilada y decoloramos con alcohol-acetona agregándolo lentamente por aproximadamente 10 s o hasta que esté de color azul claro casi transparente. Finalmente se agrega safranina y se deja actuar por 45-60 s para posteriormente enjuagar con agua destilada, dejando secar al aire y observar en el microscopio óptico (ver Fig. 8 derecha).

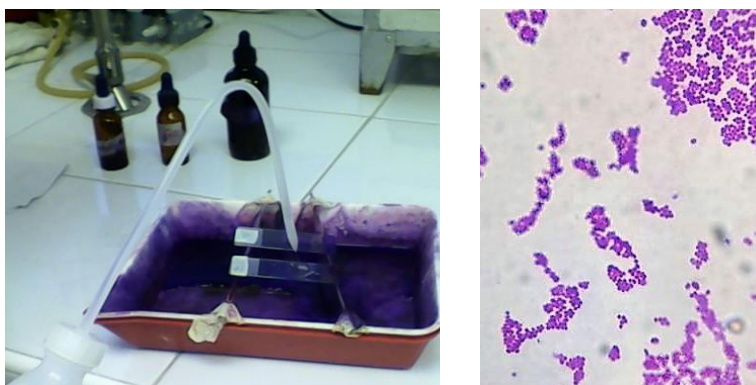


Fig. 8 Tinción de gram. Izquierda. Se muestra el procedimiento para realizar la tinción de gram, al fondo se muestran los frascos de los colorantes en frascos ámbar. Derecha. Fotomicrografía de *S. aureus* a 100X. En color morado se observan los cocos gram positivos ordenados en racimos de uvas.



### 6.2.2 Siembra en agar sal-manitol

Debido a las características del *S. aureus*, éste tolera concentraciones de salinidad que otras bacterias no tolerarían por lo que la siembra en agar sal-manitol es de utilidad para su identificación.

#### 6.2.2.1 Fundamento

En este medio las fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales la constituyen el extracto de carne y la peptona (de carne y de caseína). El manitol es el hidrato de carbono fermentable; el cloruro de sodio (NaCl [7.5]) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de flora acompañante y el rojo fenol es el indicador de pH.

Los estafilococos coagulasa positivo (tal como el *S. aureus*) hidrolizan el manitol acidificando el medio por lo que las colonias toman una coloración amarilla y aparecen rodeadas de un halo amarillo brillante mientras que los estafilococos coagulasa negativos se visualizan como colonias rojas, rodeados de una zona roja o púrpura<sup>91</sup>.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, modificando el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

#### 6.2.2.2 Procedimiento

Siguiendo las especificaciones del fabricante se hidrata el medio de cultivo y se esteriliza a 121°C durante 15 min. Posteriormente se vierte en cajas de Petri manteniendo un grosor de 4-5 mm y se deja enfriar. Una vez que el medio ha solidificado se realiza la siembra de las cepas con asa bacteriológica mediante estría abierta. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.

### *6.2.3 Siembra en agar para estafilococos No. 110*

Chapman utilizó las propiedades reportadas de los estafilococos (tolerancia a la salinidad, capacidad para fermentar el manitol, producción de pigmento y su capacidad para licuar la gelatina) para desarrollar un medio selectivo y diferencial llamado Agar Estafilococos 110.

#### *6.2.3.1 Fundamento*

En este medio la peptona provee la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura proporciona vitaminas del complejo B. La alta concentración de cloruro de sodio tiene un efecto en el desarrollo selectivo de los estafilococos. La lactosa y el D-manitol proporcionan la fuente de carbono fermentable. La gelatina es el sustrato para la enzima gelatinasa mientras que el agar es usado como agente solidificante.

#### *6.2.3.2 Procedimiento*

Siguiendo las especificaciones del fabricante se hidrata el medio de cultivo y se esteriliza a 121°C durante 15 min, a continuación se vierte en cajas de Petri manteniendo un grosor de 4-5 mm y se deja enfriar. Una vez que el medio ha solidificado se realiza la siembra de las cepas con asa bacteriológica mediante estría. Las cajas se incuban a 37°C durante 24 h.

1.- **Fermentación de manitol:** se agrega púrpura de bromocresol (unas gotas) en las zonas donde se encuentran las colonias sospechosas y en una zona de la placa donde no hay desarrollo bacteriano. Para leer el resultado se compara el color desarrollado entre estas dos zonas. La prueba es positiva si hay cambio de color del indicador del medio en la zona de crecimiento bacteriano; el medio sin desarrollo de microorganismos permanece sin cambio. La prueba es negativa cuando no hay diferencias de color entre las zonas de crecimiento bacteriano y la zona sin inocular.

2.- **Hidrólisis de la gelatina:** se cubre la placa 5 ml de una solución saturada de sulfato de

amonio y se coloca en incubadora a 35-37 °C en aerobiosis durante 10 minutos. Para leer el resultado se observa la presencia de halo alrededor de las colonias, siendo positiva si se observa halo transparente alrededor de las colonias y negativa si hay ausencia de halo.

#### 6.2.4 Prueba de Catalasa

El *S. aureus* es una bacteria catalasa positiva por lo que es necesaria la realización de esta prueba para su correcta identificación.

##### 6.2.4.1 Fundamento

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva<sup>16</sup>.

##### 6.2.4.2 Procedimiento

Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 30% en un portaobjetos y con un asa bacteriológica en condiciones asépticas se toma una pequeña muestra del cultivo de la cepa que se analizará y se coloca en la gota de peróxido de hidrógeno. Se debe observar la presencia o ausencia de burbujas, si hay burbujas la prueba es positiva, si no las hay es negativa (ver Fig.9).



Fig. 9 Prueba de catalasa. Se muestra resultado positivo a la prueba de catalasa evidenciada con la presencia de burbujas al poner en contacto peróxido de hidrogeno con una alícuota de cultivo fresco.

### 6.2.5 Prueba de Coagulasa

El género *S. aureus* se caracteriza por ser coagulasa positiva.

#### 6.2.5.1 Fundamento

La capacidad de causar hemólisis se puede demostrar mediante la mezcla de suero con el cultivo que se desea estudiar evaluando la presencia de grumos. O bien, mediante la siembra en agar sangre el cual es una base de agar nutritivo adicionado con 5% de sangre de cordero. El adicionar el medio permite detectar hemólisis. En este estudio se utilizó agar nutritivo adicionado con 5% de sangre humana, lo que le confiere un color rojo cereza<sup>16</sup>.

#### 6.2.5.2 Procedimiento

Se preparó agar sangre en cajas de Petri, una vez gelificado y seco, se realizó siembra por estría de las 8 colonias previamente seleccionadas y se incubó a 35°C durante 24 h. Pasado el tiempo establecido, se evaluó el resultado colocando las cajas sobre un fondo de luz blanco para evidenciar el halo blanquecino con lo cual se determina que la hemólisis que causan es de tipo  $\beta$  como se muestra en la Fig. 16.

### 6.3 Curva de crecimiento bacteriano

Una vez que se ha identificado el *S. aureus*, se realiza una curva de crecimiento la cual señala la magnitud de la población total bacteriana. Existen diferentes métodos para realizar el conteo bacteriano, utilizamos el método de Miles y Misra (método directo) y el método de McFarland (indirecto)<sup>92</sup>.

### 6.3.1 Método de Miles y Misra

#### 6.3.2.1 Fundamento

Se basa en la cuenta viable de UFC, es decir arroja el conteo de las células vivas. Mediante la obtención colonias separadas que faciliten su conteo, inoculando sobre la superficie de agar en placa un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular. De esta forma en una placa se siembran cuatro diluciones, se incuban a 37°C durante 18-24 h y posteriormente se cuentan las UFC. Los resultados obtenidos por dilución se multiplican por el factor de dilución y se promedian, este resultado se multiplica por la fracción de ml de la alícuota (en nuestro caso particular que se inoculó 20  $\mu\text{l}$  se multiplica por 50 para obtener la equivalencia en ml) y el resultado obtenido se expresa en UFC/volumen<sup>92,93</sup>.

Se emplea un matraz Erlenmeyer con tapa de rosca conteniendo 100 ml de caldo nutritivo estéril el cual se inoculó con una suspensión bacteriana en fase exponencial de crecimiento. Se usa una concentración suficiente para que la densidad óptica inicial a 540 nm corresponda a 0.2 u.a. (unidades arbitrarias de absorbancia) y se incuba a 37°C tomando 5 ml de muestra a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, y 72 h.

A continuación numeramos 8 tubos Eppendorf (del 1 al 8), en cada uno se coloca con micropipeta 900  $\mu\text{l}$  de caldo nutritivo estéril. Al tubo etiquetado con el número 1 se agregan 100  $\mu\text{l}$  de la muestra del tiempo 1 (correspondiente a 2 h), homogeneizar en un vórtex, y de éste tubo tomar 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla y colocar en el tubo 2. Se repite el procedimiento hasta el tubo 8, quedando así diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ...  $1 \times 10^{-8}$ .

Se divide una caja de Petri con agar nutritivo en 4 secciones, en cada sección se siembra una dilución tomando una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  la cual se esparce con ayuda de un asa bacteriológica

De esta manera quedan 4 diluciones por caja (en nuestro caso particular sembramos las diluciones pares, es decir,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-8}$ ). Se repite el procedimiento para todos los tiempos e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h, una vez que las colonias sean observables se cuentan las UFC, el resultado obtenido se promedia y se multiplica por el factor de dilución para obtener las UFC/ml, ver Fig. 10.

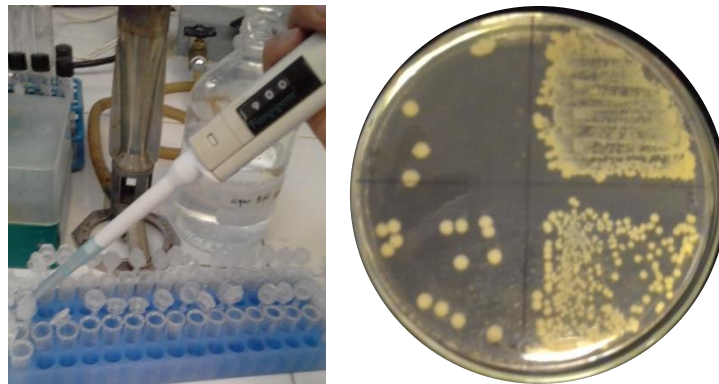


Fig. 10 Procedimiento para realizar la curva de crecimiento. Izquierda, se muestra el procedimiento de las diluciones en tubos Eppendorf. Derecha, Crecimiento en agar nutritivo después de 24 h de incubación, de arriba abajo en sentido contrario a las manecillas del reloj se observan el crecimiento de las diluciones  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$  respectivamente.

### 6.3.2 Método de la escala de McFarland

La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico. Se usa con la finalidad de establecer una relación entre la turbidez de dicha precipitación, (las preparaciones se muestran en la Tabla 2) y una precipitación bacteriana. Este método ofrece una estimación de las UFC/ml en base a la composición del tubo, sin embargo debido a las diferencias en el tamaño de las bacterias es necesario realizar una curva patrón por espectrofotometría (lecturas a 540nm de longitud de onda) que permite relacionar el estándar de McFarland con una suspensión bacteriana en solución salina<sup>94</sup>. La desventaja de este método es que no diferencia las bacterias vivas de las muertas.

Tabla 2. Composición de los tubos de McFarland			
TUBO	Cl <sub>2</sub> Ba 1% (ml)	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 1% (ml)	UFC/ml
1	0.1	9.9	3,0x10 <sup>8</sup>
2	0.2	9.8	6,0x10 <sup>8</sup>
3	0.3	9.7	9,0x10 <sup>8</sup>
4	0.4	9.6	1,2x10 <sup>9</sup>
5	0.5	9.5	1,5x10 <sup>9</sup>
6	0.6	9.4	1,8x10 <sup>9</sup>
7	0.7	9.3	2,1x10 <sup>9</sup>
8	0.8	9.2	2,4x10 <sup>9</sup>
9	0.9	9.1	2,7x10 <sup>9</sup>
10	1.0	9.0	3,0x10 <sup>9</sup>

Se muestra el volumen de los componentes de los estándares de McFarland. Cl<sub>2</sub>Ba Cloruro de Bario. SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> ácido sulfúrico. Tomado de <sup>94</sup>.

### 6.3.2.1 Fundamento

Se basa en la turbidez del medio de cultivo medido por espectrofotometría, al aumentar el número de bacterias, mayor es la turbidez y menor la luz captada por el detector. Cuando una luz monocromática incide sobre un medio homogéneo, una parte de esta luz es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la interacción entre los fotones y las partículas de la muestra, la intensidad del haz de luz sea atenúa, por lo que aumenta la absorbancia<sup>95</sup>.

### 6.3.2.2 Procedimiento

Se realizaron las mezclas referidas en la Tabla 2 para obtener los tubo del estándar de McFarland y se realizaron lecturas al espectrofotómetro para obtener la curva patrón.

Se utilizaron las muestras obtenidas con el método de Miles y Misra para realizar lecturas en el espectrofotómetro con  $\lambda$  (longitud de onda) 540nm y se comparó con la curva patrón obtenida.

Para tener una mayor fiabilidad de los datos se realiza una gráfica comparativa entre la cuenta viable y la absorbancia, a dicha curva se le realiza una regresión logarítmica para poder estimar las UFC conociendo la absorbancia de la muestra.

## 6.4 Microscopía electrónica de barrido

### 6.4.1 Fundamento

El microscopio electrónico de barrido (MEB) o también conocido como SEM (Scanning Electron Microscopy) utiliza la difracción de electrones, lentes electromagnéticas, sistema de vacío, y aperturas. El MEB acelera los electrones y los colima para formar un haz muy fino que incide sobre la superficie de la muestra produciendo varias posibilidades de obtención de imagen<sup>96</sup>.

Cuando el haz de electrones (primarios) incide sobre la superficie de la muestra, provoca que otros electrones (llamados retrodispersados y secundarios) sean proyectados de la misma. La muestra también puede absorber parte de los electrones primarios. Los detectores recolectan electrones secundarios o retrodispersados y los convierten en una señal que es enviada a una pantalla fosforescente, similar a la de una televisión, con esta señal se produce una imagen<sup>96</sup>.

El haz primario también puede desprender electrones de las capas internas de las moléculas de la muestra los cuales al regresar a su estado nativo emiten energía en forma de rayos X. Estas energías pueden también ser recolectadas, identificadas y analizadas por detectores especiales para rayos X. Los rayos X que se generan en una muestra sometida a bombardeo electrónico permiten identificar los elementos presentes y establecer su concentración.

Los electrones secundarios son producidos por choques inelásticos de los electrones primarios con los átomos de la muestra. Estos electrones poseen baja energía, del rango de 0 a 50 eV; por su baja energía se asume que estos electrones son generados por las moléculas más superficiales de la muestra y son utilizados para generar imágenes tridimensionales al ser recolectados mediante un detector para electrones secundarios. Por lo tanto con la técnica de Microscopía electrónica de rastreo SEM-EDS (Scanning Electron Microscopy - Energy Dispersive X-ray spectroscopy) se puede estudiar detalles de la morfología de una muestra y también se obtiene el análisis elemental de la superficie<sup>97</sup>.



Las muestras que son conductoras se pueden leer sin preparación, sin embargo, las muestras orgánicas no son conductoras, por lo que deben ser recubiertas con un material conductor el cual puede ser oro (técnica de sputtering) o grafito de carbón. Esto para que en la muestra haya desprendimiento de electrones y sean captados en el MEB<sup>98</sup>. En este trabajo se utilizó la técnica de sputtering el cual se hace en vacío.

#### 6.4.2 Procedimiento

Para el montaje de las muestras se cortaron portaobjetos para obtener fragmentos cuadrados de 1 cm de lado. Se obtuvieron cultivos frescos en placa de agar nutritivo y se fijaron mediante calor a los portaobjetos previamente cortados.

