

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS
BIOMÉDICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

EFEECTO DE CORRIENTE ELÉCTRICA Y NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE
Pseudomonas aeruginosa MULTIDROGORRESISTENTE

POR:

LIC. CORINNA AIMEÉ CHÁVEZ MANINI

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2024



Universidad Autónoma de Chihuahua
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Secretaría de Investigación y Posgrado.



La tesis EFECTO DE CORRIENTE ELÉCTRICA Y NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGORRESISTENTE que presenta la estudiante Corinna Aimeé Chávez Manini, con número de matrícula 185756, como requisito parcial para obtener el grado de: Maestría en Formación Biomédica ha sido revisada y aprobada por la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas

DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua



D.Ph. ALVA ROCÍO CASTILLO GONZÁLEZ
Director de Tesis
Universidad Autónoma de Chihuahua



DR. CARLOS ARZATE QUINTANA
Asesor



DRA. MARÍA ALEJANDRA FAVILA PÉREZ
Asesora



DR. LUIS GIBRAN JUÁREZ HERNÁNDEZ
Asesor



SANDRA ALICIA REZA LÓPEZ, PH.D.
Asesora

Se certifica, bajo protesta de decir verdad, que las firmas consignadas al pie del presente documento son de carácter original y auténtico, correspondiendo de manera inequívoca a los responsables de las labores de dirección, seguimiento, asesoría y evaluación, en estricta conformidad con lo dispuesto en la normativa vigente de esta institución universitaria.

RESUMEN

OBJETIVO: Analizar los efectos de la corriente eléctrica y las nanopartículas de cobre sobre la viabilidad y formación de biopelículas de *P. aeruginosa*. **HIPOTESIS:** La corriente eléctrica y las nanopartículas de cobre reducen de manera significativa la viabilidad y la biosíntesis de biopelícula en *P. aeruginosa*, y se espera un efecto sinérgico al combinarlos. **MÉTODO:** Se realizó un estudio con enfoque cuantitativo y un diseño experimental con ensayos por triplicado. Se utilizó la cepa de referencia PA14. Los tratamientos: 100V DC, 100V DC con CuNPs y CuNPs. El tiempo de aplicación de corriente eléctrica fue de 10 min. Tras cada tratamiento, las muestras se incubaron en caldo nutritivo (24 h) y se repitió el protocolo durante 5 generaciones. Se empleó ANOVA de medidas repetidas y análisis post hoc de Tukey en STATA versión 14.2. **RESULTADOS:** Tras 5 generaciones, la corriente eléctrica logró reducir significativamente tanto la viabilidad como la formación de biopelícula en un 19.7% y 13% respectivamente ($p < 0.05$). Mientras que el tratamiento combinado solamente inhibió la viabilidad un 17.9% ($p < 0.05$). **CONCLUSIONES:** Aplicar 100 V DC por 100 min logra inhibir significativamente la viabilidad y formación de biopelícula en PA14 tras 5 generaciones. Sin embargo, no se observa el efecto sinérgico del tratamiento combinado. Además, se evidenció la capacidad adaptativa de *P. aeruginosa* a dosis no letales de corriente eléctrica y CuNPs.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, corriente eléctrica, nanopartículas de cobre, viabilidad, biopelícula.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To analyze the effects of electric and copper nanoparticles (CuNPs) on the viability and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* (PA14). **HYPOTHESIS:** Both electric current and CuNPs significantly reduce the viability and biofilm biosynthesis in *P. aeruginosa*, showing synergistic effect when combined. **METHOD:** A quantitative study was performed, with an experimental design and triplicate assays. The reference strain PA14 was used. The treatments included: 100V DC, 100V DC combined with CuNPs, and CuNPs alone. The electric current was applied for 10 minutes. After each treatment, samples were incubated in nutrient broth for 24 h, and the protocol was repeated over 5 generations. Repeated measures ANOVA and Tukey post hoc analysis were performed using STATA version 14.2. **RESULTS:** After 5 generations, electric current significantly reduced both viability and biofilm formation by 19.7% and 13% respectively ($p < 0.05$). Nevertheless, the combined treatment only inhibited viability by 17.9% ($p < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Applying 100 V DC for 10 minutes effectively inhibits the viability and biofilm formation of PA14 after 5 generations. However, no synergistic effect was observed when combining treatments against biofilm formation. Additionally, the adaptative capacity of *P. aeruginosa* to sublethal doses of electric current and CuNPs was demonstrated.

Keywords: *P. aeruginosa*, electric current, copper nanoparticles, viability, biofilm



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS

Los que suscriben, certifican que la tesis **EFFECTO DE CORRIENTE ELÉCTRICA Y NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGORRESISTENTE** realizada por la estudiante **CORINNA AIMEÉ CHÁVEZ MANINI** con número de matrícula **185756** fue aprobada para proceder a su defensa para obtener el grado de MAESTRIA EN FORMACIÓN BIOMEDICA.

D.Ph. Alva Rocio Castillo González
Directora de tesis
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dr. Luis Gibrán Juárez Hernández
Co-Director de Tesis
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dr. Carlos Arzate Quintana
Asesor
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Sandra Alicia Reza López, Ph.D.
Asesora
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dra. María Alejandra Favila Pérez
Asesora
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Ratifican la veracidad de las firmas:

DR. RENÉ NÚÑEZ BAUTISTA
Director
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas

DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas

Chihuahua, Chihuahua. Noviembre de 2024.



Chihuahua, Chih., a 21 de noviembre 2024.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA
DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T E.

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que el C. **CORINNA AIMEÉ CHÁVEZ MANINI** con número de matrícula **185756**, estudiante del programa de **MAESTRIA FORMACIÓN BIOMÉDICA** ha concluido la escritura de la tesis titulada **"EFECTO DE CORRIENTE ELÉCTRICA Y NANOPARTÍCULAS DE COBRE SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGORRESISTENTE"**.

Así mismo manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada por los abajo firmantes; autorizamos a la estudiante a proceder con los trámites administrativos de liberación de tesis y solicitar fecha de examen de grado de **MAESTRA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA**.

Sin otro particular, quedamos de usted

Atentamente,

Miembros del Comité de Tesis:

D.Ph. Alva Rocío Castillo González
Directora de tesis
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dr. Luis Gibran Juárez Hernández
Co-Director de Tesis
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dr. Carlos Arzate Quintana
Asesor
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Sandra Alicia Reza López, Ph.D.
Asesora
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Dra. María Alejandra Favila Pérez
Asesora
Universidad Autónoma de Chihuahua.

Lugar en donde se desarrolló el trabajo de investigación: Facultad Medicina de Ciencias Biomédicas

Registro de comité de investigación (SIP) y/o ética: Expresión génica de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente expuesta a una corriente eléctrica en medio acuoso con nanopartículas de cobre. Ci-031-22

Fuentes de financiamiento: Fondo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación. FOLIO PROYECTO: FECTI/2024/CV-CDF/002

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, cuyo amor incondicional ha sido mi mayor fortaleza. Sus palabras de ánimo en los momentos más difíciles, cuando pensaba renunciar, me motivaron a seguir adelante. Su apoyo constante en cada reto y proyecto que he emprendido ha sido el motor que me impulsa a seguir adelante y alcanzar mis metas.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Mi directora de tesis, la D.Ph. Alva Rocío Castillo González, por todo el apoyo, paciencia y guía a lo largo de este proceso. Su apoyo y calidad humana inspiraron en mí una mayor pasión por la investigación. A Sandra Alicia Reza López, Ph.D., por su invaluable guía durante el desarrollo del análisis estadístico de esta investigación. Su disposición para compartir su conocimiento y habilidad fueron esenciales para superar mis limitaciones en esta área. Gracias a su apoyo logré adquirir las herramientas necesarias para sacar adelante este trabajo. Asimismo, agradezco profundamente a mis asesores: Dr. Carlos Arzate Quintana, Dra. María Alejandra Favila Pérez y Dr. Luis Gibrán Juárez Hernández, por sus valiosos comentarios y oportunas observaciones, que enriquecieron esta tesis.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Clasificación de mecanismos bacterianos para la resistencia a antimicrobianos

Figura 2 Fotografía del dispositivo para el tratamiento eléctrico que sostiene electrodos a una distancia de 1cm.

Figura 3 Preparación de CuNPs mediante método de reducción acuosa

Figura 4 Imágenes obtenidas del FESEM-EDS para la caracterización de las CuNPs, donde se aprecian agregaciones de partículas de distintos tamaños, mayores y menores de 100 nm

Figura 5 Procedimiento para el tratamiento con 100 V por 10 min

Figura 6 Procedimiento utilizado para ensayo combinando 100V por 10 min y CuNPs

Figura 7 Procedimiento para tratamiento con 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CuNPs

Figura 8. Antibiograma realizado a cepa de referencia PA14 para confirmar multidrogorresistencia

Figura 9. Porcentaje de viabilidad de crecimiento de *P. aeruginosa* según el tratamiento tras la exposición por cinco generaciones.

Figura 10. Comparación de medias de densidad óptica en viabilidad por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*

Figura 11. Porcentaje de formación de biopelícula por tratamiento tras cinco generaciones.

Figura 12. Comparación de medias de densidad óptica en formación de biopelícula por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*

Figura 13. Formación de biopelícula por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Cuadro latino del diseño experimental

LISTA DE ABREVIATURAS

CuNPs: nanopartículas de cobre

CuONPs: nanopartículas de óxidos de cobre

dH₂O: agua destilada

DMSO: dimetilsulfóxido

EDS: espectroscopía de energía dispersada

FESEM: microscopía de barrido electrónico de emisión de campo

Gm+: gram positivo

Gm-: gram negativo

HOCl: ácido hipocloroso

IAAS: infecciones asociadas a la atención en salud

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio

NaCl: cloruro de sodio

NPs: nanopartículas

OD: densidad óptica

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

QS: quorum sensing

ROS: especies reactivas de oxígeno

TSB: caldo de soya tripticaseína



ÍNDICE DE CONTENIDO

I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	1
2.1 Tipos de infecciones	1
2.2 Agentes infecciosos	2
2.3 Mecanismos de resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.5 Nanopartículas	9
III. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO	12
3.1 Planteamiento del problema e interrogante de investigación	12
3.2 Hipótesis	13
3.3 Objetivos	13
3.3.1 Objetivo general	13
3.3.2 Objetivos específicos	13
IV. JUSTIFICACIÓN	13
5.2 Unidades experimentales	15
5.2.1 Descripción de las unidades experimentales	15
5.2.2 Criterios de selección de la muestra	15
5.2.3 Tamaño de la muestra y muestreo	15
5.3 Definición de variables	15
5.3.1 Dependientes	15
5.3.2 Independientes	16
4.4 Técnicas y procedimientos	16
5.4.1 Dispositivo para tratamiento eléctrico	17
5.4.4 Ensayos	22
5.4.5 Plan de análisis	23
5.5 Consideraciones éticas	24
V. RESULTADOS	25
VI. DISCUSIÓN	29
VII. CONCLUSIONES	32
VIII. REFERENCIAS	33
X. Anexos	38



I. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

El aislamiento de microorganismos resistentes a varias clases de antimicrobianos es un problema actual en la práctica clínica. Los factores principales que favorecen esta problemática principalmente son, el uso indiscriminado de antimicrobianos y la fácil generación de mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos (1). Como consecuencia del uso indiscriminado de antimicrobianos, la prevalencia de infecciones por microorganismos multirresistentes se ha exacerbado, resultando en el menoscabo de los tratamientos y prevención ante estas infecciones (2, 3).

2.1 Tipos de infecciones

Una infección ocurre cuando un microorganismo, el agente, invade un tejido huésped, e induce una respuesta inmune y genera así signos y síntomas, bajo ciertas condiciones ambientales. La interacción entre el agente infeccioso y el huésped susceptible es conocida como cadena de infección y consta de los siguientes elementos: agente infeccioso, reservorio, puerta de salida, mecanismo de transmisión, puerta de entrada y huésped susceptible (4). Las infecciones pueden clasificarse de acuerdo con el origen del agente patógeno (endógenas o exógenas), o según el lugar donde se adquirió la infección (comunitarias o nosocomiales) (4).