Los fragmentos con muestra se montaron en un portaobjetos para microscopio electrónico de barrido con cinta magnética y se recubrieron bajo vacío con oro ( $3 \mu$ ) con el sputter marca DENTON VACCUM modelo Denton Vacuum Desk II y se leyeron en el microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-IT300LV a 15 Kv y 10 000X (Fig. 11).



Fig. 11 Equipo utilizado en el MEB. A la izquierda se muestra la aplicación de oro mediante la técnica de sputtering, en el cilindro se crea el vacío. A la derecha el microscopio utilizado para la observación de las muestras.

## 6.5 Determinación de sensibilidad a antibióticos mediante antibiograma

### 6.5.1 Fundamento

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos impregnados en papel filtro y colocados en un medio sólido inoculado con bacterias. El antibiótico se difundirá formando un gradiente de concentración el cual inhibirá o permitirá el crecimiento de la bacteria. Esto permite traducir, en una primera aproximación el resultado de un tratamiento con determinado antibiótico como factor predictivo de su eficacia clínica<sup>99</sup>.

Se utilizaron multidiscos combinados marca BioRad, ya que presentan mayor número de antibióticos a evaluar.

Su composición es:

Amikacina	AK	30mcg	Enoxacina	ENX	10mcg
Ampicilina	AM	10mcg	Eritromicina	E	15mcg
Cefalotina	CF	30mcg	Gentamicina	GE	10mcg
Ceftriaxona	CRO	30mcg	Netilmicina	NET	30mcg
Cloranfenicol	CL	30mcg	Penicilina	PE	10U
Dicloxacilina	DC	1mcg	Trimetoprim-Sulfametoxazol		
			TMP/SXT		25mcg

### 6.5.2 Interpretación de resultados.

Las cepas se clasificarán en Resistentes (R), Intermedias (I) o Susceptibles (S), la categoría MS indica un nivel de sensibilidad que requiere la máxima dosis permitida para la terapia dependiendo del halo de inhibición que incluyen los 6 mm de disco los cuales se miden con

ayuda de compás de calibración, Vernier o regla por el fondo de la caja, la cual se ilumina con luz refleja, es decir, por el fondo de la caja.

### 6.5.3 Procedimiento

Siguiendo las especificaciones del fabricante se realizaron siembras en placa de agar Müller-Hinton con profundidad de 4mm debido a que este medio favorece el crecimiento de casi todos los organismos. Luego se toman con un asa 4 o 5 colonias aisladas y se llevan a medio de cultivo líquido (4 o 5 ml en tubo de ensayo con tapa) en este caso utilizamos caldo Müller-Hinton, se incuba a 37°C hasta que aparezca una turbidez ligera (aproximadamente 5 h después). Se ajusta la turbidez al estándar 0.5 de McFarland con solución salina. De éste se toma una muestra humedeciendo un hisopo, se quita el exceso de caldo presionando y girando el hisopo interna de tubo, se estría en el agar y se mantiene durante 3 min antes de colocar los discos. Estos se colocan con pinza estéril en el centro del agar y presionando para asegurar el contacto con la superficie, después de 15 min de colocado el disco se invierte la caja y se incuba a 37°C durante 24 h para posteriormente realizar la lectura de halo de inhibición como se muestra en la Fig.12.



Fig. 12 Resultado de antibiograma después de 24 h de incubación a 37°C. Se observa un halo de inhibición correspondiente a cada antibiótico evaluado.

## 6.6 Caracterización de bobina de Helmholtz

### 6.6.1 Fundamento

Una bobina de Helmholtz es un dispositivo para producir CM uniformes, además son usados para cancelar campos magnéticos externos, como el campo magnético de la Tierra.

Una bobina de Helmholtz consta de dos bobinas magnéticas circulares idénticas (solenoides) formadas por alambre de cobre galvanizado, que están colocadas simétricamente a lo largo de un eje común, una a cada lado del área experimental, y separadas por una distancia  $h$  igual al radio  $R$  de la bobina. Cada bobina lleva una corriente eléctrica igual en la misma dirección. La mayoría de las bobinas de Helmholtz utilizan corriente continua (DC) para producir un campo magnético estático, mientras que para generar el campo magnético variable en función del tiempo requerido se utiliza corriente alterna (CA)<sup>57</sup>. Debido al paso de corriente el modelo tiende a calentarse al pasar el tiempo por lo que se adicionó al sistema una fuente de aire generado con un ventilador casero.

### 6.6.2 Procedimiento

Se caracterizaron dos bobinas de Helmholtz denominadas bobina 1 y bobina 2 de las siguientes dimensiones:

Bobina 1: diámetro 16cm, distancia entre las bobinas 8 cm.

Bobina 2: diámetro interior 19.5 cm, distancia entre las bobinas 10 cm.

Ambas bobinas se conectaron en serie a dos fuentes de poder conectadas a DC y a su vez en serie con amperaje máximo de 3<sup>a</sup> (ver Fig. 13 centro). Se realizan mediciones del CM generado utilizando un Registrador de datos Xplorer-GLX marca PASCO® y una sonda PASPORT marca PASCO® especial para detectar CM. Colocando la sonda de forma vertical en el centro del diámetro interior, se varía el amperaje y se registra el CM (Fig. 13).

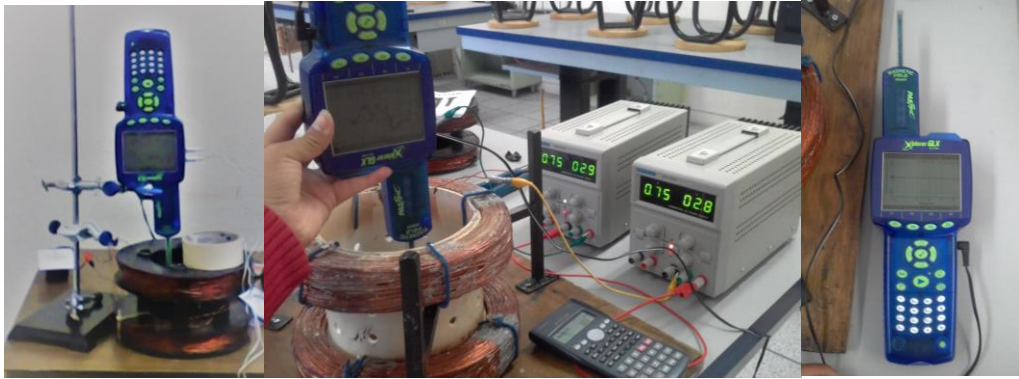


Fig. 13 Caracterización del CM generado por las bobinas. Izquierda. Bobina 1 conectada a “dimmer”, los cables blancos que se observan en el extremo derecho de la bobina son sensores de temperatura. Centro. Bobina 2 conectada a fuentes de poder, se observa la sonda colocada en el centro de la bobina. Derecha equipo utilizado para la medición de CM.

La bobina 1 se utilizó para realizar pruebas con CM variable para lo cual se conectaron en paralelo a CA mediante un “dimmer” de poder. Se realiza una escala arbitraria de corriente al dividir el perno del “dimmer” en ° con ayuda de un compás y transportador, se mide el CM generado en el centro de la bobina durante 300 s obteniendo ondas oscilantes de las cuales se realizan promedios de máximos y mínimos. Debido a que es variable con el tiempo las determinaciones se realizan a diferentes tiempos: 10min, 20min, 30min, 1h.

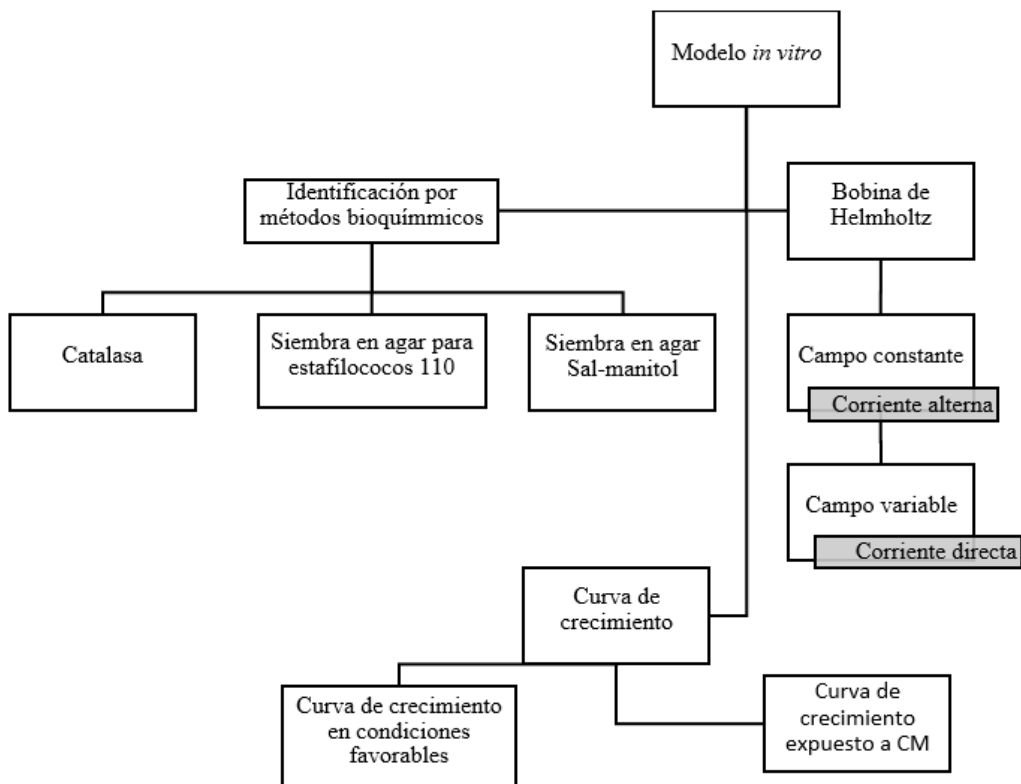
En ambos casos también se registró la temperatura en el centro de la bobina y en la periferia del solenoide. Dado de que el presente trabajo se realiza con bacterias y se pretende ofrecerles condiciones óptimas de crecimiento se ideó un sistema de ventilación tal que permita mantener una temperatura estable en el centro de la bobina de 37°C. Dicho sistema consiste en el caso de la bobina 1 en colocar en el interior un termo de plástico de 10 cm de diámetro y agregar una corriente de aire generada por un ventilador casero variando la distancia en función de la temperatura registrada (Fig. 14 izquierda). En la bobina 2 se agregaron fenestraciones al cilindro interno de la bobina para permitir la circulación del aire, también se agregó la corriente de aire generada por un ventilador casero. Para el caso del experimento *in vivo*, se acondicionó para los ratones una jaula de forma heptagonal hecho con material de

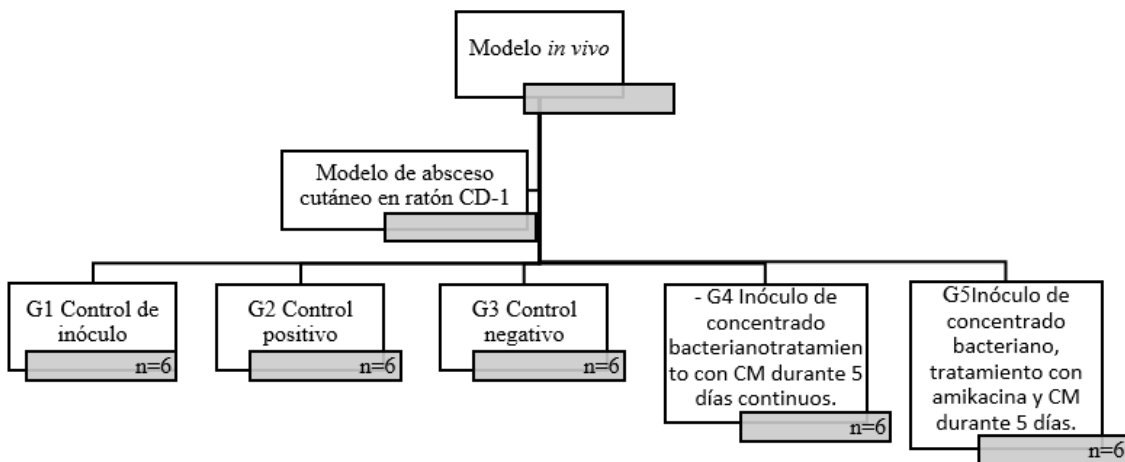
acrílico, las paredes con perforaciones lineales que permitieran circular el aire, en este caso la fuente de aire se mantuvo junto a la bobina (Fig. 14 derecha).



Fig. 14 Monitoreo de la temperatura en las bobinas del Helmholtz. Izquierda, se muestra el sistema utilizado para las pruebas *in vitro*, en amarillo se muestra el termo utilizado para mantener la temperatura estable de las muestras, dentro se encuentra la punta de mercurio del termómetro que se encuentra en el soporte universal. Derecha, sistema utilizado para el modelo *in vivo*.

### 6.7 Diseño experimental





### 6.8 Análisis estadístico

Los resultados se analizan mediante el análisis estadístico de varianza ANOVA de una vía, para la comparación múltiple pareada total seguido de una prueba post hoc de Tukey, utilizando una versión de software Graphpad versión 5.0. Para la prueba de significancia se utilizó alfa ( $\alpha$ ) de 0,05 en la ecuación,  $100 \cdot (1 - \alpha) \%$ , para determinar un intervalo de confianza del 95%. En todos los casos se considerará una diferencia significativa cuando  $P < 0.05$ . Los valores de desviación estándar ( $\pm$ ) se utilizaron entonces como límite superior e inferior de las barras de error para los datos trazados.

## VII RESULTADOS

### 7.1 Pruebas bioquímicas

Del cepario existente en el laboratorio se seleccionaron 11 cepas de *Staphylococcus sp.* a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación: siembra en agar selectivo (agar S.110 y agar sal-manitol) así como prueba de catalasa, las cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .						
Cepa	Agar S.110	Agar Sal-manitol	Catalasa	Biofilm	Tinción de gram (cocos en racimos gram+)	Coagulasa
115F	+	+	+	+	+	+
097A	+	+	+	+	+	+
119F	+	Sin crecimiento	+	+	+	NR
111A	Coloración rosa	Sin crecimiento	+	+	+	NR
106F	+	+	+	+	+	+
119A	+	+	+	+	+	+
104A	+	+	+	+	+	+
104F	+	+	+	+	+	+
115A	+	+	+	+	+	+



108F	+	+	+	+	+	+
098A	+	Sin crecimiento	+	+	+	NR
Se muestran las pruebas bioquímicas para la identificación del <i>S. aureus</i> entre las que se encuentran siembra en agar rico en Sodio, en agar para estafilococos, pruebas de catalasa y formación de biofilm. NR No realizado						

De las 11 cepas existentes se descartaron 3 debido a que no crecieron en el medio rico en sodio y que una de ellas (111A) formó colonias de color rosa en el medio para estafilococos S.110. Por lo que se identificaron 8 cepas como *S. aureus*. A pesar de que la formación de biofilm no es un método de identificación del *S. aureus* es importante determinar su capacidad de formarlo ya que las cepas con dicha capacidad podrían evadir fácilmente el tratamiento antibiótico propuesto.

La identificación de biofilm se realizó mediante la siembra en agar BHI (brain heart infusion) adicionado con sacarosa al 5% y rojo congo. Las cepas positivas para la formación de biofilm se tiñen de color rojo oscuro en tanto que las negativas se mantienen sin cambios en su coloración. En la Fig. 14 se muestra que las 11 cepas analizadas fueron positivas para formación de biofilm demostrado con el aumento en la intensidad de color ya que las cepas productoras de biofilm se pigmentan intensamente con el rojo congo.

a)



b)



Fig. 15 Formación de biofilm. Se muestra la capacidad de formar biofilm por la coloración oscura de las colonias. En sentido de las manecillas del reloj de arriba a derecha: a) 106F, 104A, 097F, 1119A, 115F, 119F. b) 098A, 104F, 104F, 108F, 111A y 115A.