Las infecciones endógenas se producen cuando existe un desequilibrio en el microbiota normal del huésped debido a factores intrínsecos, por ejemplo, lo más común suele ser una disminución de la respuesta inmunitaria. Mientras que las infecciones exógenas se originan cuando la transmisión del agente patógeno al huésped ocurre mediante fuentes externas, por ejemplo, vía fecal-oral o contacto con superficies u objetos contaminados (4).

En cuanto a las infecciones según el lugar de contagio, las infecciones nosocomiales o infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) son de tipo exógenas y tienen gran repercusión tanto económica como social ya que suponen un incremento en el costo del servicio de salud y en la morbilidad y mortalidad de los pacientes. Estas infecciones son aquellas que se presentan al menos después de 48



horas de la admisión o estancia en un centro de salud y que no estaba presente al momento de ingreso o si se presenta de 48 a 72 horas después del alta (5).

En el caso de las IAAS, el agente infeccioso por lo general es un virus o una bacteria (3, 6); los reservorios pueden ser pacientes enfermos, portadores del agente infeccioso o medios inanimados, por ejemplo, superficies, dispositivos o instrumental contaminado (7). La puerta de salida es la vía por la que el agente infeccioso sale del reservorio y esta puede ser vía respiratoria, gastrointestinal, piel, sangre, entre otras. El mecanismo de transmisión puede darse por vía aérea o gotículas de Flügge. La transmisión por contacto puede darse de forma directa o indirecta(7). La directa se produce cuando hay contacto entre superficies corporales, por ejemplo, contacto entre dos pacientes o de un paciente con el personal de salud; y la indirecta se produce cuando hay contacto entre el huésped susceptible y un objeto por lo general inanimado que está contaminado, por ejemplo, alimentos, agua, catéteres, guantes o instrumental quirúrgico (8). La puerta de entrada es la vía por la que el agente infeccioso entra al huésped y esta puede ser semejante a la puerta de salida, vía respiratoria, gastrointestinal, parenteral, piel, membranas mucosas, entre otras. Y finalmente el huésped susceptible es aquel que debido a ciertos factores como la edad, comorbilidades, tratamiento con inmunosupresores e incluso la misma patología de ingreso incrementa su riesgo de contagio (9, 10).

Entre los principales tipos de infecciones asociadas a procedimientos médicos invasivos o quirúrgicos están las infecciones urinarias y bacteriemias asociadas al uso de catéteres y las neumonías asociadas al uso de ventilador (11).

2.2 Agentes infecciosos

Es muy importante identificar el tipo de agente infeccioso, así como su mecanismo de transmisión para determinar las estrategias para su prevención y tratamiento. Los principales agentes infecciosos son: hongos como *Candida albicans*; virus como SARS-Cov-2; y bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa* (5, 11). En particular las del grupo denominado ESKAPE, compuesto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacterias* (12) son bacterias multirresistentes con mayor prevalencia en las



infecciones asociadas a atención en salud. El mecanismo de transmisión más común en el ámbito hospitalario es la infección cruzada resultante de la interacción entre pacientes y el personal de salud o las superficies del hospital como se ha observado en estudios previos una coincidencia del tipo de microorganismo contaminante entre las superficies de la habitación y las manos del paciente (13). Por lo que, es importante conocer las principales características morfológicas y moleculares que les confieren esta resistencia a los antibióticos para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento efectivas ante estos microorganismos multirresistentes.

Una de las principales clasificaciones de bacterias, es por su afinidad a la tinción de Gram, la cual se basa en las diferencias morfológicas en la pared celular de las bacterias. Las grampositivas (Gm+) se tiñen de azul violeta, debido a que su pared celular contiene mayor cantidad de peptidoglucano y las gramnegativas (Gm-) se tiñen de un color rosado o rojizo, ya que tienen menor cantidad de peptidoglucano. Por lo tanto, la pared celular es una estructura propia de las bacterias y tiene la función de protegerlas contra agentes externos y permite el intercambio de sustancias necesarias para metabolismo y crecimiento de la célula (14).

La pared de las bacterias gramnegativas está compuesta de una membrana externa, una capa fina de peptidoglucano, periplasma y la membrana plasmática. En la membrana externa localizamos a las porinas, para la difusión de solutos, bombas de expulsión y lipopolisacáridos compuestos de lípidos A (endotoxinas) y polisacáridos con un antígeno de superficie O. En el periplasma se localizan algunas enzimas hidrolíticas como las β -lactamasas, y la membrana plasmática contiene el sistema de transporte de electrones encargado de la síntesis de ATP (15).

El genoma bacteriano puede dividirse en constitutivo y accesorio. Aproximadamente el 90% del genoma bacteriano es constitutivo, con menor grado de variabilidad entre distintas cepas de la misma especie y está conformado por genes regulatorios y genes necesarios para su metabolismo y crecimiento. Por otro lado, el genoma accesorio consta de varios elementos, como los plásmidos y transposones, que le proveen ventajas adaptativas debido a su gran plasticidad mediante procesos de transferencia horizontal como la conjugación, transducción y transformación (16).



A diferencia del genoma eucariótico, el genoma bacteriano agrupa genes que codifican proteínas funcionalmente relacionadas y que se transcriben para formar un solo ARNm policistrónico. Esto permite regular su expresión mediante proteínas reguladoras actuando sobre un solo operador permitiendo su inducción o represión (17).

2.3 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

El éxito en la supervivencia de las principales bacterias asociadas a infecciones nosocomiales se basa en los distintos mecanismos de resistencia que estos poseen. Estos se pueden clasificar en: extracelulares, relacionados a la envoltura celular, intracelulares y genéticos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que están interrelacionados entre sí. En la **figura 1** se ejemplifican algunos de los mecanismos en cada una de las clasificaciones (18).

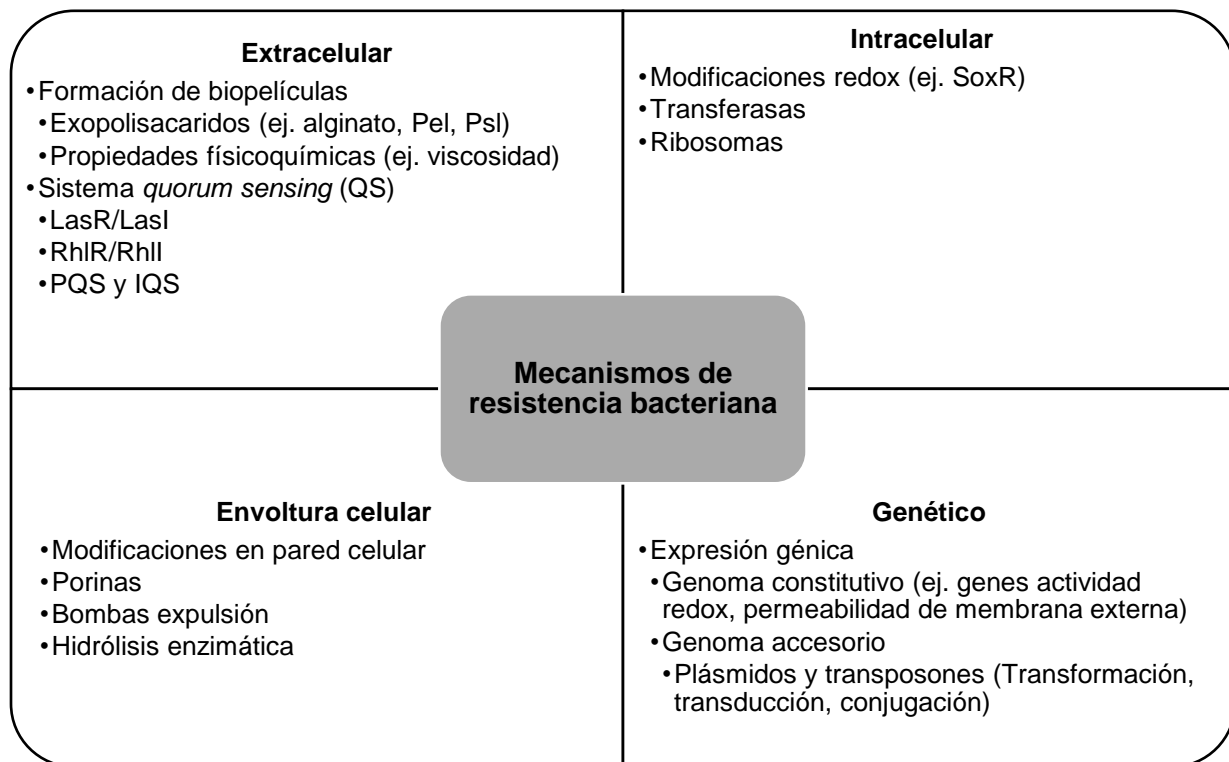


Figura 1 Clasificación de mecanismos bacterianos para la resistencia a antimicrobianos. *Nota.* Adaptado de "Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica" (p. 1215), por C. Troncoso, 2017, *Int. J. Morphol*, 35(4).

Estos mecanismos se observan en bacterias como *P. aeruginosa*, bacteria gramnegativa, en forma de bastón, con gran capacidad adaptativa ante distintas condiciones ambientales lo que la convierte en un patógeno de gran relevancia tanto en



el ámbito clínico como en la industria alimentaria. En 2017, se encontraba como prioridad 1 (crítica) y encabezó la lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, esto según la Organización Mundial de la Salud (19).

Pseudomonas aeruginosa, está asociada a infecciones humanas oportunistas, debido a que es tolerante a cambios físicos y químicos y requerimientos nutricionales, además de presentar resistencia intrínseca como agente hospitalario, representando un serio problema en el pronóstico del paciente infectado. Esta especie bacteriana, presenta resistencia intrínseca debido a la expresión de β -lactamasas y la presencia de bombas de expulsión. Además, es capaz de generar resistencia prácticamente para cualquier antibiótico mediante mutaciones, generando resistencia adquirida, siendo los carbapenémicos y fluoroquinolonas los antibióticos que inducen un mayor número de mutaciones (20).

Se ha observado que los principales factores de riesgo de infección por *P. aeruginosa* multirresistente dentro de la unidad de cuidados intensivos están el tiempo de estancia prolongado (21), el uso previo de antibióticos, el uso de sonda vesical y su duración de uso (20). En relación con el uso previo de antibióticos es importante notar que la multirresistencia depende en gran manera del tipo o combinación de antibióticos frecuentemente prescritos siendo de mayor riesgo aquellos que favorecen la prevalencia de mutaciones en genes asociados a mecanismos de resistencia. Por ejemplo, el uso previo de meropenem o ceftazidima incrementan 4 veces la concentración de estos antibióticos para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en pacientes infectados (1).

Entre los principales factores de patogenicidad de *P. aeruginosa* se encuentran los siguientes mecanismos de resistencia: en relación con la envoltura celular posee proteínas de membrana como OprD y OprF que disminuyen la permeabilidad de la membrana externa (22); dentro de los mecanismos extracelulares posee polisacáridos asociados a la formación de biopelículas como alginato, Pel, Psl y efectores *quorum sensing* (QS) como las, rhl, pqs y IQS, este último controla la producción de elastasas, ramnolípidos y piocianina (23). Y entre los mecanismos genéticos se han descrito reguladores transcripcionales como OxyR, involucrado en la formación de biopelículas y regulación de la expresión de genes asociados con la desintoxicación oxidativa (24).



La capacidad adaptativa de las bacterias que utilizan estos mecanismos de resistencia se ha convertido en problema de máxima prioridad en el sistema de salud mundial ya que el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos contribuye a la evolución de estos mecanismos confiriéndole a las bacterias multirresistencia. Esto conlleva a la necesidad de desarrollar estrategias preventivas y tratamientos más eficaces contra estos microorganismos multirresistentes (25). Esto ha generado la necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas, incluso combinar agentes antimicrobianos tradicionales con campos eléctricos para potenciar su eficacia con éxito y probar compuestos sintéticos y biológicos con actividad antimicrobiana (26).

Los mecanismos exactos de cómo los campos eléctricos favorecen a la eficacia de ciertos antimicrobianos no han sido dilucidados en su totalidad, se cree que esto puede estar relacionado con modificaciones en el pH, procesos electroforéticos, producción de radicales libres, y la asociación del campo bioeléctrico con las cargas químicas, cationes y aniones, de los antimicrobianos (27).

2.4 Biopelícula y la resistencia a antibióticos

Desde su descubrimiento en 1864 por Anton van Leeuwenhoek, múltiples estudios han relacionado la formación de las biopelículas bacterianas con su patogenicidad y resistencia a agentes antimicrobianos en contraste con bacterias planctónicas. Las biopelículas están conformadas por colonias de microorganismos embebidos en una matriz extracelular auto secretada conformada de proteínas, ADN extracelular y exopolisacáridos como el alginato. Esta matriz permite procesos como la adhesión de la biopelícula a todo tipo de superficies, comunicación intercelular, resistencia a antibióticos y el *quorum sensing* (QS) el cual es un mecanismo de regulación de expresión genética dependiente de la densidad poblacional (18).

En *P. aeruginosa*, el QS está conformado por cuatro sistemas interrelacionados y juega un papel clave en la formación de biopelícula y la resistencia antimicrobiana (28). El primer sistema, Las, depende de una proteína reguladora, LasR, a la cual se une el ligando N-3-oxododecanoil-homoserina lactona; el segundo sistema, Rhl, utiliza como molécula de señalización la N-butilil-homoserina lactona; el tercero es el sistema de señalización por quinolonas, PQS exclusivo de las *Pseudomonas*, y depende del ligando



2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona; y el cuarto sistema es el IQS, autoinducido por 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (29, 30). Por el momento, estos son los cuatro sistemas descubiertos, asociados a la comunicación intra e intercelular que permite regular la expresión de hasta el 10% de los genes en *P. aeruginosa* involucrados en su mayoría en factores de virulencia, formación de biopelícula y resistencia antimicrobiana (30).

En la década de los 80's el Dr. John William Costerton, pionero en la investigación de la morfología de biopelículas, describió la formación de éstas en catéteres cardiacos e instrumental médico e indicó su probable asociación con las infecciones crónicas (18). A partir de entonces, se ha tratado de dilucidar los mecanismos mediante los cuales las bacterias se transforman en agentes patógenos. Tras una revisión de la literatura bajo criterios de temporalidad y pertinencia utilizando combinaciones de palabras clave como biopelículas, resistencia antimicrobiana, corriente eléctrica, bacterias; se seleccionaron 16 artículos los cuales exponen el panorama para esta investigación.

En un estudio observacional descriptivo y prospectivo sobre los agentes responsables de las principales infecciones asociadas a atención de salud realizado en el Hospital General Regional 1 del IMSS en Chihuahua, México, se encontraron 7 especies bacterianas con multiresistencia a los 34 antibióticos probados. *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* y *P. aeruginosa* fueron las especies que presentaron el mayor grado de resistencia. Donde *P. aeruginosa* presentó resistencia a los antimicrobianos probados como cloranfenicol, cefalosporinas, carbapenémicos y fluoroquinolonas (31). Por otro lado, en una investigación realizada en el Hospital Infantil de México Federico Gómez donde se estudió la producción de metalo- β -lactamasas y la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* como posibles mecanismos de resistencia a antibióticos carbapenémicos, se observó que 43% de las cepas resistentes a carbapenémicos fueron productoras de metalo- β -lactamasas y el 82.7% de estas cepas resistentes a carbapenémicos eran altas formadoras de biopelículas (32). De esta forma se puede percibir la asociación que existe entre la resistencia a antibióticos y la formación de biopelículas en las infecciones asociadas a la atención de salud.



Como ya se ha mencionado con anterioridad debido al impacto social y económico de las infecciones asociadas a la atención de salud, se han realizado múltiples investigaciones con el fin de comprender como las bacterias adquieren la resistencia a antibióticos. Un hallazgo interesante es el realizado por Ramsay et al. donde al comparar las secuencias de genes asociados a resistencia de antibióticos en muestras de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística contra muestras de *P. aeruginosa* aisladas de distintas fuentes de agua, como ríos y piscinas, notaron variantes en la secuencia de genes asociados a resistencia antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*; como *amgS* (resistencia a trobamicina), *gyrA* y *gyrB* (resistencia a ciprofloxacino), *mexZ* (resistencia amplio espectro) y *ampE* (resistencia a betalactámicos), solo en las muestras aisladas de los pacientes con fibrosis. Esto indica que *P. aeruginosa* posee mecanismos que le permiten desarrollar resistencia a agentes antimicrobianos tras su exposición a ellos (33).

Recientemente, Meirelles et al. describieron un mecanismo relacionado con la exotoxina piocianina producida por la *P. aeruginosa* como sistema de competición adaptativa ante otros organismos. En su estudio observaron que la producción de piocianina activa un sistema de defensa que le confiere un incremento de tolerancia de la bacteria a antibióticos o sustancias químicamente similares a esta exotoxina, como las fluoroquinolonas, al mediar la regulación de expresión del operon *mexGHI-opmD* que codifica bombas de expulsión multidrogas. Al mismo tiempo, “clasificaron en 5 grupos principales a los genes que afectan la tolerancia a la piocianina: represores de sistemas de flujo; respuestas al daño de proteínas; biosíntesis de membrana o pared celular; respuestas a estrés oxidativo; y metabolismo y transporte de carbono” (p.2) (34). Por otro lado, Soukariéh et al. describieron como algunos inhibidores del regulador transcripcional *PqsBC* producen la acumulación de ciertos metabolitos los cuales a su vez aumentan la resistencia de *P. aeruginosa* promoviendo infecciones crónicas. Este regulador *PqsBC* es utilizado por uno de los sistemas del quorum sensing para regular la expresión de genes asociados a la formación de biopelícula y factores de virulencia como la piocianina (35). Otros factores de transcripción que contribuyen a la regulación de los mecanismos de virulencia en *P. aeruginosa* son *GacA* y *ExsA* (36); los genes *algU* y *mucA* que regulan



la síntesis de alginato (37); el gen *MexT* en respuesta a la presencia del antibiótico colistina (38); y los genes asociados a la respuesta a estrés oxidativo como *Pho* (39).

Todos estos factores y mecanismos juegan un rol crucial en la capacidad adaptativa y de supervivencia de bacterias de importancia clínica como la *P. aeruginosa*. Motivo por el cual estas han sido el blanco de estudio durante décadas y la búsqueda de tratamientos más efectivos sigue siendo tema de investigación. Un enfoque interesante es el de utilizar corriente eléctrica como agente antimicrobiano.

2.5 Nanopartículas

La amplitud en el conocimiento con respecto a los mecanismos de resistencia bacteriana y el efecto de antimicrobianos físicos y bioquímicos permitirá enfrentar la creciente problemática de las infecciones asociadas a la atención en salud.

Es por ello por lo que, en la búsqueda de alternativas para prevenir el uso excesivo de antibióticos y prevenir el desarrollo de resistencia, se ha trabajado con diversos tipos de nanopartículas (NPs). En la actualidad, se estudia la aplicación de nanomateriales en el área de la salud humana y animal, con el fin de crear nuevas alternativas terapéuticas, cosméticas y de diagnóstico contra enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer (40).

Las NPs son partículas ultrafinas de tamaño nanométrico (nano, 10^{-9} m). En los últimos años, se ha tenido interés en las nanopartículas metálicas debido a sus propiedades y potenciales aplicaciones en diversas áreas. Entre las nanopartículas metálicas, las de cobre (CuNPs) han resultado muy útiles, esto debido a sus propiedades conductoras catalíticas, ópticas y eléctricas (41). Unas de las ventajas de las CuNPs son: tamaño nanométrico, la morfología de la superficie y el área superficial. Este tipo de NPs, han sido utilizadas en el área de la catálisis heterogénea como catalizadores en la biorremediación de aguas contaminadas y en la desintoxicación de gases (42), lo que indica su función bactericida.

Se sabe que, las CuNPs y nanopartículas de óxidos de cobre (CuONPs), presentan actividad antimicrobiana contra diferentes agentes patógenos causantes de



infecciones en humanos (43). Debido a esto, se ha trabajado en crear materiales multifuncionales que apoye en disminuir o mejor aún inhibir la presencia de estos patógenos y así, evitar dichas infecciones. Se ha observado que, incorporar CuNPs en matrices orgánicas inertes que son expuestas a contaminación bacteriana, produce un material compuesto antimicrobiano (44). La efectividad del cobre sobre *S. epidermidis* se ha evaluado en implantes de silicona utilizados para el aumento mamario; se observó que los implantes con aditivos de cobre impiden la adhesión del *S. epidermidis* (45).

2.6 Corriente eléctrica como alternativa profiláctica

En biología molecular es común utilizar la técnica de electroporación para introducir o expulsar, diversas moléculas en células. La electroporación se sustenta en la capacidad de desestabilizar de manera temporal la concentración de iones dentro y fuera de la membrana celular al aplicar un campo magnético o corriente eléctrica afectando así la permeabilidad de la membrana. El Dr. John William Costerton, realizó varios estudios para observar el efecto de los campos eléctricos en biopelículas bacterianas. En un estudio en colaboración con Blenkinsopp et al (46) “se aplicó un potencial constante de 3V que produjo una intensidad de campo de ± 12 V/cm y una densidad de corriente de $\pm 2,1$ mA/cm²” (p. 3770) se observó un incremento en el efecto antimicrobiano de tres agentes bactericidas logrando la completa eliminación de *P. aeruginosa* y se propuso a la electroporación como uno de los posibles mecanismos de acción. Esto puede ser probable ya que la aplicación de pulsaciones eléctricas crea poros en la membrana celular de distintos tamaños según su duración como lo demuestra un estudio realizado por Saulis et al. en el que observaron la formación de poros pequeños con pulsaciones eléctricas de 100 microsegundos y poros de mayor tamaño que tardan más en cerrarse con pulsaciones de 2 milisegundos (47).

Lo observado por Costerton se ha replicado en estudios más recientes donde se mejoró la eficacia del antibiótico doxiciclina en conjunto con la aplicación de una corriente eléctrica de 5V por 2 min para el tratamiento contra biopelículas subgingivales de muestras tomadas de pacientes con periodontitis crónica (48).

La electroporación también se ha utilizado en la industria alimenticia para eliminar bacterias de productos como la leche. Tal es el caso de un estudio realizado por López



donde se logró disminuir la presencia de distintas bacterias en 90% de las muestras al aplicar pulsos de 1 segundo con intensidad de 110 voltios con periodos de reposo de 3 segundos en un intervalo de 5 minutos y se recalcó la importancia de seleccionar adecuadamente la intensidad, frecuencia y duración de tratamiento para una mayor efectividad (49).

Sin embargo, la electroporación es solo uno de los posibles mecanismos mediante el cual la aplicación de corriente eléctrica incrementa la efectividad de agentes antimicrobianos o incluso actúe como uno. En un estudio realizado recientemente se aplicó un campo electrostático de alto voltaje a bacterias gram positivas *S. aureus* y se observó que la cantidad de especies reactivas de oxígeno intracelular era directamente proporcional a la duración del tratamiento. La exposición al campo electrostático de alto voltaje afectó la membrana celular, la actividad enzimática, incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno y eventualmente provocó el colapso de la célula (50). Observaciones semejantes se hicieron en un estudio con *P. aeruginosa* donde además se analizó la expresión de algunos genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo para determinar el posible rol de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la muerte celular (32).

En los últimos años se ha propuesto utilizar pulsaciones eléctricas en rangos de duración de microsegundos para regular la expresión de genes mediante dispositivos eléctricos. Por ejemplo, se logró incrementar la expresión de un gen reportero en células Hep-2c provenientes de carcinoma cervical mediante pulsaciones eléctricas con duración de microsegundos sin afectar la integridad o viabilidad de la célula y se sugiere que las especies reactivas de oxígeno desempeñan una función importante en la regulación del factor nuclear kappa (NF- κ B) (51).