La evaluación de la capacidad para causar hemólisis se realizó mediante siembra en agar sangre (utilizando sangre humana al 5%) en cajas de Petri mediante estría abierta. Esta prueba sólo se realizó a las 8 cepas que crecieron en medio rico en Na, en medio especial S.110 y catalasa positivos. Los resultados se muestran en la Fig.16. El halo claro alrededor del cultivo evidencia hemólisis tipo  $\beta$  en las 8 cepas estudiadas.

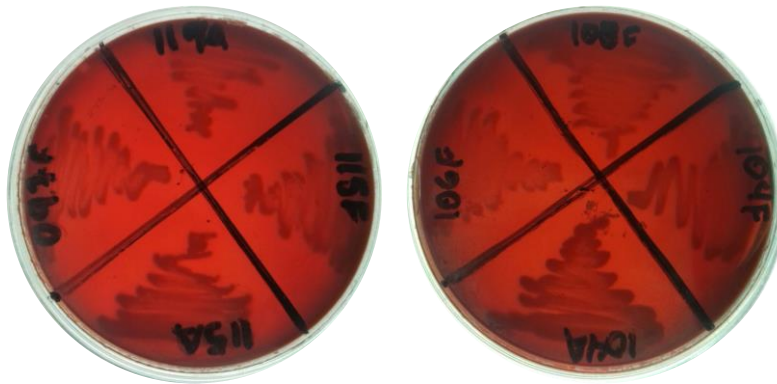


Fig. 16 Hemólisis. Se evidencia la capacidad de causar hemólisis por las cepas seleccionadas, se observa un halo claro alrededor de los cultivos.

## 7.2 Curva de crecimiento

Para realizar la curva de crecimiento mediante la técnica de turbidimetría, primero es necesario obtener la relación entre absorbancia y UFC/ml por lo que de un cultivo inicial se realizan diferentes diluciones y posteriormente se realizan siembras de estas diluciones para realizar conteo de UFC, los datos experimentales se grafican y mediante el principio de mínimos cuadrados se les realiza un ajuste lineal (Fig. 17). De esta gráfica se obtienen los datos para despejar la formula general de la línea recta (Ec. 3)

$$y = a + b * x \quad (3)$$

Dónde:

$y = \text{UFC/ml}$

$a = \text{ordenada al origen en UFC/ml}$

$b = \text{pendiente de la recta}$

$x = \text{Absorbancia}$

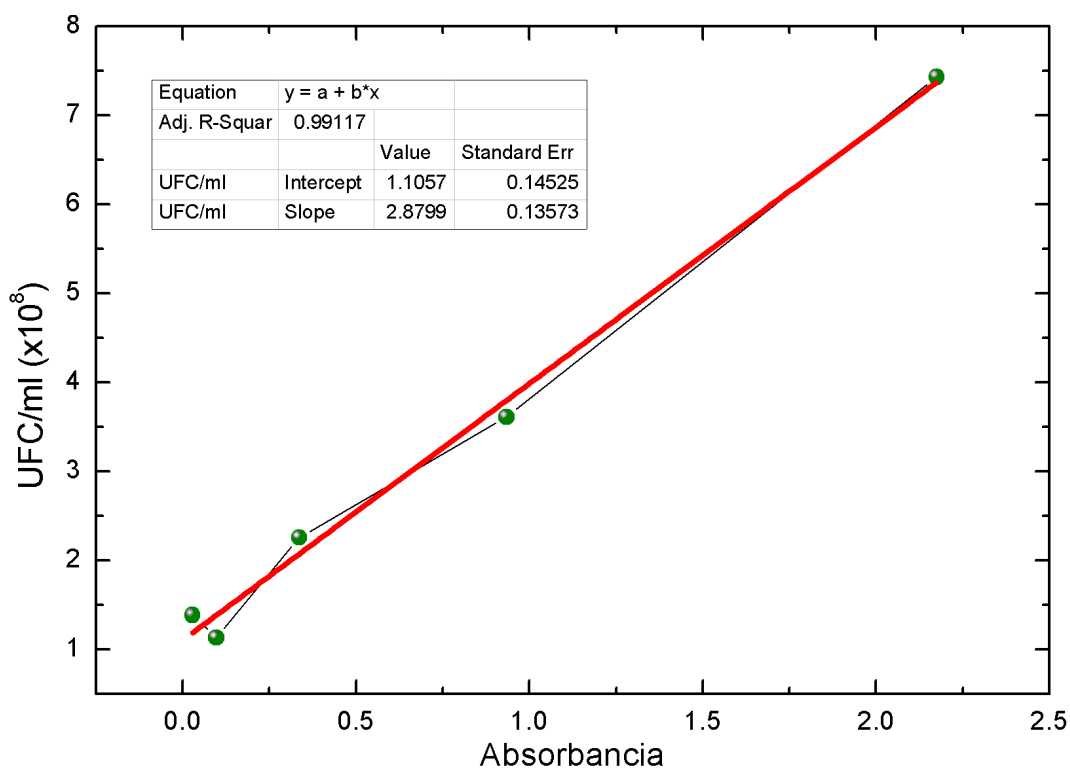


Fig. 17 Regresión lineal. Se muestra el aumento de tipo lineal de las UFC, la línea en color rojo muestra el ajuste lineal a los datos experimentales (puntos en verde) mediante el principio de mínimos cuadrados. Se muestra el valor de la pendiente y de la ordenada al origen con sus respectivos errores.

Con el fin de obtener curvas de crecimiento, despejamos a  $x$  de la ecuación  $y = a + b \cdot x$  (ver Fig.17) para saber cuántas UFC/ml se pueden encontrar conociendo el valor de la absorbancia. Siguiendo esta idea se realizó una curva de crecimiento de la cepa 108F

mediante la técnica de turbidimetría en la que se obtiene el valor de la absorbancia (leída a  $\lambda=540\text{nm}$ ) observando el clásico crecimiento bacteriano (ver Fig.18)

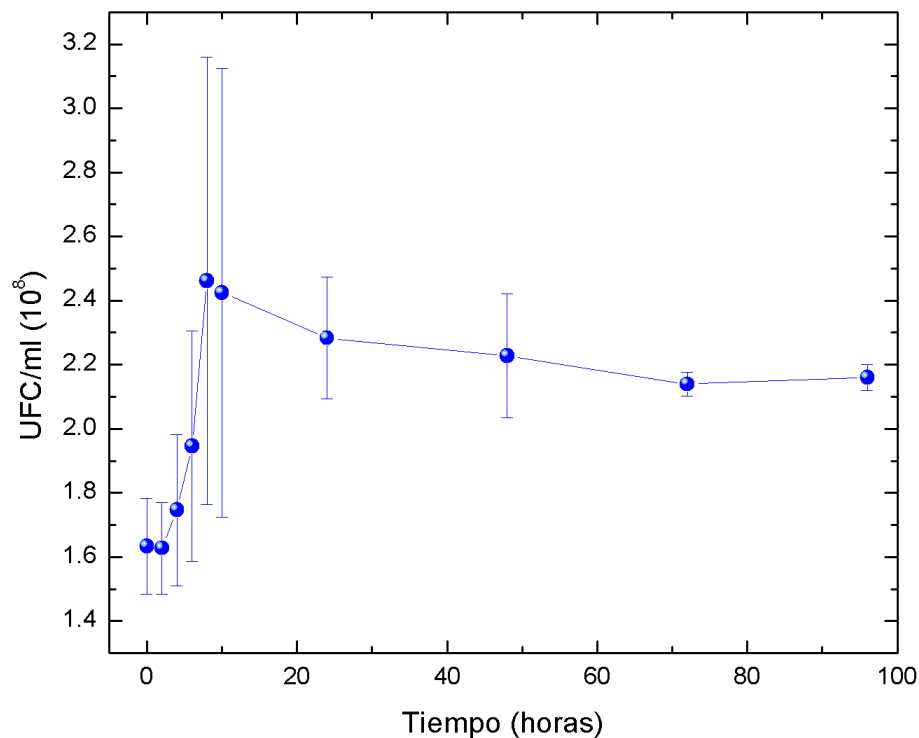


Fig. 18 Curva de crecimiento cepa 108F método de McFarland. Curva de crecimiento obtenida a partir del ajuste lineal de los datos experimentales de la Fig.16. Se observa fase exponencial a las 8 h.

Se puede observar la fase de adaptación entre las 0 y 2h, alcanzando su fase exponencial de las 4 a 8 horas aproximadamente y posteriormente la fase de mantenimiento que se mantiene hasta el término de las determinaciones (96h). Es importante recordar que esta técnica no determina viabilidad ni contaminación.

Del mismo modo se realiza una curva de crecimiento mediante el método de Miles y Misra (ver Fig.19), de un cultivo en caldo nutritivo incubado a 37°C se toman muestras a las 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 h, a las cuales se realizan diluciones  $10^{-1,-2,\dots,-8}$  sembrando las diluciones pares en agar nutritivo e incubando durante 24 h a 37°C para posteriormente contar las UFC.

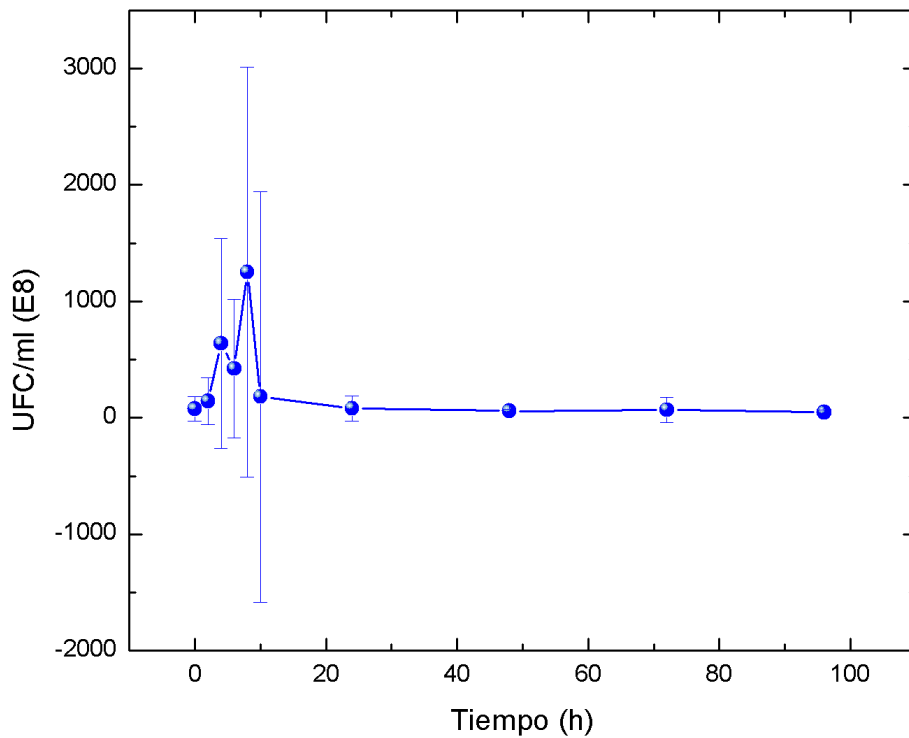


Fig. 19 Curva de crecimiento cepa 108 F mediante la técnica Miles y Misra. Curva de crecimiento calculada con base en conteo en caja de UFC a partir de diluciones.

Se observa que en método de McFarland (ver Fig. 18) la curva obtenida es la esperada: un aumento rápido del número de UFC/ml sin descensos rápidos de la población bacteriana. Mientras que con el método de Miles y Misra no se observa una fase de adaptación, tomando una fase exponencial casi de manera inmediata de las 0 horas hasta las 8 horas, posteriormente se presenta una fase de decaimiento y finalmente la fase de mantenimiento hasta las 96 horas.

### 7.3 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron muestras de las cepas 106F y 119A que son las cepas más representativas de los efectos observados al aplicar CM sobre el *S. aureus*. En la Fig. 20 derecha, se muestra una fotomicrografía obtenida por MEB de la cepa 106F control.

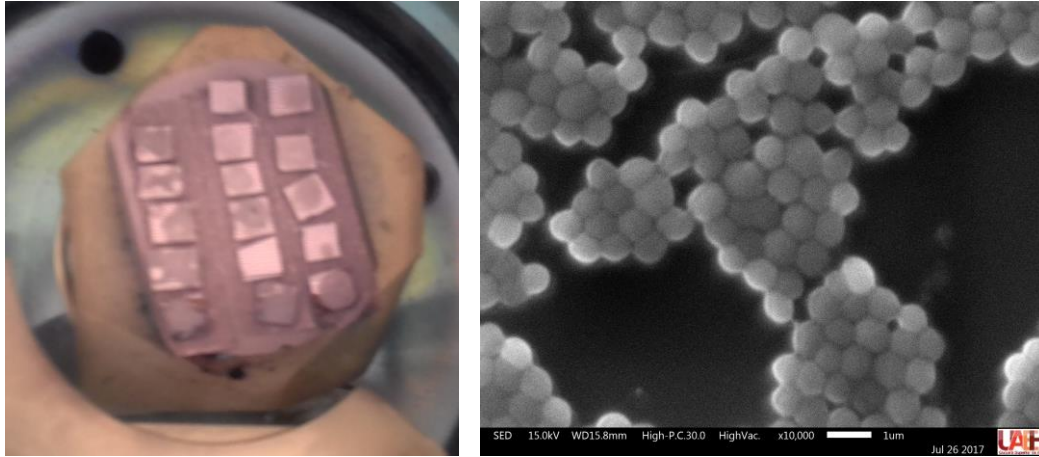


Fig. 20 MEB. Izquierda. Se muestran las muestras recubiertas con la técnica de sputtering, cada cuadro contiene una muestra de cultivo. Derecha. Se muestra el cultivo control de la cepa 106 F, se observan cocos organizados en racimos de uva.

En la Fig. 21 se muestran imágenes de la cepa 119 A al ser expuesta a CMC

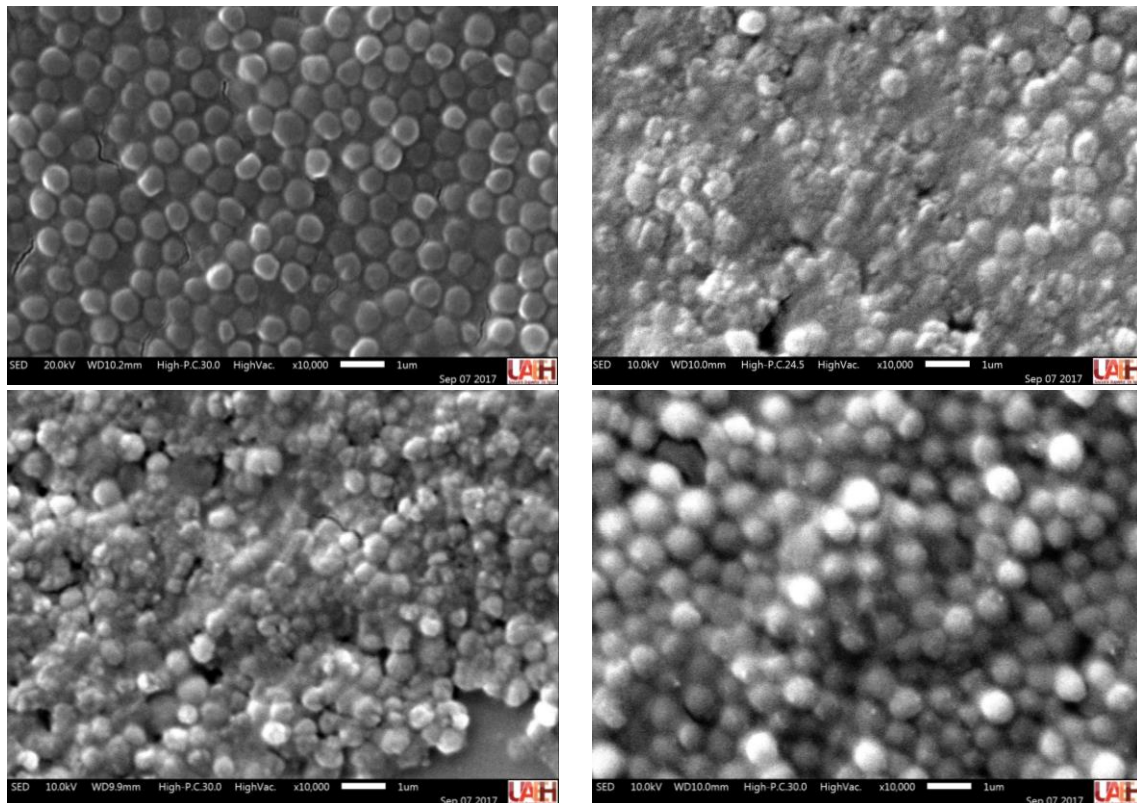


Fig. 21 Fotomicrografía MEB 10 000X de la cepa 119A. Superior izquierda control. Superior derecha expuesta a CMC durante 24 h. Inferior izquierda 48 h de exposición. Inferior derecha 72 h de exposición a 133 G de intensidad de CMC.