Mediante esta revisión de la literatura se logró identificar algunos parámetros y efectos de la corriente eléctrica en *P. aeruginosa*, sentando así las bases para esta investigación. Sin embargo, no se han realizado estudios en *P. aeruginosa* combinando la corriente eléctrica con CuNPs, y se analice su efecto tras distintas generaciones. Por lo cual, el objetivo es, conocer el efecto de la corriente eléctrica y las CuNPs en *P. aeruginosa*, en un medio líquido por cinco generaciones.



III. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

3.1 Planteamiento del problema e interrogante de investigación.

En todo el mundo, las infecciones nosocomiales representan un gran problema en los sistemas de salud, con gran impacto socioeconómico. Se ha observado que este problema es debido a los sistemas de adaptación que poseen estos microorganismos contra agentes antimicrobianos como la resistencia a antibióticos y antisépticos. Entre los patógenos con mayor incidencia en infecciones nosocomiales en el IMSS se han reportado: *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (6).

Se ha observado que la mayoría de estas infecciones crónicas se deben a que estos microorganismos crecen en forma de biopelícula. Esto les confiere la capacidad de desarrollar mayor resistencia a antibióticos y facilidad de propagación gracias al sistema de comunicación, quorum sensing, que les permite regular la expresión de genes que codifican factores de virulencia y enzimas asociadas a la biosíntesis de la matriz extracelular (52). Por otro lado, en algunos estudios se ha investigado el uso de corriente eléctrica para eliminar biopelículas bacterianas, por ejemplo, Brinkman et al., observaron la muerte celular en biopelículas bacterianas y concluyeron que esto está posiblemente mediado por especies reactivas de oxígeno producidas por las bacterias como respuesta a la exposición a corriente eléctrica (39).

Existen varias hipótesis que sugieren la electroporación y la intoxicación por especies reactivas de oxígeno como posibles mecanismos mediante los cuales la corriente eléctrica logra cierta actividad antimicrobiana, sin embargo, es necesario obtener más información que soporte dichas hipótesis. Así mismo, es necesario establecer parámetros para utilizar la corriente eléctrica como agente antimicrobiano en la industria sanitaria.

Por otro lado, también se ha observado el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata, oro, zinc, aluminio y cobre. Debido a su tamaño nanométrico estas partículas tienen la capacidad de penetrar las membranas celulares e interferir en la actividad celular normal causando daño celular, debido a distintos mecanismos de acción entre ellos, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lipoperoxidación, y degradación de ADN (53). Incluso, se ha demostrado que éstas son efectivas contra la



formación de biopelículas (54) y tienen un efecto sinérgico al aplicarse en conjunto con algún antibiótico (55).

La interrogante que se expone en esta investigación es: ¿qué efecto tiene la aplicación de corriente eléctrica y CuNPs en la viabilidad y biosíntesis de biopelícula en *P. aeruginosa*?

3.2 Hipótesis

La corriente eléctrica y las CuNPs reducen significativamente la viabilidad, y biosíntesis de biopelícula en *P. aeruginosa* y su efecto es mayor cuando se combinan ambos agentes.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Analizar los efectos de la corriente eléctrica y las CuNPs sobre la viabilidad y formación de biopelículas de *P. aeruginosa*.

3.3.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto de la corriente eléctrica y CuNPs en la viabilidad de *P. aeruginosa*.

Determinar el efecto de la corriente eléctrica y CuNPs en la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*.

IV. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, las IAAS son un problema con implicaciones tanto económicas como sociales, ya que incrementa los gastos hospitalarios debido a la prolongación en la estancia hospitalaria y el riesgo de muerte del paciente (56). Murray et al. (57) comentan que esta problemática reside en la multirresistencia a agentes antimicrobianos que poseen bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, e instan a identificar, evaluar y desarrollar estrategias para disminuir el impacto negativo de estas infecciones.

Los mecanismos de resistencia a antimicrobianos de las bacterias comúnmente asociadas a infecciones nosocomiales han sido objeto de investigación en numerosos estudios. Troncoso et al. (18) resaltan la necesidad de investigar estos mecanismos de resistencia desde un enfoque tanto estructural como molecular y esto no solo facilitará la



identificación de áreas de oportunidad en las estrategias para el control de infecciones sino también establecer nuevos objetivos terapéuticos o tratamientos más eficaces ante estos patógenos multirresistentes. Esta investigación pretende estudiar algunos de los mecanismos propuestos que le confieren a *P. aeruginosa* su capacidad adaptativa y de supervivencia ante la exposición a agentes antimicrobianos.

La ampliación del conocimiento acerca de los mecanismos de resistencia utilizados por las bacterias permitirá diseñar protocolos de desinfección de superficies hospitalarias más eficaces ante estas cepas microbianas multirresistentes. Por ejemplo, Ortega et al. (52) concluyen que el desarrollo de alternativas terapéuticas contra la formación de biopelícula abre la oportunidad a nuevas áreas de investigación. Por lo que el valor teórico de esta investigación es aportar más conocimiento sobre los efectos de agentes físicos y bioquímicos sobre los factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*. Esto a su vez, tendrá implicaciones prácticas de alcance social ya que con base en estos conocimientos generados se podrían identificar nuevas dianas terapéuticas y objetos de estudio o diseñar nuevos procedimientos antimicrobianos como, por ejemplo, tratar superficies o materiales con agentes antimicrobianos en conjunto con la exposición a un campo eléctrico de baja intensidad ya que este campo incrementa la eficacia de algunos agentes microbianos según observaron Del Pozo et al (27). Lo cual podría abonar la problemática social y económica relacionada con las infecciones asociadas a la atención en salud, ya sea mediante nuevos tratamientos o estrategias de prevención.

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio, con enfoque cuantitativo y un diseño experimental. El diseño experimental empleado será un cuadro latino de 2x2 con ensayos por triplicado.



		Corriente eléctrica	
		Sin	Con
CuNPs	Sin	00	01
	Con	10	11

Tabla 1 Cuadro latino del diseño experimental

5.2 Unidades experimentales

5.2.1 Descripción de las unidades experimentales

Se seleccionó *P. aeruginosa* por ser una de las bacterias de importancia clínica en infecciones asociadas a la atención de salud que presenta multirresistencia a antibióticos y alta capacidad formadora de biopelículas. Se utilizará la cepa de referencia ATCC *P. aeruginosa* PA14 (BAA-1744 strain designation 109246, Lot 700498), la cual ya cuenta con la secuenciación completa de su genoma y se conoce su farmacorresistencia. La cepa PA14 demuestra un incremento en su virulencia y patogenicidad en comparación con la cepa PAO1 (58).

5.2.2 Criterios de selección de la muestra

La cepa de referencia PA14 es resistente a beta-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas. Mediante un muestreo probabilístico aleatorio simple se seleccionó una muestra n dentro de una población N de *P. aeruginosa* que sean resistentes a β -lactámicos y aminoglucósidos al ser estos los antibióticos más utilizados en infecciones por *P. aeruginosa*. También se consideró que fuera alta formadora de biopelícula ya que este es un factor de patogenicidad de relevancia clínica (31,49).

5.2.3 Tamaño de la muestra y muestreo

Para cada grupo experimental se realizaron 3 réplicas. Se realizó el experimento en cuatro generaciones consecutivamente.

5.3 Definición de variables

5.3.1 Dependientes

Formación de biopelícula: La biopelícula se define como comunidad de bacterias sésiles embebidas en una matriz extracelular compuesta de exopolisacáridos y proteínas, y las protege de factores externos como agentes propios de la respuesta



inmune del organismo huésped. En esta investigación la variable se define operativamente como la formación de biopelícula tras la aplicación de los tratamientos y 24 horas de incubación y se medirá el porcentaje de cambio en la absorción mediante el ensayo de cristal violeta.

Viabilidad: Se refiere a la cantidad de células o crecimiento ocurrido transcurridas 24 horas de incubación en caldo nutritivo. La definición operativa de esta variable hace referencia a la inhibición del crecimiento el cual se medirá el cambio de porcentaje de cambio de absorción mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

Finalmente, la resistencia a antibióticos hace referencia a la capacidad que tienen las bacterias a sobrevivir y desarrollarse en presencia de antibióticos. Para esta investigación se medirá la sensibilidad al medir la incapacidad de crecimiento de las bacterias ante la presencia de un antibiótico, mediante el ensayo de concentración mínima inhibitoria.

5.3.2 Independientes

Corriente eléctrica: se refiere al flujo de electrones a través de un medio que sirve de conductor este puede ser sólido, líquido o gaseoso. En esta investigación se utilizará un medio líquido, caldo nutritivo y se medirá en voltios.

Nanopartículas de cobre: se definen como entidades de cobre ultrafinas de tamaño nanométrico (nano, 10^{-9} m) (41).

4.4 Técnicas y procedimientos

Para la reactivación de la cepa de referencia se prepararon 70 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB) y 400 mL de agar TSB. Para el caldo TSB se disolvieron 2.1 g del medio TSB en 70 mL de agua destilada (dH_2O) en un matraz Erlenmeyer de 150 mL. Se calentó en parrilla de calentamiento con agitador magnético hasta clarificar. Utilizando una pipeta serológica se llenaron 10 tubos de ensayo con 6 mL de caldo TSB. Para la preparación del agar TSB se disolvieron 16 g de agar en 400 mL de dH_2O en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL y se clarificó en parrilla de calentamiento con agitador



magnético. Se esterilizaron los 10 tubos con caldo TSB y el agar en autoclave a 121° C por 15 min. Se prepararon 20 placas de agar TSB para cultivo de la cepa de referencia y guardaron en el cepario del laboratorio de microbiología de la Facultad de Químicas de la UACH.

Para el experimento se prepararon 68 tubos de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo (BD Bioxon, México). El caldo nutritivo se preparó con 5.6 g de medio en polvo disuelto en 700 mL de dH₂O en un matraz. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 min junto con 10 cajas Petri de 5 cm de diámetro, 1 tubo de ensayo de 50 mL y 48 tubos de 10 mL sin tapa.

El espectrofotómetro permite medir la absorción de luz (A) o densidad óptica (OD) al detectar la reducción de luz transmitida al enturbiarse el cultivo al aumentar la cantidad de células en suspensión. Para determinar el número de células viables se llevó a cabo por espectrofotometría en placa de 96 pocillos para igualar a la concentración 0.5 McFarland, la cual es equivalente a 1.5×10^8 CFU/mL con una OD 600 de 0.08-0.10 (50).

Se reactivó la cepa de referencia ATCC *P. aeruginosa* PA14 (BAA-1744 strain designation 109246, Lot 700498) en tubos con 6 mL de caldo TSB y se incubó a 37°C por 24h. Se transfirieron 100 µL del cultivo madre de *P. aeruginosa* a un tubo con 10 mL de caldo nutritivo y se incubó a 37°C por 24 h. Transcurridas las 24 h se preparó una solución de trabajo ajustada a 0.5 McFarland (OD600 = 0.9). Todos los ensayos se realizaron en la campana de flujo (LABCONO purifier Biological Safety Cabinet, USA) del laboratorio de biotecnología de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas.

5.4.1 Dispositivo para tratamiento eléctrico

Se utilizó una fuente de poder para cámara de electroforesis (Modelo EC300XL, Thermo Scientific, Estados Unidos). Se conectaron tres pares de caimanos a los cables para sostener los electrodos de grafito (Hilitand, Estados Unidos) (5 mm de diámetro x 1 cm de alto). Se diseñó una base en SolidWorks® y se imprimió en impresora 3D Ender 3 Max Neo (Creality, China) para sostener los electrodos a una distancia de 1 cm entre ellos y poder realizar las réplicas de los tratamientos en un mismo momento (figura 2).



Figura 2 Fotografía del dispositivo para el tratamiento eléctrico que sostiene electrodos a una distancia de 1cm.

5.4.2 Nanopartículas de cobre

Se prepararon nanopartículas de cobre (CuNPs) mediante el método de reducción acuosa (59). En un matraz de 125 mL se añadieron 0.624 g de sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Meyer, Estados Unidos) y 50 mL dH_2O ; en otro matraz de 125 mL se disolvieron 0.094 g de borohidruro de sodio (NaBH_4) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), en 50 mL de dH_2O . La solución de borohidruro de sodio se pasó por goteo, a una velocidad de 1 gota por segundo, hacia la solución sulfato cúprico con agitación magnética. Se observó en cambio de coloración a café-amarillento de la solución como indicador de la precipitación de las CuNPs (figura 3) (59).

Se dividió el volumen en tubos de ensayo y se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min, tras lo cual se retiró con cuidado el sobrenadante. Se realizó un lavado añadiendo agua destilada y se resuspendió en sonicador por 1 min. Con una pipeta se extrajeron las CuNPs y se recolectaron en otro tubo de ensayo para secar en horno a 60-80 °C por 24 h. Se pesaron y se obtuvieron 0.268 g de CuNPs las cuales nuevamente se resuspendieron en 25 mL dH_2O . Y se prepararon 35 mL de solución de trabajo con una concentración de 24000 $\mu\text{g/mL}$ CuNPs.



Figura 3 Preparación de CuNPs mediante método de reducción acuosa

Las CuNPs se caracterizaron por microscopía de barrido electrónico de emisión de campo, FESEM (JSM-7401F, JEOL Ltd., Japón) y mediante espectroscopía de energía dispersada, EDS (EDAX Octane super-A, Estados Unidos) en el laboratorio del Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) para confirmar la presencia de partículas de cobre con un tamaño menor a 100 nm (figura 4). Se trabajó con CuNPs a una concentración de 3000 $\mu\text{g/mL}$.

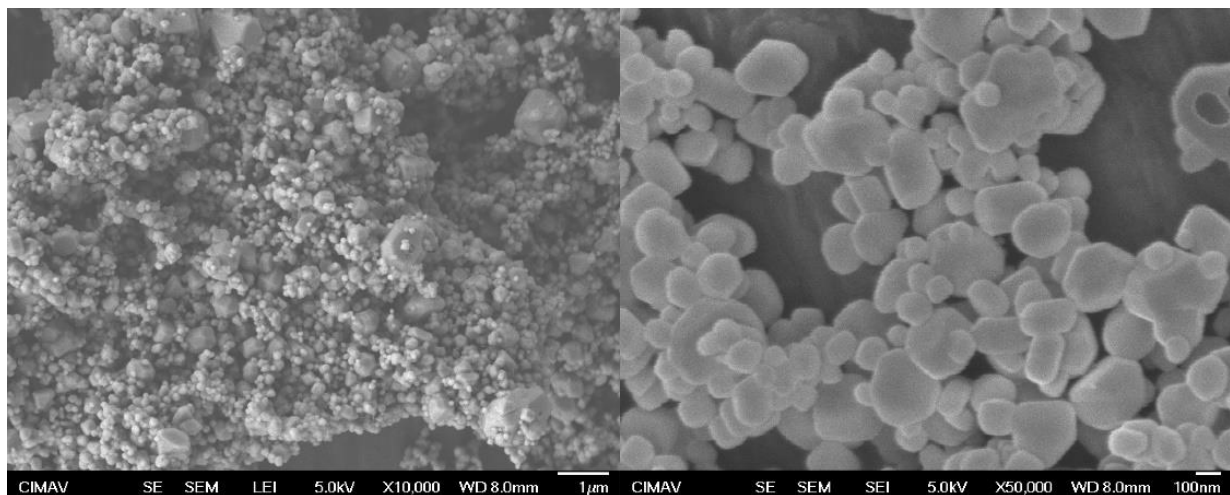


Figura 4 Imágenes obtenidas del FESEM-EDS para la caracterización de las CuNPs, donde se aprecian agregaciones de partículas de distintos tamaños, mayores y menores de 100 nm.

5.4.3 Tratamientos

A partir del cultivo madre de PA14 se inoculó un tubo con 10 mL de caldo nutritivo y se incubó por 24 h a 37°C. De este cultivo de 24 h se preparó la solución de trabajo de *P. aeruginosa* con una concentración 0.5 McFarland (1.5x10⁸ CFU/mL). Tras cada tratamiento se incubó 1 mL de muestra en tubos de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo por 24 h y se repitieron los tratamientos para las generaciones posteriores. Los tratamientos se realizaron 5 veces para un total de 5 generaciones. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado (figura 5). La descripción de los tratamientos es la siguiente:

a. Corriente eléctrica directa

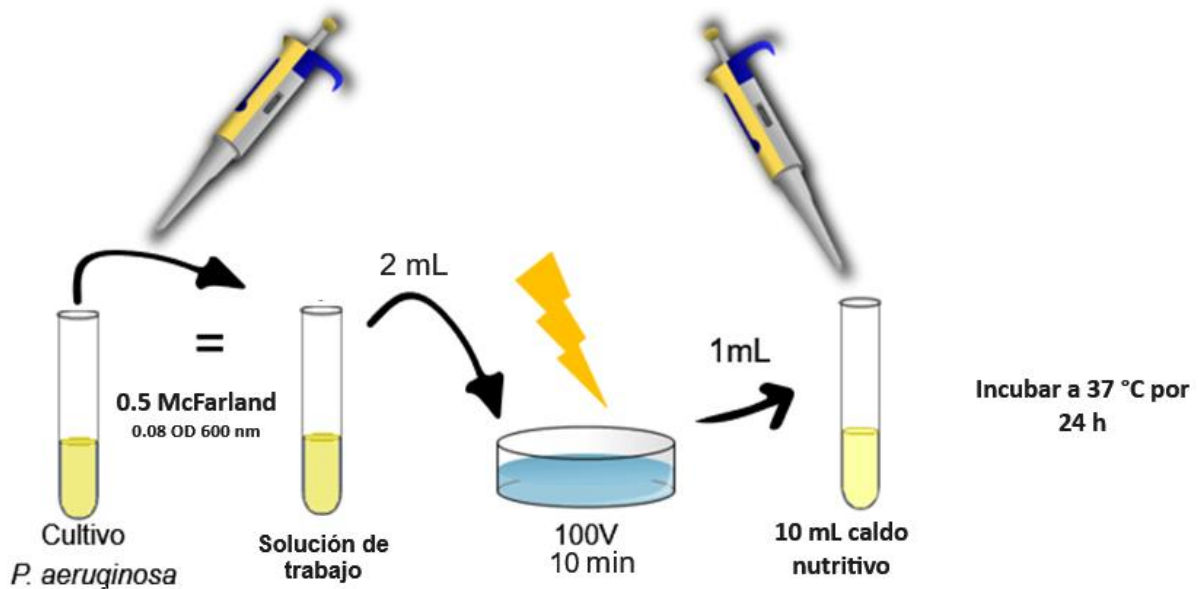


Figura 5 Procedimiento para el tratamiento con 100 V por 10 min

Se colocaron 2 mL de la solución de trabajo en una caja Petri de vidrio de 5 cm de diámetro. Se colocaron los electrodos de grafito en los caimanes conectados a la fuente de poder EC 300 XL (Thermo Scientific, USA) y se encendió programada a 100 V constantes por 10 min. Se retiraron los electrodos y se transfirió 1 mL de muestra a un tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo previamente etiquetado para incubar a 37° C por 24 h.

b. Corriente eléctrica con nanopartículas de cobre

Se colocaron 1.75 mL de la solución de trabajo en la caja Petri de vidrio y se añadieron 0.25 mL de CuNPs con una concentración de 24000 $\mu\text{g/mL}$ para obtener una concentración final de CuNPs de 3000 $\mu\text{g/mL}$. Se colocaron los electrodos de grafito con los caimanes y se encendió la fuente de poder EC 300 XL (Thermo Scientific, USA) programada a 100 V constantes por 10 min. Se retiraron los electrodos y se transfirió 1 mL de muestra a un tubo con 10 mL de caldo nutritivo previamente etiquetado para incubar a 37° C por 24 h (figura 6).

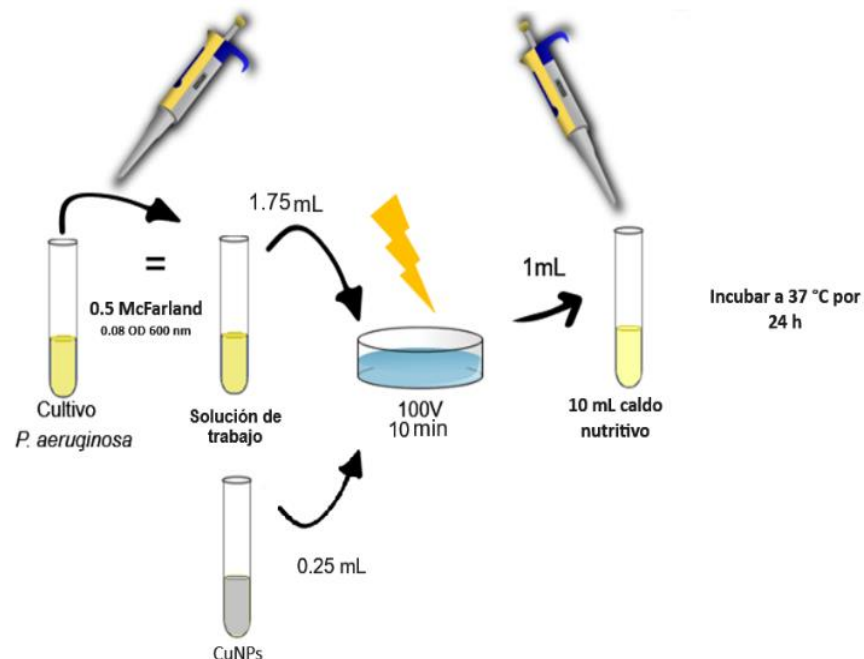


Figura 6 Procedimiento utilizado para ensayo combinando 100V por 10 min y CuNPs

c. Nanopartículas de cobre

Se colocaron 1.75 mL de la solución de trabajo en la caja Petri de vidrio y se añadieron 0.25 mL de CuNPs con una concentración de 24000 $\mu\text{g/mL}$ para obtener una concentración final de CuNPs de 3000 $\mu\text{g/mL}$. Se transfirió 1 mL de muestra a un tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo previamente etiquetado para incubar a 37°C por 24 h (figura 7).

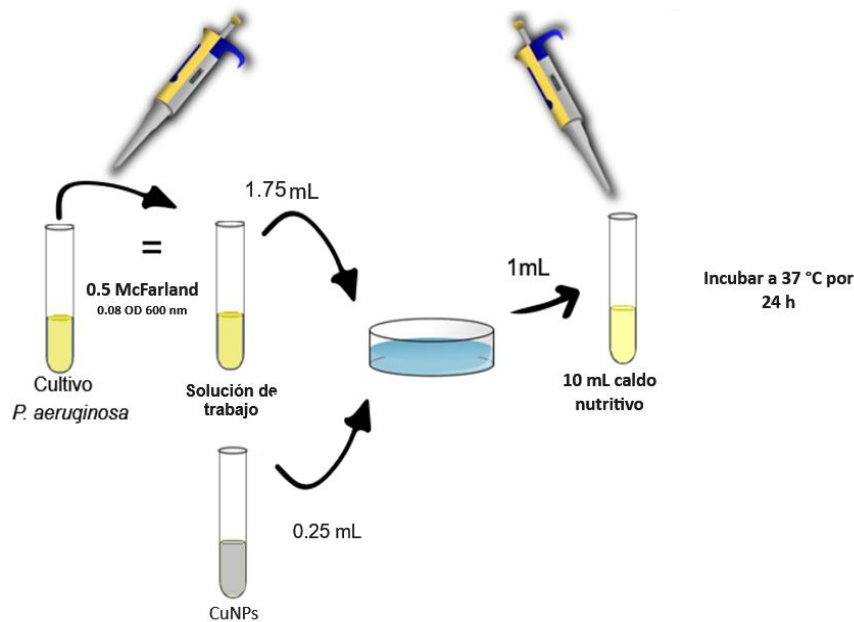


Figura 7 Procedimiento para tratamiento con 3000 µg/mL CuNPs

d. Control

Se tomó 1 mL de solución de trabajo sin tratamiento y se transfirió a un tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo para incubar a 37°C por 24 h. Este procedimiento se repitió por triplicado para cada generación.