## 7.4 Caracterización de bobina 1 y 2

### 7.4.1 Campo magnético constante

Se utilizaron 2 bobinas nombradas bobina 1.

Ambas bobinas se conectaron en serie. Se utilizaron 2 fuentes de poder con capacidad para generar hasta 3A de corriente eléctrica (CD), estas fuentes se conectaron en serie y a ellas se conectaron las bobinas (una a la vez). Se midió el CM en Gauss con Gaussímetro y sensor de campo magnético el cual se colocó en la parte central de las bobinas como se muestra en la Fig. 12. El CM generado por ambas se muestra en la Fig. 22.

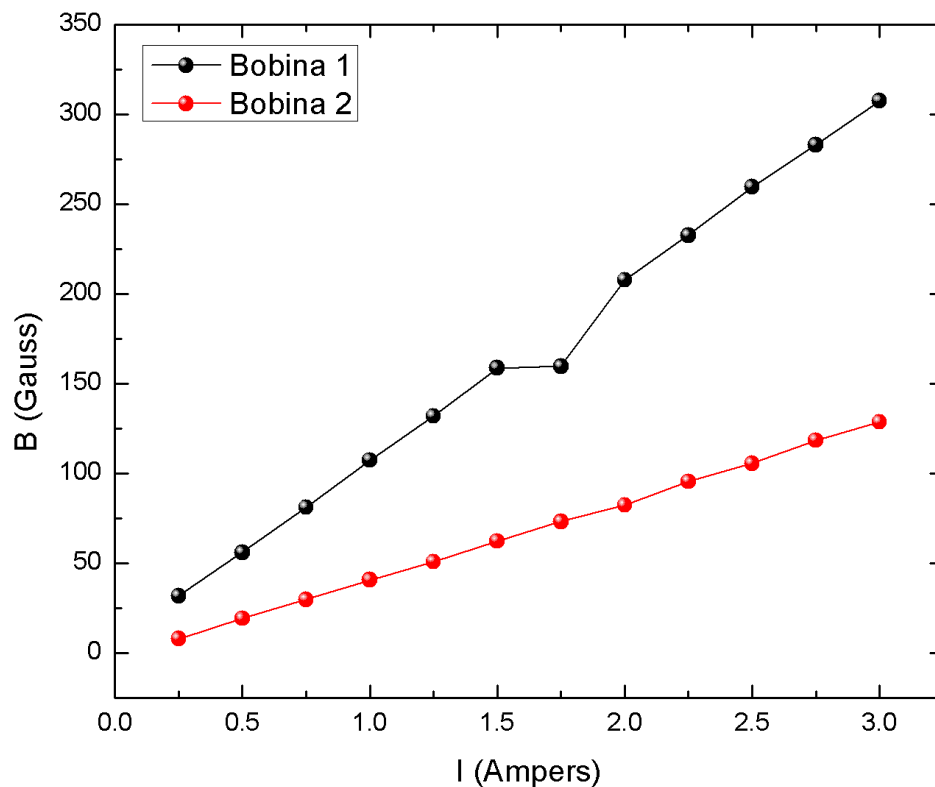


Fig.22 CM generado por las bobinas de Helmholtz. Se observa que el CM generado va en función de la corriente eléctrica. En negro se muestra el CM generado por la bobina 1 (diámetro interno 16cm) alcanzando un máximo de 333G; en rojo el generado por la bobina 2 (diámetro interno 19.5cm) alcanzando un máximo de 133G ambas a 3A de corriente eléctrica.

Se observa que la bobina 1 al mismo amperaje (3A) genera un CMC (campo magnético constante) máximo de 333 G en tanto que la bobina 2 (3A) genera un máximo de 133 G, esto se explica debido a que entre más grande sea la bobina requiere mayor cantidad de alambre de cobre el cual se calienta al pasar por él una corriente eléctrica por lo que al aumentar la resistencia disminuye el CM generado.

### 7.3.2 Campo magnético Variable

Adicionalmente se caracterizó el CMV (campo magnético variable) generado por la bobina 1 conectado a CA a un “dimmer”, al cual se dividió arbitrariamente por grados  $\theta$ , se midió el CM generado del mismo modo que con CMC, los resultados se muestran en la Fig. 23. Las mediciones se realizaron cada 5 min durante 1 h para evaluar si el CM generado era fluctuante con el tiempo (ver Fig. 24).

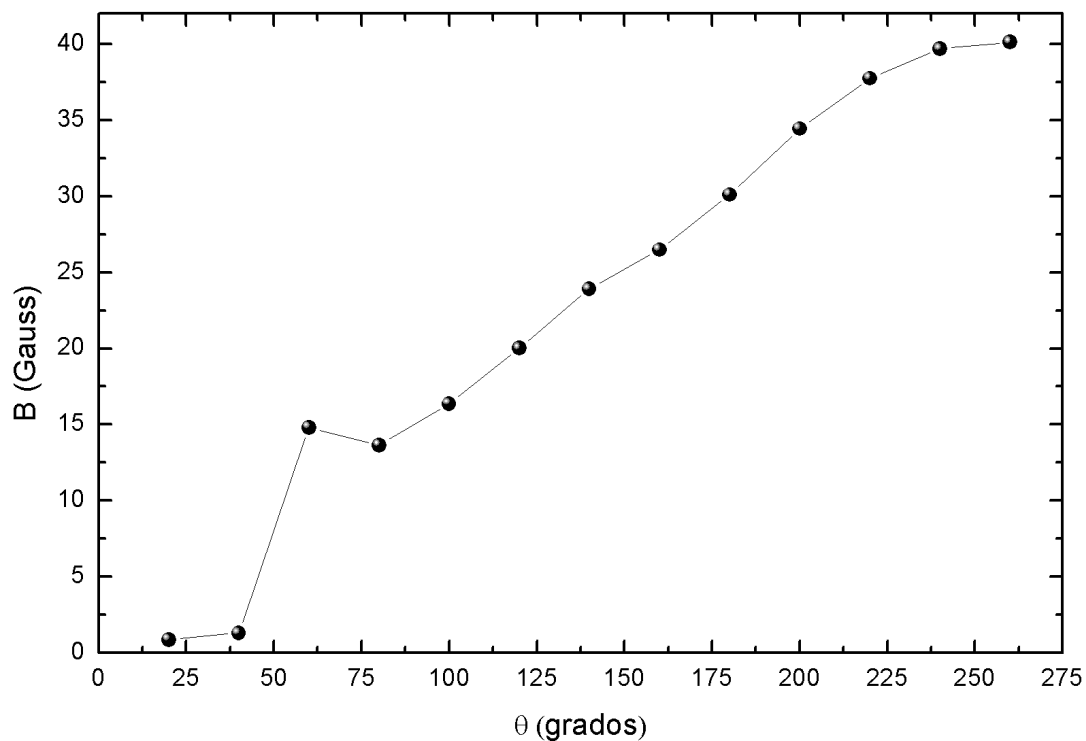


Fig. 23 CMV generado por la bobina 1. Se observa que conforme aumenta  $\theta$ , aumenta también el CM generado por la bobina, con un máximo de 40G a 60Hz y 120V.



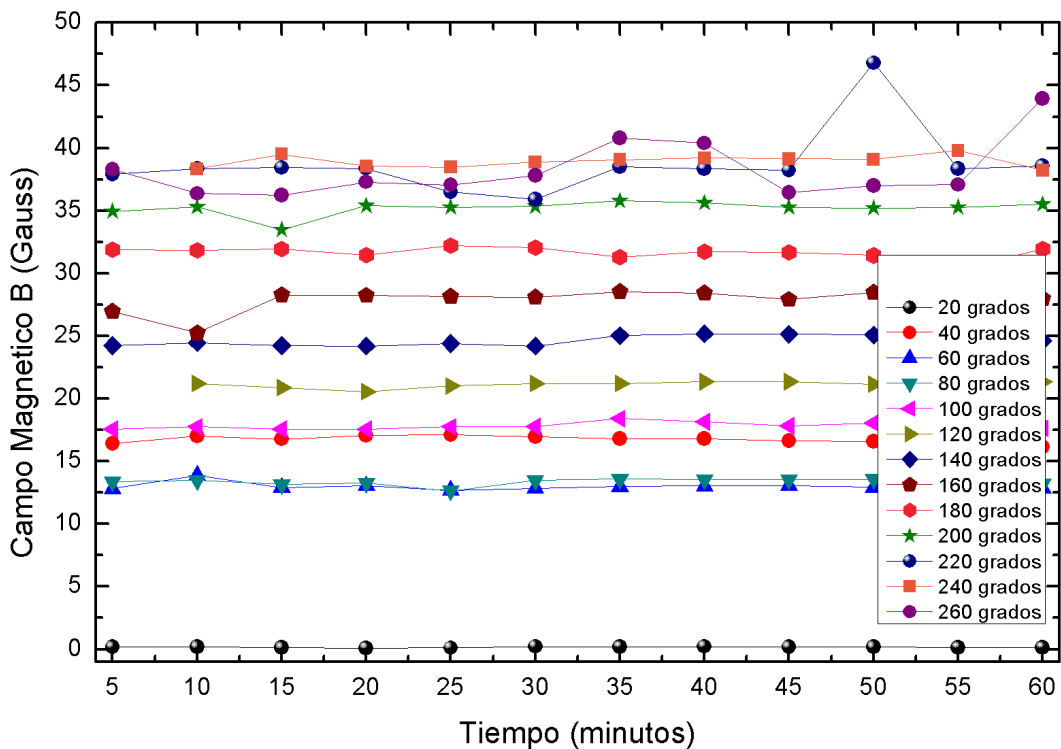


Fig. 24 CMV bobina 1 durante 60 min. A pesar de ser un CM variable se mantuvo relativamente constante a lo largo del tiempo, el máximo a 260° de  $\theta$  se observó mayor fluctuación con una media de 40G.

### 7.5 Efecto del CMV sobre el crecimiento de *S. aureus*

El CMV máximo fue utilizado para realizar curvas de crecimiento de la cepa 108F en caldo nutritivo incubado a 37°C comparado con su control (tomado de una curva de crecimiento en mismas condiciones de tiempo y temperatura pero que no se ha expuesto a CM) como se muestra en la Fig. 25.

Se observa que al exponer la cepa a CMV, hay un aumento de las UFC/ml en las primeras 2 h de incubación seguido de una disminución del crecimiento en todos los puntos, siendo esta disminución más evidente a las 48 h de incubación comparada con su control.

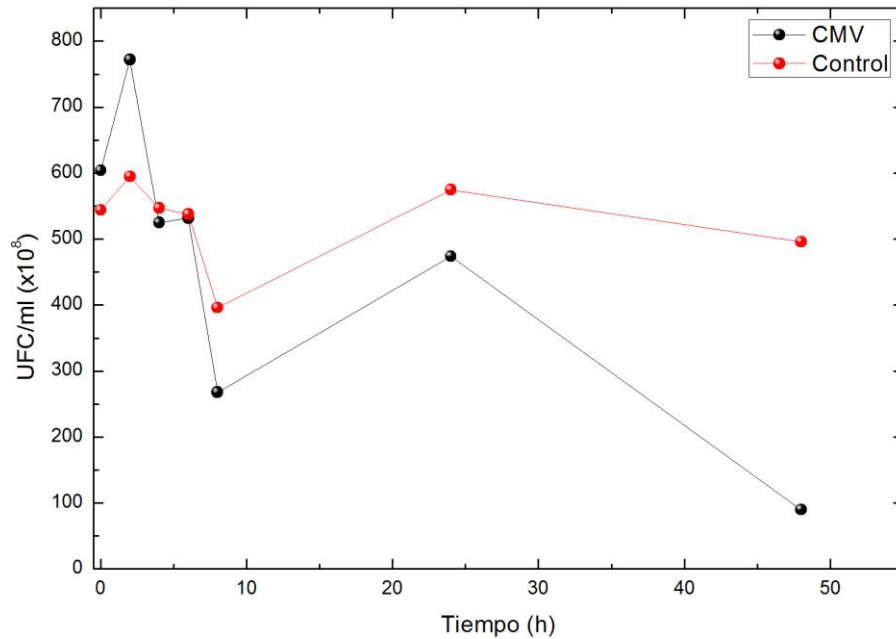


Fig. 25 Curva de crecimiento cepa 108 F sometida a CMV. En color negro se muestra el comportamiento de la cepa 108F al ser sometida a 40 G de CMV, 60 Hz y 120 V comparada con curva de crecimiento control (en color rojo). Se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 24 y 48 h.

### 7.6 Efecto del CMC sobre el crecimiento del *S. aureus*

Con el fin de establecer los parámetros óptimos de CMC en los que se observa la mayor inhibición bacteriana se sometió a la cepa 119A a diferentes intensidades de CMC generado con la bobina 1. Se observa que la intensidad que presentó el mejor resultado fue el correspondiente a 158G ya que, como se muestra en la Fig. 26 desde las 24 y hasta las 48 h de medición muestra resultados muy por debajo de su control.

En la misma gráfica se observa que al someter la misma cepa a 107 G de intensidad de CMC el resultado es opuesto ya que, se observa un aumento en el crecimiento bacteriano desde las 24 h y que se mantiene hasta las 48 h (Ver Fig. 26).

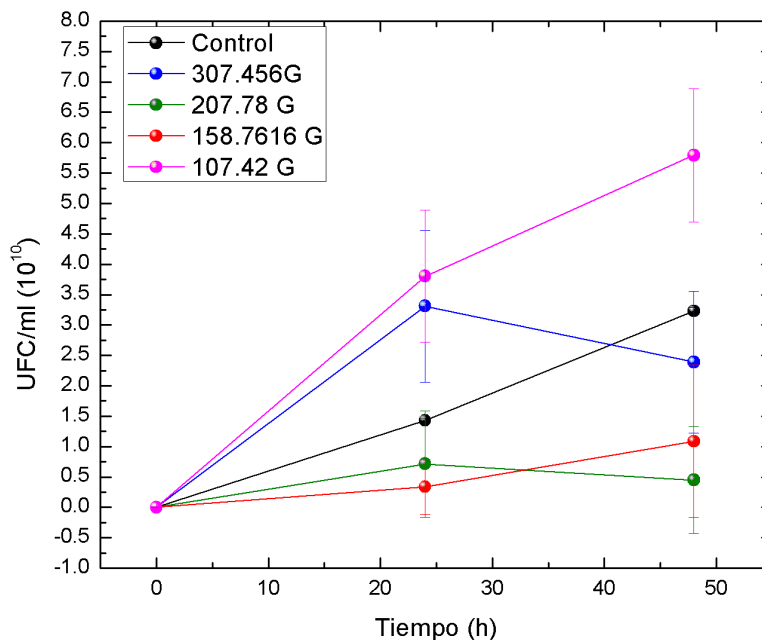


Fig. 26 Crecimiento comparativo durante 48h exponiendo la cepa 119A a diferente intensidad de CM. Cultivos a diferente exposición de CM. Se muestra el comportamiento del crecimiento de la cepa 119A no expuesta a CM (control) y sometida a CMC a distintas intensidades (en todas se mantiene la temperatura a 37°C). Se observa que la exposición a 158.7616 G (en color rojo) disminuye el crecimiento significativamente después de 48 h de exposición comparada con el control (color negro)

Con base en los resultados obtenidos se utilizó el parámetro óptimo para conseguir la inhibición bacteriana. Por lo que se realizaron curvas de crecimiento comparativas de las 8 cepas exponiendo los cultivos a 158 G de intensidad de CMC durante 72h como se muestra en la Fig. 27.