5.4.4 Ensayos

a. Análisis de viabilidad celular por ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

El análisis de viabilidad se realizó mediante el ensayo MTT. El MTT es una sal de tetrazolio de color amarillo la cual es metabolizada por las deshidrogenasas de las células reduciéndola a formazán de color violeta. Este cambio de color ocurre solamente cuando las células están metabólicamente activas motivo por el cual es utilizado como indicador de la viabilidad celular (60). A partir del cultivo de 24h a 37° de cada muestra se prepararon soluciones de trabajo con concentración 1.5×10^8 CFU/mL. Se añadieron 100 µl de la solución de trabajo de cada replica a un pozo en microplaca de 96 pozos y se incubó por 24h a 37°C. Tras las 24 h se descartó el medio de cultivo y se añadieron



100 μ l de caldo nuevo y 10 μ l de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se incubó la placa por 2 h a 37 °C. Después se descartaron 75 μ l del medio y se añadieron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezcló bien cada pozo para solubilizar el formazán dejando incubar por 10 min a 37 °C. Se leyó la absorbencia a 570 nm en lector de microplacas iMark™ microplate reader (BIO-RAD, USA).

b. Cuantificación de biopelícula

El ensayo para la cuantificación de biopelícula se realizó mediante el método en microplaca con tinción cristal violeta. Al ser un colorante de carga positiva, el cristal violeta, tiene afinidad con todos aquellos componentes celulares de carga negativa que integran la biopelícula, como lo son los lipopolisacáridos, algunas proteínas y el ADN extracelular. Esto permite utilizar este colorante para cuantificar la biomasa resultante de la formación de biopelículas (61). A partir del cultivo de 24h a 37° de cada muestra se prepararon soluciones de trabajo con concentración 1.5×10^8 CFU/mL para cada tratamiento. Se añadieron 100 μ l de la solución de trabajo a un pozo por tratamiento en microplaca de 96 pozos y se incubó por 2 h a 37 °C. Se retiró el medio, se realizó un lavado con 100 μ l buffer de fosfato (PBS) y se añadieron 100 μ l de caldo nutritivo nuevo para incubar por 24h a 37°C. AL día siguiente se descartó el medio de cultivo y se realizó otro lavado con PBS. Se añadieron 100 μ l de cristal violeta (1% en dH₂O) y se incubó 20 min a 37°C. Tras la incubación se descartó con cuidado el cristal violeta y se añadieron 150 μ l de etanol al 95%. Se tomaron 100 μ l de cada pozo y se transfirieron a un pozo limpio para la lectura de absorbencia a 590nm en lector de microplacas iMark™ microplate reader (BIO-RAD, USA).

5.4.5 Plan de análisis

Los datos recopilados de cada ensayo se organizaron en tablas en Excel (Microsoft, USA). Los tratamientos y control en las filas y las generaciones en las columnas. Se calculó la media y desviación estándar del control y los tratamientos por generación y el total de las lecturas de densidad óptica obtenidas en cada ensayo. Se calculó el porcentaje de inhibición tanto para el ensayo de MTT como para la formación de biopelícula con la siguiente fórmula:



$$\% \text{ inhibición} = \frac{OD_{\text{ctrl}} - OD_{\text{tx}}}{OD_{\text{ctrl}}} * 100$$

Donde,

OD_{ctrl} = la media de la DO_{600} del control

OD_{tx} = la media de la OD_{600} del tratamiento referencia

Para la selección del estadístico a utilizar primero se realizó la prueba de normalidad de datos de Kolmogorov-Smirnov (N=72). Para los datos de viabilidad se comprobó su normalidad ($p > 0.05$) y su esfericidad ($p > 0.05$) por lo que se empleó el estadístico paramétrico ANOVA de medidas repetidas para observar el efecto de los factores tratamiento y generación sobre la variable independiente, donde se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Debido a que en los datos de formación de biopelícula no se observó la normalidad ($p < 0.05$) ni esfericidad ($p = 0.50$), se realizó una transformación logarítmica de los mismos con el fin de estabilizar la varianza. Por lo tanto, también se analizó mediante ANOVA de medidas repetidas, determinando diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$. El análisis de datos se realizó utilizando el software estadístico STATA versión 14.2 (StataCorp, USA).

5.5 Consideraciones éticas

En la realización de esta investigación se hizo uso adecuado de los recursos provistos por la institución con los fines para los cuales fueron proporcionados. Dado que esta experimentación se realizó con bacterias y no se trabajó con animales por lo que no fue necesaria la carta de consentimiento informado ya que no entra en los criterios considerados en los artículos 96 a 103 de la Ley General de Salud. Sin embargo, debido a que se manipuló un agente infeccioso del grupo de riesgo 2, se siguieron las recomendaciones de bioseguridad nivel 2 de laboratorio, como lo son el uso de guantes, mascarilla, campana de flujo, desinfección de áreas de trabajo, entre otros. Se desecharon los residuos contaminados en bolsas de polietileno rojas conforme lo establecido en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

V. RESULTADOS

En esta investigación se utilizó la cepa de referencia ATCC PA14 la cual está clasificada como una cepa alta formadora de biopelícula y multirresistente, la resistencia se muestra en la figura 8.



Figura 8. Antibiograma realizado a cepa de referencia PA14 para confirmar multidrogorresistencia

Ya que el objetivo de esta investigación fue analizar el efecto de la corriente eléctrica y las nanopartículas de cobre en la formación de biopelícula y viabilidad, se realizaron los ensayos de viabilidad celular por MTT y cuantificación de biopelícula mediante tinción con cristal violeta. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de estas pruebas.

6.1 Efecto de los tratamientos en la viabilidad de *P. aeruginosa*

Los datos obtenidos tras cinco generaciones ($N = 72$) presentaron una distribución normal ($p > 0.05$), por lo que se empleó el estadístico ANOVA medidas repetidas con el objetivo de determinar el efecto de los factores tratamiento y generación. Se encontraron diferencias significativas en la inhibición de crecimiento celular tras la aplicación del tratamiento con 100 V por 10 min ($p = 0.032$) y el tratamiento combinado de 100 V por 10 min con CuNPs ($p = 0.037$) en comparación con el grupo control (figura 9).

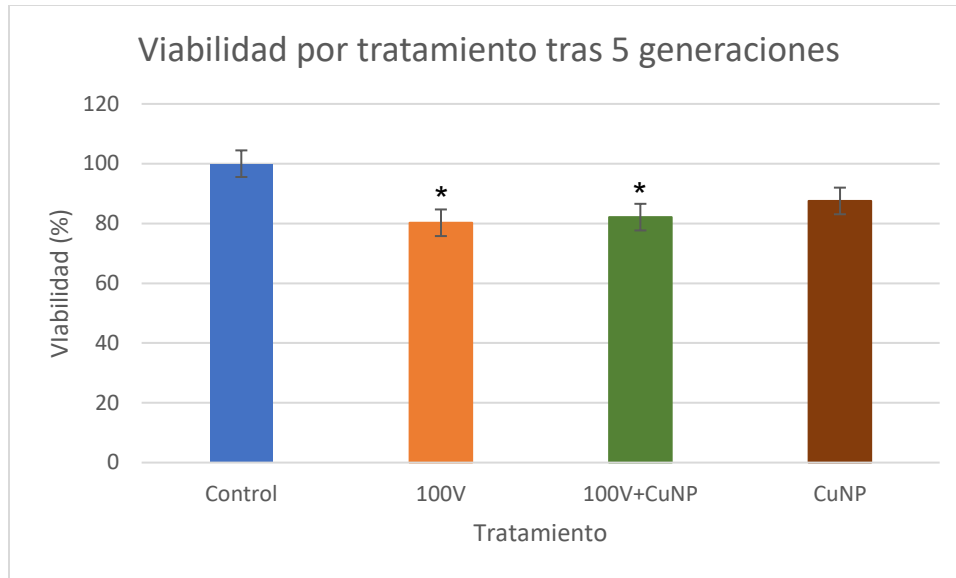


Figura 9. Porcentaje de viabilidad de crecimiento de *P. aeruginosa* según el tratamiento tras la exposición por cinco generaciones.

De igual manera, se observaron diferencias significativas entre las generaciones 1 ($p = 0.001$), 3, 4, y 5 ($p = 0.000$) en comparación con la generación 0 (control). Sin embargo, tras las comparaciones pareadas de Tukey, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro de estas generaciones (Figura 10).

Viabilidad en *P. aeruginosa* por generación según el tratamiento

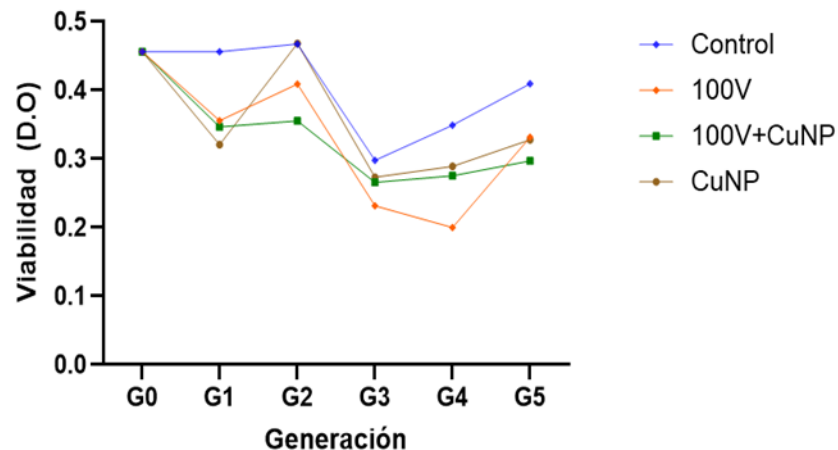


Figura 10. Comparación de medias de densidad óptica en viabilidad por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*



6.2 Efecto de los tratamientos en formación de biopelícula de *P. aeruginosa*

Se obtuvieron 72 lecturas de densidad óptica tras las pruebas de cuantificación de biopelícula por tinción de cristal violeta. Tras la transformación logarítmica de los datos se obtuvo una distribución normal ($p > 0.05$) por lo que se empleó el mismo estadístico paramétrico que en viabilidad.

El análisis para observar diferencias debido a los tratamientos y generaciones se realizó ANOVA medidas repetidas, donde se obtuvieron diferencias significativas en las generaciones 1 a 4 ($p = 0.000$). Por otro lado, solamente el tratamiento con 100 V DC por 10 min logró una reducción significativa del 13% ($p = 0.048$) en la formación de biopelícula tras las cinco generaciones (Figura 11).

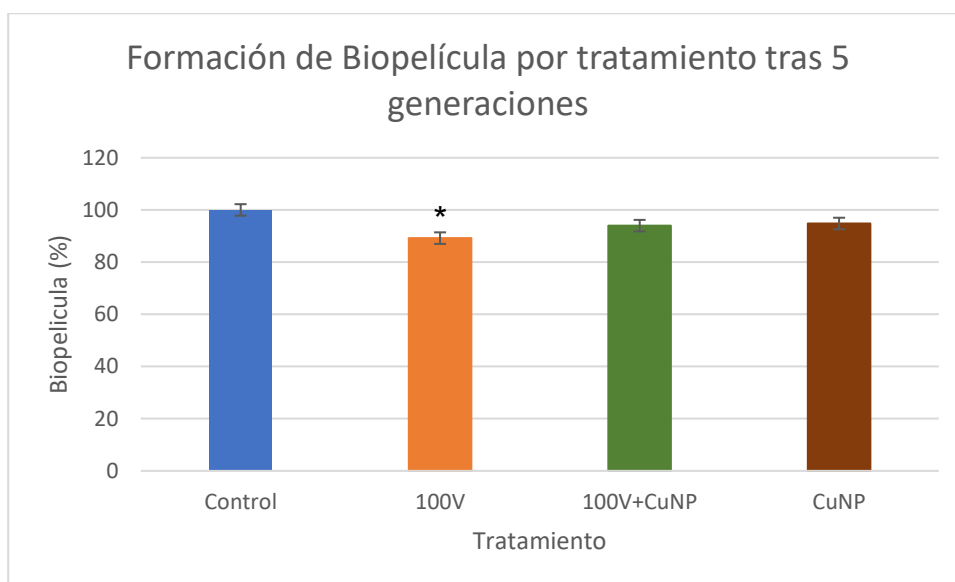


Figura 11. Porcentaje de formación de biopelícula por tratamiento tras cinco generaciones.

Tras realizar las comparaciones pareadas de Tukey se observaron diferencias significativas solo en la primera generación con el tratamiento combinado ($p = 0.024$) y las CuNPs ($p = 0.018$) (Figuras 12 y 13).



Formación de biopelícula por generación según el tratamiento

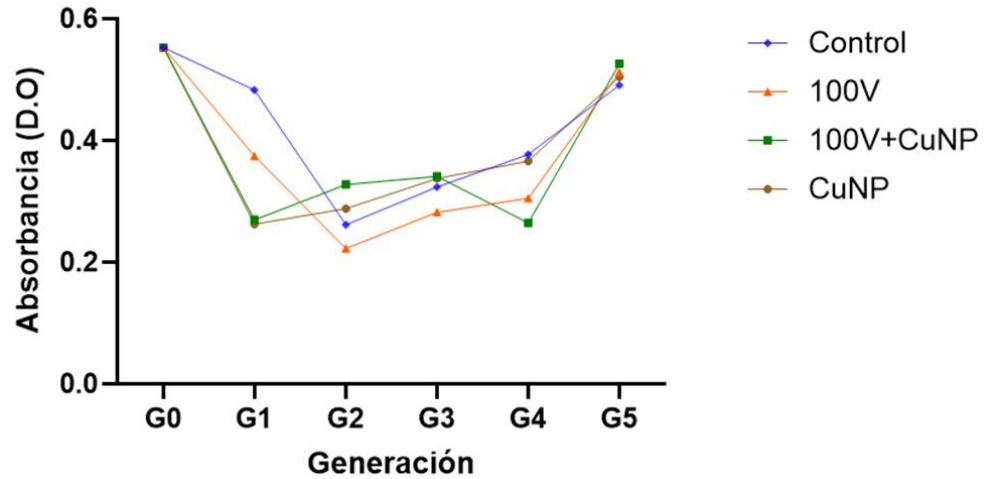


Figura 12. Comparación de medias de densidad óptica en formación de biopelícula por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*

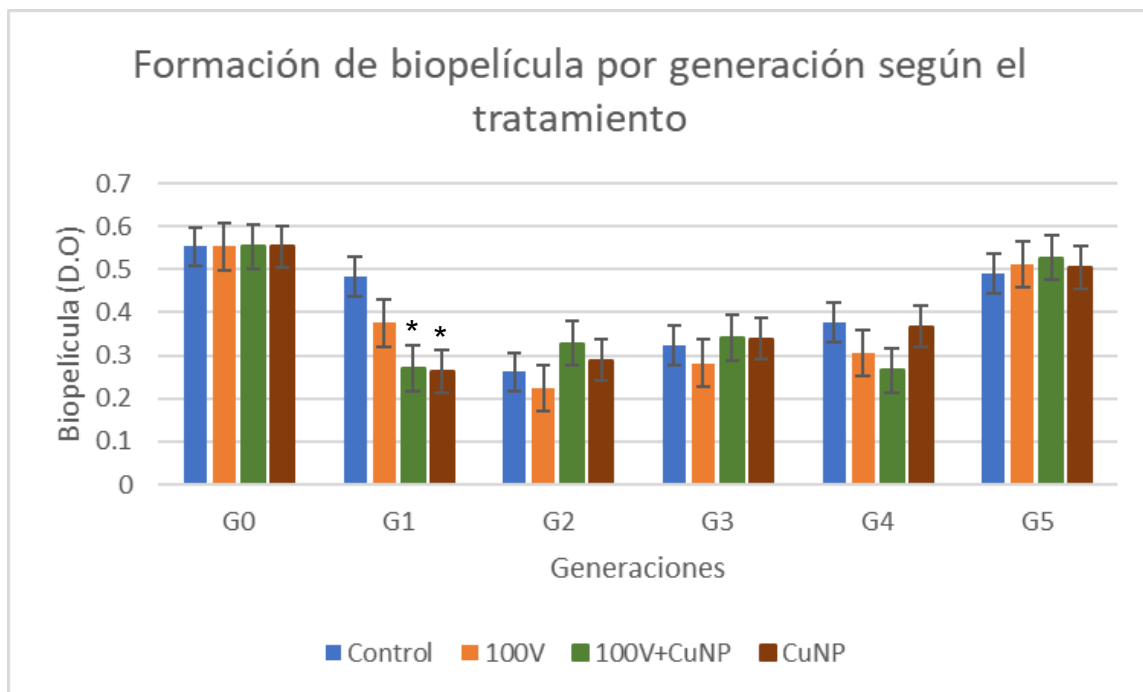


Figura 13. Formación de biopelícula por generación según el tratamiento en *P. aeruginosa*

6.1 Tesis

Los resultados de este experimento indican que el tratamiento de 100 V DC por 10 minutos es el único tratamiento que inhibe significativamente la formación de biopelícula tras cinco generaciones. Por lo que, en el caso de los tratamientos con 3000



$\mu\text{g/mL}$ de CuNPs y el tratamiento combinado de corriente eléctrica y CuNPs se rechazan las hipótesis de investigación y se acepta la hipótesis nula.

En cuanto a la viabilidad se observaron reducciones significativas en el crecimiento de *P. aeruginosa* tras el tratamiento con corriente eléctrica y el tratamiento combinado, sin embargo, el tratamiento combinado tuvo un efecto ligeramente menor al de corriente eléctrica.

VI. DISCUSIÓN

Mediante este estudio se evaluó el efecto de la corriente eléctrica y las CuNPs sobre la formación de biopelículas y la viabilidad de *P. aeruginosa* en un medio líquido. Los resultados demostraron que la aplicación de 100 V de corriente eléctrica por 10 minutos es el tratamiento de mayor eficacia contra la formación de biopelícula y reduce la viabilidad de PA14 tras su exposición por cinco generaciones. Estos hallazgos son consistentes con investigaciones previas donde se ha observado este efecto electricidad en distintas cepas de *P. aeruginosa* (39, 46, 62-65).

Estas investigaciones previas sugieren posibles mecanismos de acción mediante los cuales la corriente eléctrica puede dañar la membrana celular o producir especies reactivas de oxígeno que provocan la muerte celular. La mayoría de los autores que han estudiado este fenómeno, como Costerton, Blenkinsopp (46), Brinkman (39), Dusane (62), Lochab (66), Shawki (63), Niepa (64), Schmidt-Malan (65) y Ruiz-Ruigomez (67) entre otros, concuerdan en que la electroporación daña la membrana celular de *P. aeruginosa* al crear poros que permiten el acceso de agentes antimicrobianos. Por ejemplo, en el estudio realizado por Schmidt-Malan et, al. (65) donde se determina el efecto electricidad en distintos organismos probando distintos parámetros de tiempo de exposición, superficies y electrodos, se observó que en la cepa Xen5 de *P. aeruginosa* se logró una reducción en la formación de biopelícula en discos de teflón de 4.99 log CFU/cm² tras 4 días de exposición intermitente con 200 μA , y en PA14 la reducción fue de 4.12 log CFU/cm² bajo las mismas condiciones. Por otro lado, Ruiz-Ruigomez et, al. (67) observaron una reducción de biopelícula en Xen5 de 4 log CFU/cm² con 500 μA en tan solo 24 h en discos de teflón utilizando electrodos de titanio.



La mayoría de los autores concuerdan que el efecto electricidad es tiempo y dosis dependiente (39, 46, 48, 62-68), y que dicho efecto es proporcional, lo que significa que a mayor tiempo o dosis habrá mayor efecto. Lo cual concuerda con lo observado en el presente estudio donde se observó un 10.8 % de reducción en la formación de biopelícula y de un 19.7 % en la viabilidad en comparación con el grupo control tras cinco generaciones tras la aplicación de 100 V DC por 10 minutos. No obstante, en el estudio realizado por Shawki et, al. (63) se observó una reducción del 44% en la formación de biopelícula con tan solo 9 V en 15 min en *P. aeruginosa* PA01 en TSB utilizando electrodos de plata. Esta diferencia podría deberse a otro de los posibles mecanismos sugeridos por varios autores, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (39, 62, 64, 69). Al utilizar electrodos metálicos (plata, cobre, acero inoxidable o titanio) es posible que la corrosión de dichos electrodos libere iones, en especial de metales como Fe^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , y estos a su vez, actuar como catalizadores en la producción de radicales superóxido o hidroxilo, provocando una respuesta de la bacteria y con el tiempo causando daño celular (39, 50, 70). Por otro lado, los iones liberados de los electrodos de plata (Ag^+), aunque directamente no produzcan ROS, por si solos han demostrado actividad antimicrobiana por su toxicidad a las células (71).

Aunque en la presente investigación se utilizaron electrodos de carbono para descartar la liberación de iones potencialmente tóxicos (64), se puede sospechar de la electrolisis como el posible mecanismo en la producción de ROS ya que se utilizó caldo nutritivo como medio conductor. Esto se explica ya que el caldo nutritivo contiene sales ($NaCl$) y mediante la electrolisis se liberan iones de cloro, que tras reaccionar con el agua del medio produce ácido hipocloroso ($HOCl$), el cual es un potente antimicrobiano (69). Por lo que podemos concluir que la reducción tanto en viabilidad como en la formación de biopelícula tras la aplicación del tratamiento eléctrico, podría ser resultado de la electrolisis y electroporación al producirse $HOCl$ y facilitar su introducción en las células mediante el daño estructural de la membrana celular. Lo cual posiblemente indujo modificaciones a nivel molecular interfiriendo en la replicación y mecanismos de reparación del ADN alterando el correcto funcionamiento de las células (72).

El uso de CuNPs en conjunto con la corriente eléctrica también mostró una reducción significativa en la viabilidad de *P. aeruginosa*, aunque menor comparada con



la corriente eléctrica por sí sola. Sin embargo, no se observó un efecto sinérgico significativo contra la formación de biopelícula. Esto puede deberse a que las CuNPs utilizadas en esta investigación tenían en su mayoría un tamaño de 100 nm y se ha observado que tanto el tamaño como la forma de las nanopartículas influyen en su efecto. Siendo aquellas de menor tamaño y planas las más eficaces contra bacterias gram negativas (71, 73). Al ser nanopartículas de mayor tamaño, esto dificultó su penetración por la matriz extracelular de la biopelícula y por ende un efecto reducido.

Es imperante destacar que, a pesar de los resultados positivos obtenidos en esta investigación, es necesario realizar más estudios para determinar los efectos a largo plazo de estos tratamientos y sus mecanismos de acción. Es de interés notar, que se observaron fluctuaciones en las mediciones entre las generaciones incluso en el grupo control, tanto en la viabilidad como en la formación de biopelícula. Estas fluctuaciones pueden deberse a factores como: la acumulación de metabolitos secundarios como la pirocianina; factores biológicos como la selección natural; o factores experimentales como inconsistencias en lavados o errores de pipeteo.

La pirocianina, incluso en bajas concentraciones, tiene la capacidad de incrementar el estrés oxidativo en *P. aeruginosa* induciendo así un cambio hacia un metabolismo anaerobio aun en presencia de oxígeno (74). Ya que el metabolismo aeróbico es más eficiente para la producción de energía y por lo tanto la tasa de crecimiento es mayor, el cambio de ruta metabólica a la fermentación resulta en un crecimiento más lento. Por otro lado, este mismo estrés oxidativo incrementa la probabilidad de mutaciones espontáneas que afecten la función normal de la célula, en especial si la célula tiene una deficiencia en el sistema de reparación de errores de emparejamiento, lo cual se ha observado en cepas derivadas de PA14 (75). Además, este incremento de estrés oxidativo también podría inducir la aparición de variantes de colonia pequeña como estrategia adaptativa para mitigar los efectos negativos de la pirocianina (76). De esta manera, se explicaría como se observa una disminución de biopelícula y viabilidad en las generaciones 2 y 3 respectivamente, seguido de un incremento gradual en las generaciones posteriores al grado de casi alcanzar su estado original.