La exposición de las 8 cepas mostró resultados dispersos, ya que no se observó disminución de la cuenta viable de UFC/ml en todas las cepas trabajadas sino que se obtuvo aumento del crecimiento en el 50% de las cepas después de 72h de incubación (Ver Fig. 27). Estas cepas fueron: 119A, 108F, 104F y 097F.

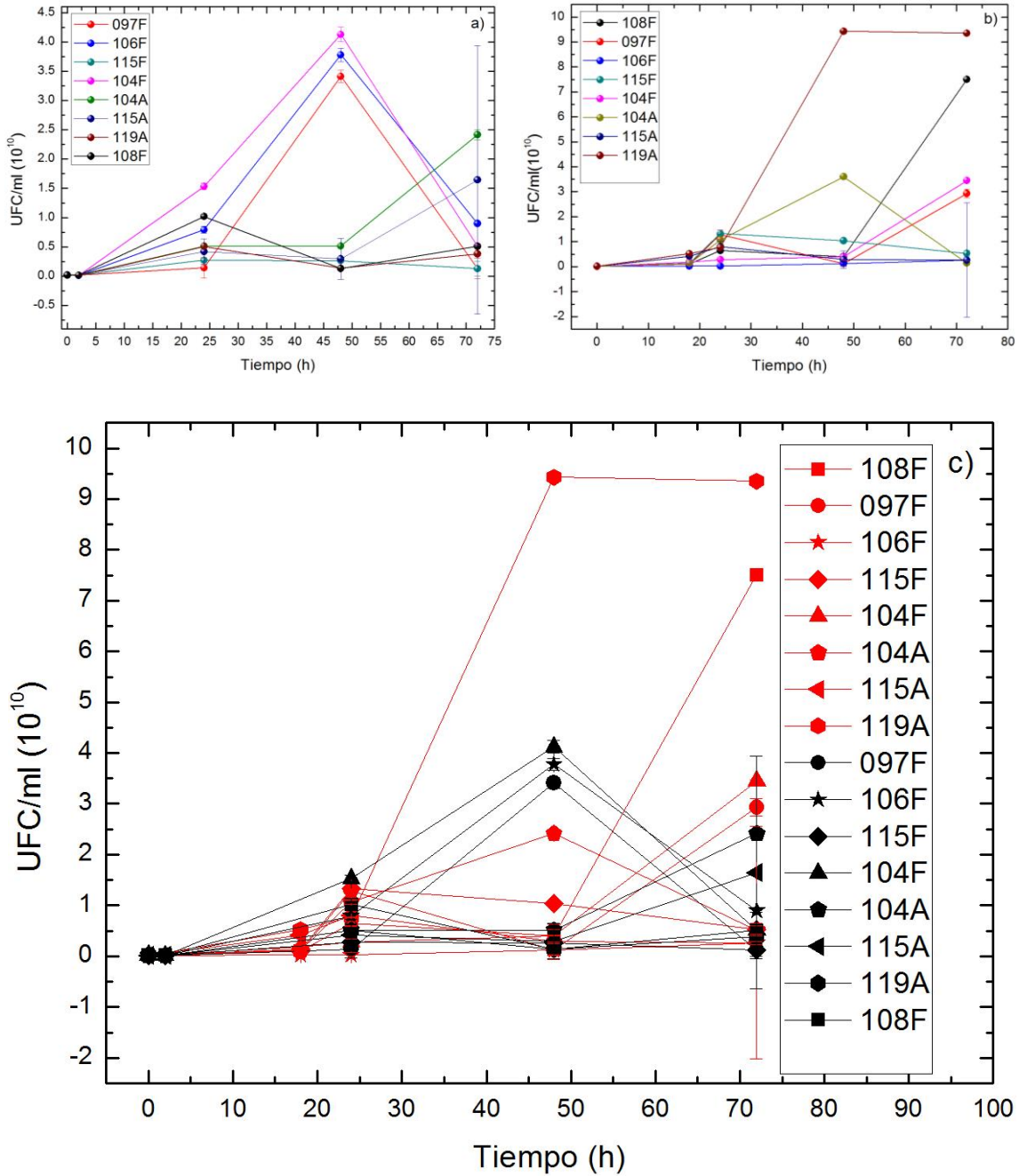


Fig. 27 Curvas de crecimiento de las 8 cepas de *S. aureus* sometidas a 158 G de intensidad de CMC comparadas con su control. a) Control de crecimiento de las 8 cepas, b) cepas sometidas a CM con intensidad de 158G, en ambos casos se realizaron las siembras en agar nutritivo durante 72h incubadas a 37°C. c) Se muestran juntas las curvas de crecimiento, en color negro las curvas de los controles no expuestos a CM y en rojo las sometidas a CM.

A pesar de los resultados dispersos, la cepa 106 F presentó inhibición importante del crecimiento con disminución del número de UFC/ml desde la primera medición, con una disminución máxima del 93% a las 48 h de exposición (ver Fig. 28). Es importante señalar que en la cepa expuesta a CMC no se observa la presencia de fase exponencial de crecimiento.

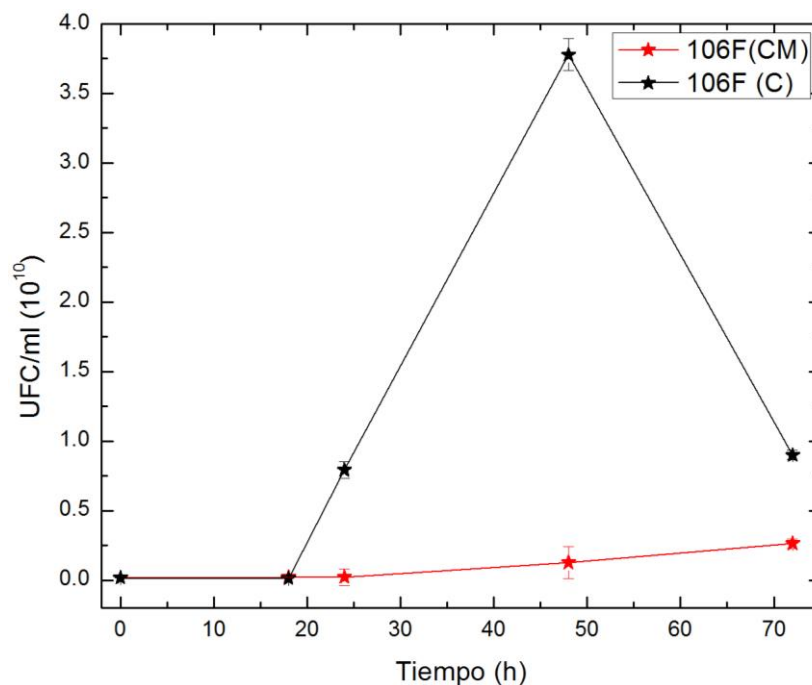


Fig. 28 Comparación de curva de crecimiento de la cepa 106F expuesta a 156 G de intensidad de CMC y no expuesta. En color rojo se muestran el comportamiento de la cepa 106F expuesta mostrando una disminución en la cuenta de UFC/ml desde las 24h y hasta las 72h sin mostrar fase exponencial de crecimiento comparada con la curva control (en color negro). En ambos casos se mantuvo la temperatura a 37°C.

Debido a estos resultados favorables se decidió utilizar la cepa 106 para realizar los experimentos en el modelo *in vivo* de absceso cutáneo.

#### 7.6.1 Efecto de 133G de intensidad de CMC

Para aplicar el CMC a los ratones CD-1 se elaboró la bobina 2 y su campo máximo alcanzado con las fuentes utilizadas fue de 133 G. Se realizó una cinética de crecimiento de 4 cepas con dicho CMC, para evaluar el efecto *in vitro*. Se evaluaron las cepas que presentaron mayor

inhibición (106F y 104A) y mayor crecimiento (119A y 104F) al ser sometidas a 158G esperando resultados similares a los obtenidos (ver Fig. 29).

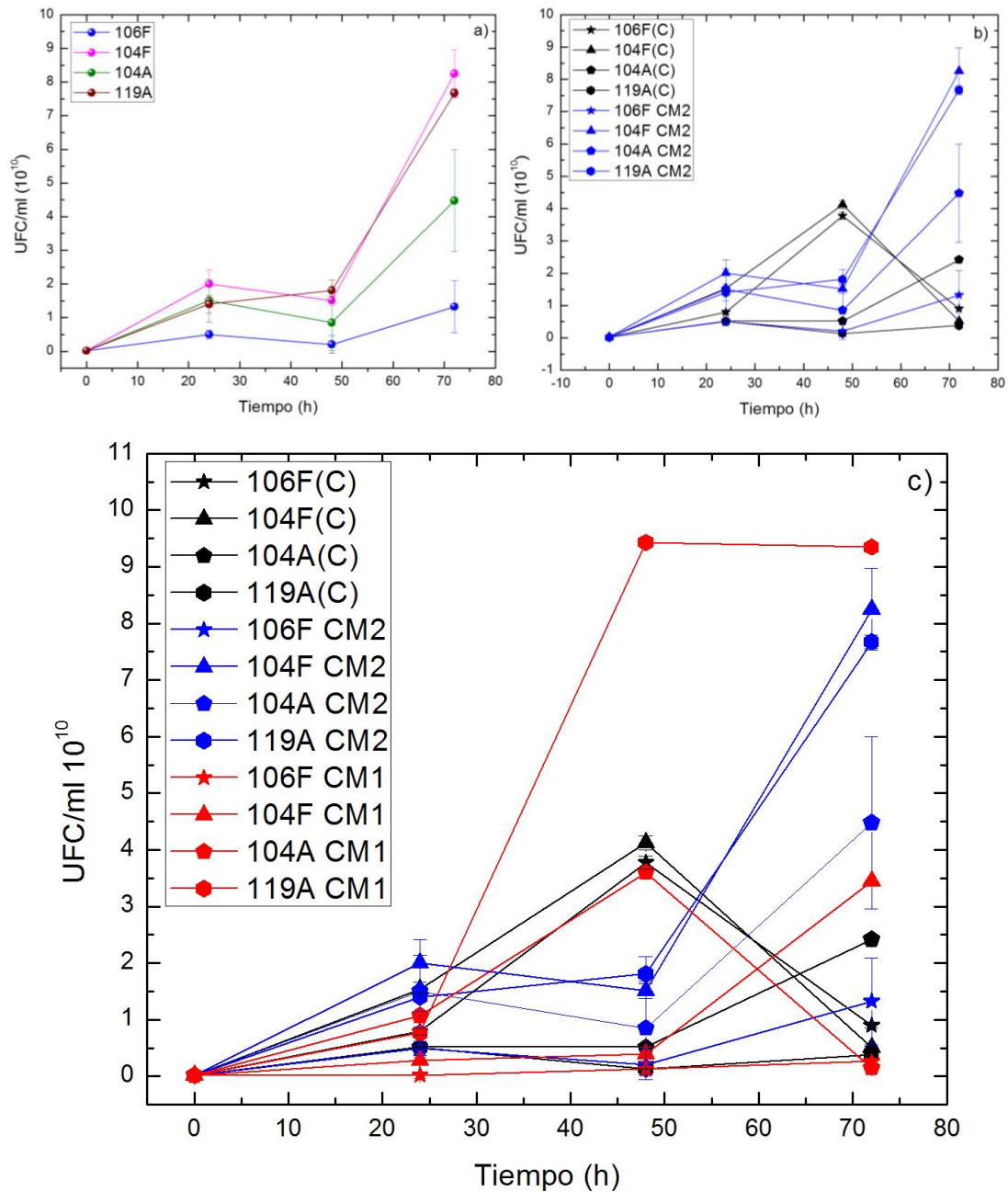


Fig. 29 Curva de crecimiento de 4 cepas sometidas a 133G. a) Crecimiento de las 4 cepas expuestas a 133G. b) Comparación de crecimiento de las cepas expuestas a 133 G con su control no expuesto. c) Comparación de cinética de crecimiento de las cepas expuestas a 158G (rojo), 133G (azul) y su control no expuesto (negro)

## 7.7 Análisis de EDS

El EDS es una técnica de análisis de elemento que se realiza a la par del MEB. Se analizó la composición de las muestras mediante esta técnica (Fig. 30), los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Los elementos sobre los que se observa mayor cambio en las muestras que fueron sometidas a CM son el Ca y el Na.

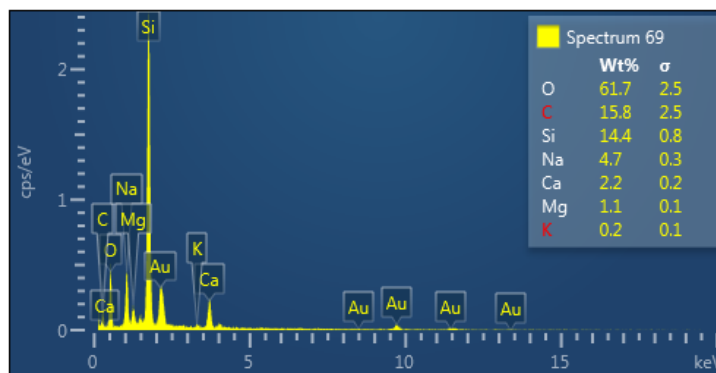


Fig. 30 Análisis de elementos mediante EDS. El EDS es una técnica de análisis elemental. En la tabla superior derecha se observa el elemento analizado, el porcentaje en peso (Wt%) y el error ( $\sigma$ ). Debido a que la muestra fue recubierta con oro, se observan picos correspondientes a este elemento el cual se omite.

En la cepa 106 F se observa una disminución del Ca del 41% desde las 24 h de exposición siendo la disminución más pronunciada a las 48 h de exposición, con una disminución del 64% del Wt (considerando el 100% el Ca obtenido del control). Esta disminución de Ca se mantiene a las 72 h con una disminución del 55%. El Na, al igual que el Ca, presenta su cifra más baja a las 48 h de exposición con una disminución del 68.1%, a las 72 h este porcentaje aumenta y se encuentra en 38.3% (considerando el 100% el Na obtenido del control).

En tanto que la cepa 119A presentó aumento del Ca en las primeras 24 h de exposición del 114%, seguido de una disminución del 42.86% a las 48 y 72 h de exposición a 133G de intensidad de CMC. De igual manera, el Na aumentó 86.6% en las primeras 24 h de exposición y disminuyó a las 48 h un 46.7%, finalmente a las 72 h de exposición presentó una disminución del 33.3 % (considerando como 100% el Ca y Na obtenido del control respectivamente).

Tabla 4. Análisis EDS de las cepas 106F y 119A al ser expuestas a CMC a diferentes tiempos.										
Cepa 106 F										
Elemento	Control		24 h (CMC)		48 h (CMC)		72 h (CMC)		24 h (333G)	
	Wt%	$\Sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\Sigma$
C	15.8	2.5	20.1	1.7	22.9	2.0	21.0	2.4	21.2	1.5
O	61.7	2.5	65.8	1.7	68.6	2.0	66.6	2.4	66.8	1.5
Na	4.7	0.3	3.2	0.3	1.5	0.2	2.9	0.2	2.8	0.1
Mg	1.1	0.1	0.6	0.1	0.5	0.1	0.6	0.1	0.6	0.1
Si	14.4	0.8	9.1	0.4	5.6	0.3	7.7	0.4	7.5	0.3
K	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0
Ca	2.2	0.2	1.3	0.1	0.8	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1
Total:	100		100		100		100		100	
Cepa 119A										
Elemento	Control		24 h (CMC)		48 h (CMC)		72 h (CMC)		24 h (333G)	
	Wt%	$\Sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\sigma$	Wt%	$\Sigma$
C	19.8	1.0	11.6	1.7	22.4	2.1	22.4	1.9	9.0	1.7
O	65.6	1.0	58.1	1.7	68.2	2.1	68	1.9	55.1	1.7
Na	3.0	0.2	5.6	0.3	1.6	0.2	2.0	0.1	8.4	0.4
Mg	0.8	0.1	1.3	0.2	0.4	0.1	0.5	0.1	1.7	0.2
Si	9.4	0.3	20.4	0.8	6.3	0.3	6.0	0.3	7.5	0.3
K	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0
Ca	1.4	0.1	3.0	0.2	0.8	0.1	0.8	0.1	3.1	0.2
Total:	100		100		100		100		100	
Wt% Porcentaje en peso. $\sigma$ error de Wt. Control: Cultivo incubado 24 h sin exposición a CM. (CM): cultivo expuesto a 133G de intensidad de CMC a diferentes tiempos. (CM) b: cultivo expuesto durante 24 h a 333G de intensidad de CMC.										



### *7.8 Evaluación del efecto del CMC sobre la respuesta a antibióticos*

Se evaluó la respuesta de las 8 cepas seleccionadas a 12 antibióticos mediante antibiograma. Se consideró como control el resultado del antibiograma de cada cepa sin ser expuesto a CM. Las cepas problema se sometieron a 133 G de intensidad de CMC en la bobina 2 durante 24 h, manteniendo una temperatura constante de 37°C.

Se observa aumento en la sensibilidad de 6 de las 8 cepas estudiadas para al menos uno de los antibióticos evaluados. La Enoxacina fue el antibiótico que presentó el mayor número de casos en los que se observó mejora en la respuesta, observando que en 5/8 de las cepas estudiadas pasaron de ser resistentes en los controles a sensibles en las cepas expuestas a CMC.

Los antibióticos que también mostraron mejoría en el antibiograma fueron Eritromicina y Trimetoprim/Sulfametoxazol en 4/8 de las cepas estudiadas. En el caso particular de Eritromicina se observó disminución de la sensibilidad en 1/8, mientras que la mejora en el antibiograma pasó de intermedia a sensible y de resistente a intermedia.

El caso más importante de disminución de la sensibilidad se observó en las cefalosporinas evaluadas mediante Cefotaxima y Ceftriaxona ya que ambas presentaron disminución de la sensibilidad en 5/8 y 4/8 de las cepas estudiadas respectivamente.

Las cepas que presentaron mejora en la sensibilidad antibiótica son: 115A en 5/12 antibióticos estudiados pasando a ser sensibles, 115F con 4/12 mientras que 119A y 104A ambas con 3/12. Así como algunas cepas presentaron mejora al ser expuestas a CM, otras presentaron disminución en la sensibilidad siendo las cepas 108F, 104F y 097F las más representativas pasando de ser sensibles a presentar una sensibilidad intermedia, medio sensibles o llegando a ser resistentes en 2/12, 3/12 y 2/12 de los antibióticos evaluados respectivamente (Ver Tabla 5).

Antibiótico	108F		104F		119A*		115F*		115A*		104A*		106F		097F		↑sen	↓sen
	C	C M	C	C M	C	C M	C	C M	C	C M	C	C M	C	C M	C	C M		
AK	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
AM	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
CF	S	I	I	R	I	S	R	R	R	S	M	R	I	R	S	I	2/8	5/8
CRO	S	M	S	M	S	M	I	M	I	M	S	S	S	S	S	M	2/8	4/8
CL	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
DC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
E	R	R	I	R	I	S	I	S	R	I	R	S	R	R	S	S	4/8	1/8
ENX	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	6/8	
GE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
NET	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
P	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
TMP/SXT	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	4/8	
↑sen			2/12		3/12		4/12		5/12		3/12		1/12					
↓sen	2/12		3/12		1/12						1/12		1/12		2/12			

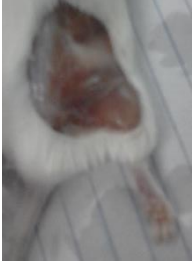


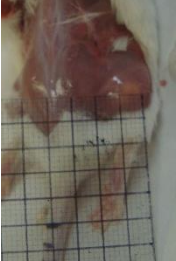
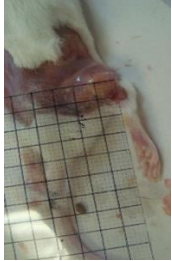
Se muestran los resultados del antibiograma realizado a las 8 cepas no expuestas a CM (C) y los sometidos a 133G de intensidad de CMC (CM). Para las abreviaturas S= sensible, R= resistente, MS= medio sensible, I= intermedio, sen= sensibilidad. Para las abreviaturas de antibióticos véase material y métodos. Enmarcados se muestran los antibióticos sobre los cuales se observó mayor cambio en la respuesta sensibilidad-resistencia al ser sometidos a CM. En color rojo se muestran los casos en los que disminuyó la sensibilidad. En color verde los casos en los que aumentó la sensibilidad. Los asteriscos muestran las cepas en las que se observó mejoría en la respuesta.

### 7.9 Efecto del CMC sobre la formación de abscesos cutáneos en un modelo murino.

Se estableció el modelo de absceso tomando en cuenta las aportaciones de Husein<sup>75</sup>. Se probó inoculación por vía subcutánea convencional, es decir en el espacio inter-escapular de los

ratones, sin embargo el uso de esta técnica ocasionaba mayor riesgo de abscesos metastásicos así como muerte por sepsis. Por lo que se optó por inyectar el concentrado bacteriano directamente el sitio deseado. Por la facilidad de acceso se decidió realizar la inoculación en el muslo de los ratones vía subcutánea.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la disección después del tratamiento establecido para cada grupo. La disección se llevó a cabo posterior al sacrificio de los ratones en cámara de eutanasia mediante CO<sub>2</sub>. Una vez medidos los abscesos identificados, se tomó muestra del material secretado para realizar una siembra en placas de agar nutritivo con el fin de verificar la presencia del *S. aureus*, y se repitieron las pruebas de identificación al cultivo resultante. Se realizó tinción de gram directo del absceso y finalmente se realizó una disección de piel completa en busca de abscesos metastásicos siendo negativa la búsqueda en todos los grupos.

Tabla 6. Absceso subcutáneo en los diferentes grupos de experimentación				
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
				
Inoculo de NaCl vía SC. Tx a las 72h con NaCl vía IP.	Inóculo de [] bacteriano vía SC. Tx a las 72h con NaCl vía IP.	Inóculo de [] bacteriano vía SC. Tx a las 72h con Amikacina vía IP.	Inóculo de [] bacteriano vía SC. Tx a las 72h con 133G de CMC ininterrumpidos.	Inóculo de [] bacteriano vía SC. Tx a las 72h con amikacina vía IP y sometidos a 133G de CMC
NaCl. Cloruro de sodio. SC vía subcutánea. IP vía intraperitoneal. Tx tratamiento. [] concentrado.				

Los abscesos fueron medidos con una hoja milimétrica y los resultados se expresados en mm<sup>2</sup>. Se realizó un análisis de ANOVA de un factor para los 5 grupos seguido de una comparación múltiple de Tukey. Se observa una disminución del tamaño del absceso estadísticamente significativa al ser tratados con amikacina comparados con el control

positivo (tratamiento con NaCl). El resultado al ser tratados con CMC fue muy similar al obtenido con amikacina y de igual manera fue estadísticamente significativo (ver Fig. 31).

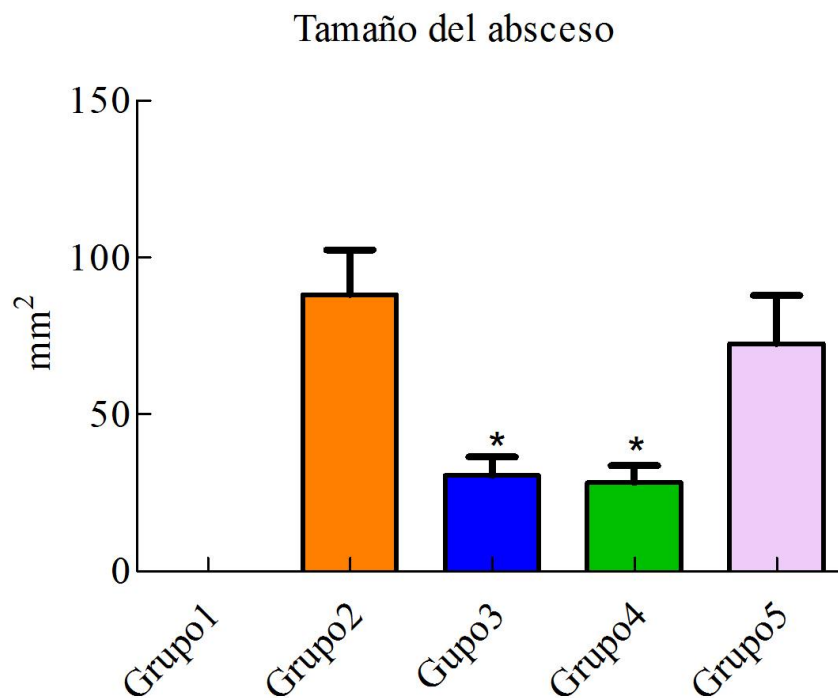


Fig. 31 Tamaño de los abscesos en los grupos de experimentación. Los asteriscos indican resultados estadísticamente significativos con una  $p < 0.005$  al realizar ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Los grupos 3 y 4 son estadísticamente significativos comparados con el grupo 2.

## VIII DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tienen los campos magnéticos constantes sobre la viabilidad del *S. aureus* y sobre su capacidad de formar abscesos en un modelo *in vivo*, los resultados obtenidos se discuten a continuación.

### 8.1 *S. aureus* crece en medio de cultivo rico en sodio, además de ser catalasa positivo.

A partir de 11 cepas existentes en el cepario del laboratorio anexo de histología del ICSa previamente identificadas como *Staphylococcus sp.*, las cuales fueron aisladas de pacientes a partir de exudado faríngeo (nombradas con número seguido de la letra F) y de abscesos superficiales de la piel (A) se realizaron pruebas bioquímicas para identificar la especie.

Una vez conocidas las características de *S. aureus*, se realizó primero una tinción de gram, luego siembra en agar rico en sodio (agar sal-manitol) y medio selectivo para estafilococos, así como prueba de catalasa y finalmente una prueba de coagulasa las cuales se observan en la tabla 3. Al finalizar las pruebas se descartaron tres cepas puesto que no cumplieron con los criterios de identificación quedando así 8 cepas de *S. aureus*.

Considerando el origen de las cepas 111A y 098A, es muy probable que la especie aislada sea *S. epidermidis* ya que usualmente se encuentra colonizando la piel formando parte de la flora normal. Esto se confirmó en la siembra en agar para estafilococos 110 en la cual las colonias se tiñeron de rosa<sup>16,22</sup>.

Debido a que *Staphylococcus sp.* es muy parecido morfológicamente a *Micrococcus* no es suficiente realizar una identificación microscópica. Las colonias de las cepas 111A y 098A sembradas en agar para estafilococos 110 adquirieron una coloración rosa característica de *S. epidermidis*<sup>16,72</sup>. Por otro lado la cepa 111F no presentó crecimiento en los medios de cultivo utilizados, los cuales son especiales para permitir el desarrollo de bacterias tolerantes a altas concentraciones de NaCl, por lo que se descarta que sea debido a las características mencionadas. Estas tres cepas fueron eliminadas para efectos del estudio.

## 8.2 Curva de crecimiento de la cepa 108F de *S. aureus* estudiada

Se realizó la curva de crecimiento de la cepa 108F en caldo nutritivo incubado a 37°C a lo largo de 96 h. Se utilizó de forma aleatoria una de las 8 cepas identificadas (108F), mediante los métodos de turbidimetría y cuantificación de UFC/ml (ver Fig. 18 y 19) para conocer el comportamiento típico de la bacteria *S. aureus*. Esta curva se utilizó como parámetro del crecimiento convencional puesto que se facilitaron las condiciones favorables para la reproducción bacteriana.

Se puede observar que las bacterias alcanzan su máximo crecimiento a las 48 h de incubación, presentando una meseta desde las 72 h hasta las 96h. Esto sugiere que se desarrolla con relativa rapidez y que antes de 4 días se puede observar un ciclo de vida completo lo que permite demostrar si los CM afectan o no el desarrollo de las bacterias. Por este motivo se estableció un tiempo de cultivo de 72h. Como se mencionó anteriormente durante el crecimiento bacteriano se pueden identificar tres fases: adaptación, exponencial y estacionaria<sup>11</sup> las cuales se observan en la Fig. 18.

## 8.3 El CM alcanzado es mayor al generar CMC en la bobina 1 al emplear corriente directa.

Se ensamblaron dos bobinas de Helmholtz con diferentes diámetros internos: 16 y 19.5 cm (bobina 1 y 2) Se conectó la bobina 1 a corriente alterna mediante un “dimmer” generando un CMV cuya máxima intensidad fue de 40G a 60Hz y 120V. Posteriormente se generó un CMC conectando las bobinas a dos fuentes de poder alcanzando una intensidad máxima de 333G a 3 A en la bobina 1, mientras que aplicando la misma corriente eléctrica en la bobina 2 se obtuvieron 133G como se observa en la Fig. 22.

La diferencia de intensidad entre ambas bobinas aun cuando se aplica la misma corriente eléctrica se debe al tamaño de cada una. Al aumentar el diámetro de una bobina se requiere una mayor cantidad de alambre de cobre, esto aumenta la resistencia eléctrica de la bobina disminuyendo con ello la corriente eléctrica y por tanto el CM generado<sup>57</sup>.

#### *8.4 El CMC a 158G de intensidad demostró afectar el crecimiento de S. aureus*

Se realizaron cultivos comparativos de la cepa 119A aplicando un CMC a diferentes intensidades durante 48h, tomando inóculos cada 24h comparándolos con el crecimiento de la bacteria incubada convencionalmente como se muestra en la Fig.25.

Se observó que al aplicar 107G de CMC aumentó la cuenta de UFC/ml incubadas durante 24h y disminuyendo a las 48h casi a valores normales debido probablemente a un aumento del metabolismo celular tal y como lo reporta Nawrotek en diversos estudios<sup>81,100,101</sup> al evidenciar aumento del metabolismo de *E. coli* y *S. aureus* al aplicar 30 mT de CM. Es posible que después de un periodo de adaptación el sistema regrese a niveles “normales”, lo cual explicaría la disminución de UFC/ml pasadas 48h. Mientras que la aplicación de 158G demostró que produce la disminución del número de UFC/ml desde las 24 h y manteniendo la inhibición a las 48h, por este motivo se decidió utilizar esta intensidad de CM para los experimentos posteriores.

La diferencia de crecimiento a diferentes intensidades coincide con lo reportado por diversos autores quienes concuerdan que el efecto de inhibición o estimulación en los organismos depende de la intensidad, frecuencia, forma de las ondas y tiempo de exposición<sup>72,80,81,86,101-103</sup>.

#### *8.5 Cambios en la composición química de las muestras expuestas a 133G de CMC*

Lo elementos que mostraron mayor afectación fueron el Ca y el Na. Mientras que en la cepa 106F hay una notable disminución de ambos elementos desde las 24 h, las disminuciones más pronunciadas se corresponden con la disminución del crecimiento bacteriano que se muestra en la Tabla 4 y Fig. 29.

En tanto que, la cepa 119A mostró un importante aumento en ambos elementos desde las 24 h, sin embargo, a diferencia de la cepa 106F, este aumento no es idéntico en el tiempo que presenta aumento en crecimiento bacteriano ya que, el punto máximo de crecimiento

alcanzado es a las 48h, mientras que, el máximo aumento de Na y Ca se observa desde las 24h.

### *8.6 Cambios en el antibiograma después de la exposición a 133G de CMC durante 24h*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron cambios en la respuesta antibiótica de las cepas expuestas comparadas con su control el cual se obtuvo al incubar la cepa a condiciones convencionales. Se observó disminución de la sensibilidad a cefalosporinas evaluada con cefalotina y ceftriaxona.

Recordemos que el mecanismo de acción de las cefalosporinas es a nivel de la pared bacteriana al unirse de forma covalente a enzimas transpeptidasas las cuales participan en el último paso de la formación de peptidoglicano bloqueando así la síntesis de la pared bacteriana<sup>104</sup>. Es posible que el CM facilite la síntesis de nuevas enzimas transpeptidasas o que mejore la acción de las enzimas que no están unidas al fármaco ya que como lo reportó Nawrotek y cols. la exposición de *E. Coli* y *S. aureus* a CM puede alterar su metabolismo<sup>101</sup>.

Se observó también cambios en la respuesta a la eritromicina con mejoría de la sensibilidad en 4 de las 8 cepas estudiadas: 119A, 115F, 115A y 104A pasando de ser intermedio o resistente a sensible. Sólo en un caso presentó aumento en la resistencia de la cepa 104F. La eritromicina pertenece al grupo de los macrólidos, su mecanismo de acción es mediante la unión a la subunidad 50S ribosomal inhibiendo la actividad de la peptidil transferasa. Interfiere así con la unión del péptido entre el aminoácido en el RNAt y la cadena de péptidos que crece, es decir, con la síntesis de proteínas durante la traducción<sup>105</sup>. Es posible que el efecto del CM a este nivel favorezca la unión del fármaco con su sitio de acción resultando en una mejora a la sensibilidad.

En los reportes estudiados hasta el momento se muestra mejora en la sensibilidad antibiótica como lo refiere Segatore<sup>87</sup> quien reporta disminución en el número de UFC/ml al exponer bacterias crecidas en medio adicionado con antibióticos en concentraciones mínimas inhibitorias a CEM. Por lo que plantea la hipótesis de una interacción entre el campo



electromagnético y el proceso de captación bacteriana de los antibióticos aminoglucósidos. Del mismo modo Cellini<sup>106</sup> plantea que la exposición a CEM actuaría como un factor de estrés, lo mismo podría suceder al utilizar CM y por esta razón retarda el crecimiento de las bacterias haciendo más efectiva la acción de los antibióticos.

### *8.7 Cambio en el crecimiento in vitro de las cepas expuestas a CM comparadas con sus controles*

Se evaluó el crecimiento de 8 cepas de *S. aureus* sometidos a 158G de CM a 37°C durante 72h tomando muestras cada 24h para compararlos con el crecimiento convencional de la bacteria. Se consideró como control a la curva de crecimiento de la cepa 108F obtenida a partir de la siembra en caldo nutritivo, a 37°C en incubadora bacteriológica.

En la Fig. 27 se observa que las cepas sometidas a CMC no se comportan de la misma manera a pesar de ser de la misma especie (y por lo tanto compartir la morfología y ciclo vital). Se observa que 4 de las 8 cepas sometidas a CM presentaron un aumento en el crecimiento mientras que en las 4 restantes presentaron una disminución en el crecimiento respecto de su control.

Se sabe que la aplicación de CM es capaz de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos mediante el cambio del porcentaje de elementos presentes en la pared celular<sup>77</sup>, características de la membrana celular<sup>82,107</sup>. Desde el punto de vista físico, se supone que la interacción principal entre el campo magnético y el organismo ocurre en la membrana celular y más específicamente en los canales iónicos, siendo los canales de calcio los más afectados<sup>107</sup>.

La aplicación de CM también han demostrado conducir a alteraciones en la reproducción medidas en la cantidad de ARNm, expresión génica, así como modificaciones en la biosíntesis de proteínas y actividades metabólicas<sup>101</sup> y enzimáticas<sup>68</sup>, así como alteraciones en la morfología celular<sup>74,83,108,109</sup>.

Esta capacidad de influir en los procesos biológicos también han sido aprovechados para aumentar el crecimiento, sobre todo en plantas y levaduras útiles en la industria<sup>68,69,73</sup>. Siendo aplicados en semillas de maíz y soja observando un aumento en el rendimiento debido a que el CM direcciona el crecimiento de Norte-Sur cuando se aplica de forma vertical, y notablemente sin observar cambios cuando se aplica el CM en forma transversal. También se encuentran estudios en los que se demuestra la estimulación del crecimiento al someter a CM microorganismos patógenos como *E. Coli* y *S. aureus* como lo señala Fijał<sup>100</sup> al aplicar CM rotante (frecuencia de 50 Hz, B de 22-34 mT). En este caso se observó un aumento en el crecimiento mediante aumento en la actividad metabólica bacteriana medida mediante el exámen MTT el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol y permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas mediante la detección de deshidrogenasa de microorganismos vivos.

Por su parte en el ámbito de inhibición de microorganismos Balderas<sup>77</sup> reporta que al someter cultivos de *S. aureus* a 18mT de CMV y observar los cultivos resultantes con microscopía electrónica de barrido se observa la disminución de K, Ca y Mg y aumento de Na, Fe, Al, O, N en la superficie celular. Por su parte Ahmed<sup>86</sup> evidenció cambios morfológicos de pared celular y citoplasma al someter a CM bacterias gram positivas y gram negativas. En tanto que Cellini<sup>106</sup> reporta un aumento en la expresión de los canales de Ca<sup>+</sup> dependiente de voltaje. Todos estos cambios observados previamente son consistentes con los cambios observados en los cultivos de *S. aureus* al ser sometido a CM por lo que es probable que se deban a cambios en la pared celular y alteraciones en el intercambio de sustancias en la membrana, sin embargo, es importante mencionar que en el presente trabajo no se estudió a fondo este aspecto.

Aún cuando se esperaba que las 8 cepas disminuyeran su crecimiento puesto que se trabajó bajo las mismas condiciones de exposición y se realizaron las mediciones en el mismo tiempo, los resultados no fueron los esperados. Por lo que debe considerarse el factor individual de las cepas, ya que a pesar de haber sido identificadas como *S. aureus*, dentro de la misma especie existen variaciones de expresión de genes y por tanto, de una virulencia variable además de presentar posiblemente composiciones químicas distintas que las harían

más o menos susceptibles a sufrir cambios al ser sometidas a CM. Estas características podrían explicar que el comportamiento de las cepas fuera tan diferente a lo previsto.

No se ha logrado dilucidar el mecanismo exacto mediante el cual la exposición de CM afecta el crecimiento bacteriano. Parte de la evidencia sugiere que es producida por cambios en la morfología bacteriana. En contraste otros autores no han encontrado evidencia que coincida con lo antes mencionado. Es posible que el CM afecte la comunicación entre bacterias bloqueando el *quorum sensce* de tal modo que pareciera que la población ha llegado al límite de crecimiento para el sustrato presente y de este modo se inhiba el crecimiento.

### 8.8 Disminución del tamaño de los abscesos

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de CM en un modelo de absceso cutáneo en ratones CD-1 y se comparó con el efecto del tratamiento a base de Amikacina mostrando un efecto similar.

Estos resultados muestran alteraciones similares a lo encontrado previamente por Inhan-Garip<sup>109</sup> quien observó cambios estructurales significativos en todas las cepas bacterianas, que parecían alteraciones causadas por péptidos catiónicos. Ejemplo de estos péptidos son las defensinas y las catelicidinas, recordemos que éstos juegan un rol importante en la respuesta inmune innata.

Los péptidos catiónicos se definen como péptidos codificados por un genoma (no sintéticos), que comprenden entre 12 y 50 aminoácidos, con al menos dos cargas positivas en exceso, dadas por residuos de lisina y arginina<sup>110</sup>. Posen actividad microbicida mediante su unión a sitios de la membrana cargados negativamente mediante atracción electrostática<sup>111</sup>. Interactúan con el LPS desplazando los cationes divalentes lo que causa disrupción de la membrana permitiendo el ingreso a otros péptidos que actúan a nivel interno. Puede unirse a los fosfolípidos cargados negativamente promoviendo la formación de poros que puede ocasionar alteraciones en la permeabilidad celular ocasionando la muerte de la bacteria. Además, los péptidos catiónicos tienen actividad quimiotáctica, favorecen la inducción de

medidores inflamatorios, es capaz de neutralizar el LPS e inhibir el ácido lipoteicoico limitado así la proliferación celular.

Es de notar que en el grupo 5 (tratado con CMC y amikacina) se pierde el efecto terapéutico, ya que no se alcanza el efecto terapéutico del antibiótico y tampoco se observa el efecto del CMC mostrado en el grupo 4. El mecanismo de acción de la amikacina es mediante la inhibición de la síntesis de proteínas, impidiendo la transcripción del ADN bacteriano mediante su unión a la subunidad 30S ribosomal.

Es posible que al exponer la amikacina al CMC modifique su estructura o evite su sitio de unión disminuyendo así su efectividad por lo que al aplicar el tratamiento combinado disminuya su acción antibiótica. Sin embargo, esto no explica el porqué no se presentó el aumento o la presencia de los péptidos catiónicos.

## IX CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se ha analizado el papel de los CM sobre el crecimiento bacteriano tomando como ejemplar el *S. aureus*, una bacteria gram positiva de fácil propagación y diseminación mundial. Se concluyó que los CM son capaces de modificar el aumento o disminución de la cuenta viable de UFC/ml dependiendo de la intensidad de CM y el tiempo de exposición, además de modificar su respuesta a antibióticos y ser útil en un modelo *in vivo* en el tratamiento de abscesos cutáneos en ratones CD-1.

- La exposición de cultivos bacterianos en este caso de *S. aureus* en medio líquido (caldo nutritivo) a 158 G de intensidad de CMC es capaz de modificar la cuenta de UFC/ml. Se observa la disminución de la cuenta viable entre las 48 y 72h entre de exposición retrasando o eliminando la fase de crecimiento exponencial comparado con su control no expuesto y sometido a condiciones favorables (incubado a 37°C).
- La exposición de *S. aureus* a 133 G de intensidad de CMC modifica la composición química de las bacterias, alterando principalmente el Na y el Ca, observando disminución de estos elementos cuando hay inhibición del crecimiento y aumento de los mismos cuando presentan un aumento en la cuenta de UFC/ml.
- La aplicación de un CMC a 133G de intensidad altera la sensibilidad a antibióticos mejorando la respuesta a Enoxacina en 6/8 cepas expuestas, a Eritromicina en 4/8 y a Trimetoprim/Sulfametoxazol 4/8 medido mediante antibiograma. Esta observación sugiere que el CM actúa a nivel del mecanismo de acción del fármaco en cuestión favoreciendo así su efecto bactericida o bacteriostático según sea el caso.
- La inoculación de  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml a ratones CD-1 por vía subcutánea provoca abscesos cutáneos limitados al área de aplicación después de 72h. Por esta razón puede ser usado en investigaciones futuras como un buen modelo de infección, ya que es posible observar la extensión de la infección y tomar muestras de la lesión.

- Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a Amikacina por lo que se eligió éste antibiótico para el tratamiento de los ratones CD-1 infectados previamente con *S. aureus*. Después de 5 días de administración vía intraperitoneal se observó que no revierte la presencia de abscesos por completo, pero si disminuye el tamaño de los mismos.
- El tratamiento con exposición a 133 G de CM a ratones CD-1 infectados con *S. aureus* disminuye el tamaño de los abscesos, de forma similar al ya obtenido por medio del tratamiento con Amikacina.

Una de las principales limitaciones del presente estudio fue la falta de equipo necesario para evaluar otras intensidades mayores de CM y utilizar CMV a diferentes frecuencias, así como la falta de estudios moleculares. Aún así, esta investigación es pionera al reportar estudios sólo con campos magnéticos en su mayoría constantes con los que se obtengan respuestas favorables para la disminución de UFC/ml y sobre todo que se llevó a la aplicación del modelo *in vivo*. Por otra parte, los materiales utilizados en el presente trabajo son más baratos y sencillos de conseguir respecto a los reportados en otros trabajos.

Se necesita más investigación para aumentar nuestro entendimiento sobre los factores que determinan el cambio en el comportamiento bacteriano al ser sometido a CM tanto constantes como variables en el tiempo. En particular se requieren estudios a nivel molecular para determinar que bacterias comparten características moleculares y/o rutas metabólicas similares que en principio puedan ser afectadas del mismo modo por el CM y así poder aplicarlo a otras especies bacterianas. Del mismo modo, es importante ahondar en las posibles alteraciones que los CM pudieran tener sobre el huésped al aplicarlos en modelos *in vivo* como en el estudiado en este trabajo en el que se observó mejoría de abscesos subcutáneos. Además, es necesario estudiar el posible efecto profiláctico que pudieran ofrecer la aplicación de dichos CM asumiendo que el efecto reportado en el modelo *in vivo* sea por activación de péptidos catiónicos como las defensinas, éstas deberían ser activadas y estar presentes (en número aumentado) previó a la invasión de un patógeno.

## X BIBLIOGRAFÍA

1. Pier GB. Mecanismos moleculares de la patogenia bacteriana. In: Principios de medicina interna. 19 Edición. New York: McGraw Hill; 2006. p. 648–56.
2. Longo D, Kasper D, Jameson JF, Hauser S. Infecciones estafilocócicas. In: Harrison LJ eds., editor. Principios de medicina interna. 19 Edición. New York: McGraw Hill; 2006. p. 658–720.
3. Álvarez RM, Díaz JP. Características generales de las infecciones bacterianas. In: Alocer A, editor. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología. 2a Edición. Madrid, España: Editorial Panamericana; 2006. p. 247–51.
4. World Health Organization. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization. 2001. 105 p.
5. Prados MV de la T. La prevención de infecciones nosocomiales en las unidades de medicina intensiva. In: Tercer Congreso internacional de Medicina Crítica. D.F. México; 2001. p. 11.
6. Zendejas-Manzo SG, Avalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed.* 2014;25:129–43.
7. Vindel A, Cercenado E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene : an emerging problem ? *Enferm Infecc Micobiol Clin.* 2016;34(5):277–9.
8. Castañón Sánchez CA. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid médica e Investig en salud.* 2012;5:79–84.
9. Álvarez Lam I, Ponce Bittar J. The evolution of an old pathogen called *Staphylococcus aureus*. *Rev Cubana Pediatr.* 2012;84:383–91.
10. Davis RW, Brannen AD, Hossain MJ, Monsma S, Bock PE, Nahrendorf M, et al. Complete genome of *Staphylococcus aureus* Tager 104 provides evidence of its relation to modern systemic hospital-acquired strains. *BMC Genomics* [Internet]. *BMC Genomics*; 2016;17:179. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/17/179>
11. Harris LG, Foster SJ, Richards RG, Harris L. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomateriales: Review. *Eur Cells Mater.* 2002;4:39–60.
12. Mensa-Pueyo J, Barberán J, Llinares P, Picazo J, Bouza E, Álvarez-Lerma F, et al. Guidelines for the treatment on infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Rev Española Quimioter.* 2008;21:234–58.
13. Rehberger AIM. Estudio epidemiológico de la colonización de SARM en la cabaña porcina de Tenerife. Universidad de la Laguna; 2010.
14. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene. Estudio EPINE-EPPS 2015. European Center for Disease prevention and control. 2015.
15. Cerrillo MCP, Castellanos JLV, Castañeda EOS. Brotes de toxiinfecciones

- alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Publica Mex.* 1993;36:456–63.
16. Schlegel HG. Introducción a las bacterias. In: *Microbiología General*. Séptia Edi. Barcelona, España: OMEGA; 1997. p. 98–148.
  17. Camussone CM, Calvinho LF. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con inmunógenos. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45(2):119–30.
  18. World Health Organization WHO. Bacterial toxins. In: *Public health response to biological and chemical weapons*. Ed. Second. Washington DC: OPS; 2003. p. 170–6.
  19. Salgado CD. Antimicrobial Resistance Among Epidemiologically Important Gram-Positive Bacteria. In: *Management of Antimicrobials in Infectious Diseases Impact of antibiotic resistance*. Segunda ed. Londres: Humana; 2010. p. 33–40.
  20. Cassat JE, Skaar EP. Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: Overcoming nutritional immunity. *Semin Immunopathol.* 2012;34(2):215–35.
  21. Rubio OM. Problemática de la antibioticoterapia en la infección de prótesis articular. Una aproximación mediante un modelo animal de infección de cuerpo extraño por *Staphylococcus aureus* meticilín-sensible. Universidad de Barcelona; 2009.
  22. Cervantes García E, García González R, Salazar Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Patol Clínica y Med Lab.* 2014;61:28–40.
  23. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Diseases.* 2008;46:350–9.
  24. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2006;11(2):237–48.
  25. Krishna S, Miller LS. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol.* 2012;34:261–80.
  26. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 2011;186:585–96.
  27. Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: Overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.* 2009;56(4):597–612.
  28. Liu C, Chen ZJ, Sun Z, Feng X, Zou M, Cao W, et al. Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *J Microbiol Immunol Infect.* Elsevier Taiwan LLC; 2015;48(5):490–6.
  29. Koch D, Taibjee S. Staphylococcal scalded skin syndrome. In: *Lebwohl MG, Heymann WR, Berth-Jones J CI, editor. Treatment of Skin Disease: Comprehensive Therapeutic Strategies*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014.
  30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunidad regional: respuestas inmunitarias especializadas en los tejidos epiteliales y con privilegio inmunitario. In: *Inmunología celular y molecular*. Séptima ed. Barcelona: ELSEVIER; 2012. p. 293–318.



31. Tong SYC, Chen LF, Fowler VGJ. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: What is the clinical relevance? *Semin Immunopathol.* 2012;34:185–200.
32. Ko YP, Kuipers A, Freitag CM, Jongerius I, Medina E, van Rooijen WJ, et al. Phagocytosis Escape by a *Staphylococcus aureus* Protein That Connects Complement and Coagulation Proteins at the Bacterial Surface. *PLoS Pathog.* 2013;9(12):1–13.
33. Report G. Antimicrobial resistance. In: *Bulletin of the World Health Organization.* 2014. p. 383–94.
34. González MJC, Armindo JP-M. Mechanisms of Resistance To  $\beta$ -Lactam Antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Kasmera.* 2010;38:18–35.
35. Jia X, Zhang J, Sun W, He W, Jiang H. Riboswitch Control of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;152:68–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.019>
36. Sykes SR. The 2009 Garrod Lecture: The evolution of antimicrobial resistance: a Darwinian perspective. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:1842–52.
37. Miranda-Navales GM. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2011;68:262–70.
38. Zhang K, McClure J -a., Elsayed S, Conly JM. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome mec Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A mec and Type 4 ccr Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:531–40.
39. Tang SS, Apisarnthanarak A, Hsu LY. Mechanisms of  $\beta$ -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2014.
40. Quiceno JNJ, Ochoa MMC. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: Bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia.* 2009;22(2):147–58.
41. Stekolschik G. Superbacterias: bacterias resistentes a los antibióticos. *Exactamente.* 2011;36–8.
42. Clardy J, Fischbach M, Currie C. The natural history of antibiotics. *Curr Biol.* 2010;19(11):437–41.
43. López TM, Arnáez CZ. La obtención de nuevos antibióticos: un reto importante. *Av Ter. Madrid, España;* 2016 Nov 1;542:16–22.
44. Sociedad Española de Quimioterapia, Sociedad Española de Medicina Interna AE de C. Guía terapéutica Guía de tratamiento de las infecciones. *Rev Española Quimioter.* 2006;19:378–94.
45. Lindsay J, Holden M. *Staphylococcus aureus*: superbug super genome? *Trends Microbiol.* 2004;12:378–85.
46. *Pediatría C de medicamentos de AE de. Vancomicina. Pediamécum.* 2015.
47. Aronoff GR, Sloan RS, Dinwiddie CB, Glant MD, Fineberg NS, Luft FC. Effects of vancomycin on renal function in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;19:306–8.

48. Rodríguez Pozueta MÁ. Aspectos básicos del electromagnetismo aplicado a las máquinas eléctricas. Cantabria, España; 2014.
49. Name L, Name F, Training O, Training P, Darin C, Training RO, et al. Biogenic magnetite. In: Kato M, editor. Electromagnetics in biology. Primera ed. Hicom, Japan: Springer; 2006. p. 213–6.
50. Pollock G, Stump D. Campo eléctrico. In: Electromagnetism. Primera. New York: Interamericana; 2001. p. 127–39.
51. Vargas F, Úbeda A, Azanza Ruiz MJ, Ferrero Andreu L, Manolis K, Martínez Búrdalo M, et al. Campos electromagnéticos y Salud Pública. Madrid, España; 2002.
52. Solano Vérez MÁ, Sáiz Ipiña J. Conceptos básicos de campos electromagnéticos de baja frecuencia. Cantabria; 2002.
53. Miguel Castro, Regla Perera, Jacqueline Pedrouzo, Guillermo Aponte, Adolfo Escobar DC. Campos electromagnéticos y salud: Exposición a CEM de baja frecuencia en oficinas y laboratorios de computación. Energética. 2007;XXVIII:2–7.
54. Wangsness RK. El campo eléctrico. In: Electromagnetic Fields. 14th ed. México, D.F.: LIMUSA; 2001. p. 73.
55. Giancoli DC. Magnetismo. In: Física principios con aplicaciones. Cuarta. México, D.F.: Prentice Hall; 1997. p. 558–60.
56. Diego Radilla FJ, Rodríguez García L. Orientación magnética y magnetorrecepción en anfibios. Rev Esp Herp. 2007;21:19–39.
57. Robert R. Bobina de Helmholtz. Rev Bras Ensino Física. 2003;Vol. 25(1):40–3.
58. Arias AG. Radiaciones electromagnéticas : ¿dañinas o benéficas? Rev Cuba Física. 2010;27:203–7.
59. Matilde Anaya Villalpanda, Tania María Guzmán Armenteros CMAF. El campo magnético aplicado a la industria alimentaria. Publitec. 2011;(4):1–8.
60. Pasaye-Alcaraz EH. Exposición a campos magnéticos. Rev Mex Anestesiología. 2012;35:137–8.
61. Cala JCM. Tratamiento coadyuvante con campo electromagnético pulsátil en la pseudoartrosis séptica de la tibia asociado a la fijación externa. Hospital Militar Docente, Santiago de Cuba; 2002.
62. Alonso Fustel E, García Vázquez R, Onaindia Olalde C. Campos electromagnéticos y efectos en salud. 2011;70.
63. Pavón JCH, Sosa M, Córdova T, Sabanero GB, Meza SS, López MS. Study of Electromagnetic Fields on Cellular Systems. Acta Univ UGTO. 2009;19:65–70.
64. Tchernitchin AN, Riveros R. Efectos de la radiación electromagnética sobre la salud. Cuad Méd Soc. 2004;44:220–34.
65. Falcón Aguilar ME, Barceló Pérez C. Asociación del cáncer con los campos electromagnéticos. Ciudad de la Habana, 1992-1996. Rev Cuba Med Milit. 2000;29:1992–6.
66. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L. Electromagnetic fields as cancer-causing agents.

- Environ Res. 2008;107:289–90.
67. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, Epstein S, et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res.* 2007;105:414–29.
  68. Domínguez Pacheco A, Hernández Aguilar C, Cruz Orea A, Carballo Carballo A, Zepeda Bautista R, Martínez Ortiz EM. Semilla de maíz bajo la influencia de irradiación de campos electromagnéticos. *Rev Fitotec Mex.* 2010;33:183–8.
  69. Serguera Niño M, Chacón Alvarez D, Rodríguez Clavijo Y. Influencia del campo electromagnético en el crecimiento de la levadura torula. In: IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. 2001. p. 1–2.
  70. Restrepo A, Martinez L, Pinedo C, Franco E, Gutiérrez J, Cadavid H. Resultados preliminares del crecimiento de tejido celular usando un bioreactor con sistema de estimulación magnética. *Bienn Congr Argentina.* 2014;839–44.
  71. Orlando Zúñiga E, Ramiro Cuero G, Peña O. JA. Estimulación con campo electromagnético variable de microorganismos benéficos aplicados a la cachaza para mejorar su uso como biofertilizante. *Biotecnol en el Sect Agropecu y agroindustrial.* 2011;9:150–9.
  72. Tessaro LWE, Murugan NJ, Persinger M a. Bacterial growth rates are influenced by cellular characteristics of individual species when immersed in electromagnetic fields. *Microbiological research.* 2015. p. 26–33.
  73. David Chacón Alvaez, Maité Serguera Niño, William Suárez Santos YRC. Aumento en los rendimientos para la obtención de levadura torula ( *Candida utilis* Y-660 ) con aplicación de campos electromagnéticos. *Tecnol química.* 1999;19:79–82.
  74. Fojt L, Strašák L, Vetterl V, Šmarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry.* 2004;63(1–2):337–41.
  75. Hussein A. Motaweh, Fidel M. Ali, Ahmed M. El-Khattib, Sorya A. Sabry SEA-N. Control of *Staphylococcus aureus* activity in rats using electromagnetics signals at resonance frequency in vivo study. *Eur Sci J.* 2014;10:462–72.
  76. Gómez Luna L, Menéndez J, Álvarez I, Flores I. Efecto de diferentes protocolos de aplicación de un campo magnético (0.03T) sobre el crecimiento, viabilidad y composición pigmentaria de *Haematococcus pluvialis* Flotow en suficiencia y ausencia de nitrógeno. (Spanish). *Biotecnol Veg.* 2009;9(2):105–17.
  77. Delgadillo CB. Efecto de los campos electromagnéticos sobre el crecimiento y formación de biopelícula de microorganismos productores de caries. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2012.
  78. Sánchez González, Dolores Javier Orjuela Henry, Darío de Jesús Trejo Bahena, Nayeli Isabel Martínez Martínez, Claudia María Ramírez Silva S. Efectos biológicos de campos electromagnéticos de frecuencia industrial . Modelo en ratas. *Rev Sanid Milit.* 2007;61:371–80.
  79. Mittenzwey R, Süßmuth R, Mei W. Effects of extremely low-frequency

- electromagnetic fields on bacteria - The question of a co-stressing factor. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* 1996;40(1):21–7.
80. Strašák L, Vetterl V, Šmarda J. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli*. *Bioelectrochemistry.* 2002;55(1–2):161–4.
  81. Fijałkowski K, Nawrotek P, Struk M, Kordas M, Rakoczy R. Effects of rotating magnetic field exposure on the functional parameters of different species of bacteria. *Electromagn Biol Med.* 2015;34:48–55.
  82. Sandblom J, Galvanovskis J. Electromagnetic field absorption in stochastic cellular systems: enhanced signal detection in ion channels and calcium oscillators. *Chaos, Solitons & Fractals.* 2000;11:1905–11.
  83. Ahmed I, Istivan T, Cosic I, Pirogova E. Evaluation of the effects of Extremely Low Frequency (ELF) Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF) on survival of the bacterium *Staphylococcus aureus*. *EPJ Nonlinear Biomed Phys.* 2013;1:1–17.
  84. Rios PAF de los. Evaluación de la influencia de campos electromagnéticos de diferentes frecuencias sobre la viabilidad de células cancerígenas MCF-7. Universidad Autónoma de México; 2010.
  85. Fuente AO de la. Influencia de los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia sobre el crecimiento y diferenciación de *Entamoeba invadens*. Universidad Autónoma de Nuevo León; 1999.
  86. Ahmed I, Istivan T, Pirogova E. Irradiation of *Escherichia coli* by extremely-low frequency (ELF) pulsed electromagnetic fields (PEMF): evaluation of bacterial survival. *J Electromagn Waves Appl.* Taylor & Francis; 2014 Nov 7;4:1–12.
  87. Segatore B, Setacci D, Bennato F, Cardigno R, Amicosante G, Iorio R. Evaluations of the Effects of Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields on Growth and Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Microbiol.* 2012;2012:1–8.
  88. White HE. Magnetismo. In: Noriega, editor. *Física Moderna Vol I.* Primera ed. México, D.F.: LIMUSA; 2006. p. 436–54.
  89. Wang Z, Liu X, Lv M, Chai P, Liu Y, Meng J. Preparation of Ferrite  $MFe_2O_4$  ( $M = Co, Ni$ ) Ribbons with Nanoporous Structure and Their Magnetic Properties. *J Phys Chem.* 2008;4:11292–7.
  90. Jácome LEL, Durán MH, Castro CAC, SilvestreOrtegaPeña, González G, Cedejas RF. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investig en Discapac.* 2014;3:10–8.
  91. BIOXON B. BD Mannitol Salt Agar. instructions for use of Mannitol Salt Agar. 2013. p. 1–3.
  92. Reytor DCP, Vázquez ID, Espinosa AES. Evaluación del método de siembra en placa “traza de la dilución” en el control de calidad de bancos de mutantes de *Escherichia coli* K12. *Biotechnol Apl.* 2002;19:169–73.
  93. Miles AA, Misra SS. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond).* 1931;38:732–49.

94. McFarland J. Nephelometer: An Instrument for Estimating the Number of Bacteria in Suspensions Used for Calculating the Opsonic Index and for Vaccines. *J Am Med Assoc.* 1907;14:1176–8.
95. Pavia DL, Lampman GM, Kris GS, Vyvyan JR. Infrared spectroscopy. In: *Introduction to spectroscopy.* 4<sup>o</sup> Ed. Belmont, USA: BROOKS/COLE; 2008. p. 23–5.
96. Egerton RF. *Physical principles of electron microscopy.* Springer, editor. Alberta, Canada: Springer Science; 2005. 211 p.
97. Hawkes PW, Spence JCH. *Science of Microscopy.* Springer; 141 p.
98. Kirkiland AI, Chang SL-Y, Hutchison JL, Nellist PD, Botton G. *Science of Microscopy.* Springer. Hawkes PW, Spence JCH, editors. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015.* Ney York, USA: Springer Science; 2015. 1332 p.
99. Canto R. Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Enfermedades Infecc Microbiol clínica.* 2010;28:375–85.
100. Fijał KK, Nawrotek P, Struk M, Kordas M, Rakoczy R. The effects of rotating magnetic field on growth rate, cell metabolic activity and biofilm formation by *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli.* *J Magn.* 2013;18(3):289–96.
101. Nawrotek P, Fijalkowski K, Struk M, Kordas M, Rakoczy R. Effects of 50 Hz rotating magnetic field on the viability of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus.* *Electromagn Biol Med.* 2014;33:29–34.
102. Kimball GC. The Growth of Yeast in a Magnetic Field. *J Bacteriol.* 1938;35(2):109–22.
103. Ali FM, Gawish AM, Osman MBS, Abdelbacki AM, Sharkawy AHE-. Control of *Salmonella* activity in rats by pulsed electromagnetic fields (in vivo study). *J Int Dent Med Res.* 2012;5:129–35.
104. Sepúlveda AEC, Enríquez MEM, Patiño NM. Quinolonas. *Rev Farmacol UNAM.* 2008;51(4):173–7.
105. Oliva M, Martínez Á, García A, Pozo DEL. Eritromicina. Descubrimiento, características y aplicaciones. *OOFARM.* 2002;21(2):75–82.
106. Cellini L, Grande R, Campli E Di, Bartotolomeo S Di, Giulio M Di, Robuffo I, et al. Bacterial response to the exposure of 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 2008;24(4):302–11.
107. Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S. Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology , Biofuel and Bioenergy Applications. *Int J Mol Sci.* 2009;10:4515–58.
108. Fojt L, Klapetek P, Luděk S, Vetterl V. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. *Micron.* 2009;40:918–22.
109. Inhan-Garip A, Aksu B, Akan Z, Akakin D, Ozaydin A, San T. Effect of extremely low frequency electromagnetic fields on growth rate and morphology of bacteria. *Int J Radiat Biol.* 2011;87:1155–61.
110. Alfaro C. Importancia de los péptidos catiónicos en la respuesta innata. *Rev Médica del Hosp Nac Niños Dr Carlos Sáenz Herrera.* 2005;40:53–8.

111. Castrillón Rivera L, Palma Ramos A, Padilla Desgarenne C. Péptidos antimicrobianos: antibióticos naturales de la piel. *Dermatología Rev Mex.* 2007;51:57-67.

## **XII ANEXOS**