Por lo tanto, entre los principales riesgos de utilizar la corriente eléctrica y las nanopartículas de cobre como tratamientos alternativos contra *P. aeruginosa*, es el desarrollo de resistencia. Las fluctuaciones antes mencionadas podrían ser indicio de esta resistencia. Esta resistencia puede desarrollarse debido a la redistribución de cargas en las moléculas, como las proteínas y el ADN, lo cual puede inducir cambios conformacionales o mutaciones que alteren la función de dichas moléculas afectando así los procesos biológicos de la célula en cuestión (77). La desnaturalización del ADN, debido al calor producto del flujo de electrones, y la activación del sistema de respuesta al estrés debido a la presencia de ROS, y la presencia de HOCl pudieran incrementar la tasa de mutación y crear variantes resistentes al no aplicarse una intensidad de corriente letal.

Por lo tanto, las principales limitantes de esta investigación fueron no cuantificar la concentración de piocianina y ROS, solo tres replicas por muestra. Se pretende realizar los ensayos para el análisis de expresión de genes asociados a la formación de biopelícula, estrés oxidativo, resistencia a fármacos y quorum sensing, ya que este último juega un papel fundamental en la regulación de genes y formación de biopelícula.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación demuestran ser efectivos para la inhibición en la formación de biopelícula y viabilidad aplicando 100 V DC por 10 minutos cada 24 h tras cinco generaciones. Sin embargo, destaca la importancia de aplicar una dosis letal para evitar el desarrollo de resistencia a estos tratamientos. Prospectivamente, se realizará el análisis de expresión génica para elucidar los mecanismos moleculares que explican los efectos de la corriente eléctrica y las CuNPs sobre *P. aeruginosa*.



VIII. REFERENCIAS

1. Hernández A, Yagüe G, García Vázquez E, Simón M, Moreno Parrado L, Canteras M, et al. [Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* (carbapenems included): predictive and prognostic factors. A prospective study (2016-2017)]. *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2018;31(2):123-30.
2. Karakonstantis S, Kalemaki D. Antimicrobial overuse and misuse in the community in Greece and link to antimicrobial resistance using methicillin-resistant *S. aureus* as an example. *Journal of Infection and Public Health*. 2019;12(4):460-4.
3. Iancu D, Moldovan I, Țilea B, Voidăzan S. Evaluating Healthcare-Associated Infections in Public Hospitals: A Cross-Sectional Study. *Antibiotics* [Internet]. 2023; 12(12).
4. García Palomo JD, Agüero Balbín J, Parra Blanco JA, Santos Benito MF. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2010;10(49):3251-64.
5. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections – An overview. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:2321-33.
6. Arias-Flores R, Rosado-Quiab U, Vargas-Valerio A, Grajales-Muñiz C. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2016;54(1):20-4.
7. Suleyman G, Alangaden G, Bardossy AC. The Role of Environmental Contamination in the Transmission of Nosocomial Pathogens and Healthcare-Associated Infections. *Current Infectious Disease Reports*. 2018;20(6):12.
8. Khan HA, Baig FK, Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017;7(5):478-82.
9. Stewart S, Robertson C, Kennedy S, Kavanagh K, Haahr L, Manoukian S, et al. Personalized infection prevention and control: identifying patients at risk of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*. 2021;114:32-42.
10. Laurent M, Bories PN, Le Thuaut A, Liuu E, Ledudal K, Bastuji-Garin S, et al. Impact of Comorbidities on Hospital-Acquired Infections in a Geriatric Rehabilitation Unit: Prospective Study of 252 Patients. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2012;13(8):760.e7-.e12.
11. Unahalekhaka A. 2011. In: *Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC* [Internet]. Portadown: International Federation of Infection Control. Second. [29-44].
12. do Nascimento Santos Zonta F, da Silva Roque M, Gabriel Soares da Silva R, Gabrieli Ritter A, Tondello Jacobsen F. Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enfermería Global*. 2020;19(3):214-54.
13. Mody L, Washer LL, Kaye KS, Gibson K, Saint S, Reyes K, et al. Multidrug-resistant Organisms in Hospitals: What Is on Patient Hands and in Their Rooms? *Clinical Infectious Diseases*. 2019;69(11):1837-44.
14. Ahmad N DW, Plorde JJ. *Microbiología Médica*. 5ta ed ed. Mexico: McGraw-Hill; 2010.
15. Pérez MC MM. *Temas de bacteriología y virología médica*. 3a ed ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR; 2008. p. 25-46.
16. Vanegas M JM, Jiménez Q JN. Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia. *Hechos Microbiológicos*. 2014;4(2):98-105.
17. Sáenz-Lahoya S, Bitarte N, García B, Burgui S, Vergara-Irigaray M, Valle J, et al. Noncontiguous operon is a genetic organization for coordinating bacterial gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(5):1733-8.



18. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology*. 2017;35:1214-23.
19. WHO.int. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos Internet: Organización Mundial de la Salud; 2017 [Available from: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>].
20. Jáuregui-Rojas P, Vásquez-Tirado G, Rodríguez-Montoya R, Albínez-Pérez J. Factores de riesgo para infección por pseudomonas aeruginosa multirresistente en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica de la unidad de cuidados intensivos. Estudio multicéntrico. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almazor Aguinaga Asenjo*. 2021;14(1):13 - 7.
21. Ossa-Giraldo AC, Echeverri-Toro LM, Santos ZM, García MG, Agudelo Y, Ramírez F, et al. Factores de riesgo para infección por Pseudomonas aeruginosa multi-resistente en un hospital de alta complejidad. *Revista chilena de infectología*. 2014;31:393-9.
22. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloy MGJ, et al. Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017;41(5):698-722.
23. Vetrivel A, Ramasamy M, Vetrivel P, Natchimuthu S, Arunachalam S, Kim G-S, et al. Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Its Control. *Biologics [Internet]*. 2021; 1(3):[312-36 pp.].
24. da Cruz Nizer WS, Inkovskiy V, Versey Z, Stempel N, Cassol E, Overhage J. Oxidative Stress Response in Pseudomonas aeruginosa. *Pathogens [Internet]*. 2021; 10(9).
25. Serra Valdés MÁ. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 2017;16(3):402-19.
26. Sathe N, Beech P, Croft L, Suphioglu C, Kapat A, Athan E. Pseudomonas aeruginosa: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of Pseudomonas aeruginosa and exploring novel approaches to treatment. *Infectious Medicine*. 2023;2(3):178-94.
27. del Pozo Jose L, Rouse Mark S, Mandrekar Jayawant N, Sampedro Marta F, Steckelberg James M, Patel R. Effect of Electrical Current on the Activities of Antimicrobial Agents against Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Staphylococcus epidermidis Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(1):35-40.
28. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*. 2013;9(5):339-43.
29. Guo J, Yoshida K, Ikegame M, Okamura H. Quorum sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone: An all-rounder in mammalian cell modification. *Journal of Oral Biosciences*. 2020;62(1):16-29.
30. Jayakumar P, Figueiredo Alexandre RT, Kümmerli R. Evolution of Quorum Sensing in Pseudomonas aeruginosa Can Occur via Loss of Function and Regulon Modulation. *mSystems*. 2022;7(5):e00354-22.
31. Salazar-Holguín HD, Cisneros-Robledo ME. Resistencia a los antimicrobianos de agentes causales de las principales infecciones nosocomiales. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2016;54(4):462-71.
32. Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, et al. Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2013;70(2):136-50.
33. Ramsay KA, Wardell SJT, Patrick WM, Brockway B, Reid DW, Winstanley C, et al. Genomic and phenotypic comparison of environmental and patient-derived isolates of



Pseudomonas aeruginosa suggest that antimicrobial resistance is rare within the environment. bioRxiv. 2019:663674.

34. Meirelles LA, Perry EK, Bergkessel M, Newman DK. Bacterial defenses against a natural antibiotic promote collateral resilience to clinical antibiotics. *PLOS Biology*. 2021;19(3):e3001093.
35. Soukarieh F, Liu R, Romero M, Roberston SN, Richardson W, Lucanto S, et al. Hit Identification of New Potent PqsR Antagonists as Inhibitors of Quorum Sensing in Planktonic and Biofilm Grown *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Chemistry*. 2020;8.
36. Huang H, Shao X, Xie Y, Wang T, Zhang Y, Wang X, et al. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*. 2019;10(1):2931.
37. Kumar B A, Thankappan B, Jayaraman A, Gupta A. Evaluation of Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* for Aminoglycosides and Its Predicted Gene Regulations through In-Silico Transcriptomic Analysis. *Microbiology Research [Internet]*. 2021; 12(3):[630-45 pp.].
38. Cianciulli Sessa A, Lilić B, Amman F, Wolfinger MT, Sonnleitner E, Bläsi U. Gene Expression Profiling of *Pseudomonas aeruginosa* Upon Exposure to Colistin and Tobramycin. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
39. Brinkman CL, Schmidt-Malan SM, Karau MJ, Greenwood-Quaintance K, Hassett DJ, Mandrekar JN, et al. Exposure of Bacterial Biofilms to Electrical Current Leads to Cell Death Mediated in Part by Reactive Oxygen Species. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0168595.
40. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;258(2):151-65.
41. Rivera-Betancourt OE. Synthesis and characterization of copper nanoparticles: Architectural morphologies and applications in surface enhanced raman spectroscopy. 2009.
42. Barrabés N, Just J, Dafinov A, Medina F, Fierro JLG, Sueiras JE, et al. Catalytic reduction of nitrate on Pt-Cu and Pd-Cu on active carbon using continuous reactor: The effect of copper nanoparticles. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2006;62(1):77-85.
43. Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, et al. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(14):9157-67.
44. Zhang E, Li F, Wang H, Liu J, Wang C, Li M, et al. A new antibacterial titanium–copper sintered alloy: Preparation and antibacterial property. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(7):4280-7.
45. Gosau M, Bürgers R, Vollkommer T, Holzmann T, Prantl L. Effectiveness of antibacterial copper additives in silicone implants. *Journal of Biomaterials Applications*. 2012;28(2):187-98.
46. Blenkinsopp SA, Khoury AE, Costerton JW. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(11):3770-3.
47. Saulis G, Saulė R. Size of the pores created by an electric pulse: Microsecond vs millisecond pulses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012;1818(12):3032-9.
48. Hari P, Kacharaju KR, Anumala N, Pathakota KR, Avula J. Application of bioelectric effect to reduce the antibiotic resistance of subgingival plaque biofilm: An: in vitro: study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2018;22(2).
49. López Rodríguez RJ. Evaluación de la efectividad en la aplicación de tres tratamientos de un sistema no térmico para la reducción de carga bacteriana (Electroporación) en forma artesanal, en leche fresca de vaca de dos explotaciones lecheras familiares, ubicadas en el municipio de Mixco. 2017.
50. Qi M, Zhao R, Liu Q, Yan H, Zhang Y, Wang S, et al. Antibacterial activity and mechanism of high voltage electrostatic field (HVEF) against *Staphylococcus aureus* in medium plates and food systems. *Food Control*. 2021;120:107566.



51. Kavaliauskaitė J, Kazlauskaitė A, Lazutka JR, Mozolevskis G, Stirkė A. Pulsed Electric Fields Alter Expression of NF- κ B Promoter-Controlled Gene. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022; 23(1).
52. Ortega-Peña S, Hernández-Zamora E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2018;75(2):79-88.
53. Lee N-Y, Ko W-C, Hsueh P-R. Nanoparticles in the Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Organisms. 2019;10.
54. Sengan M, Subramaniam SB, Arul Prakash S, Kamlekar R, Veerappan A. Effective elimination of biofilm formed with waterborne pathogens using copper nanoparticles. *Microbial pathogenesis*. 2019;127:341-6.
55. Fadwa AO, Alkoblan DK, Mateen A, Albarag AM. Synergistic effects of zinc oxide nanoparticles and various antibiotics combination against *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated bacterial strains. *Saudi journal of biological sciences*. 2021;28(1):928-35.
56. Gidey K, Gidey MT, Hailu BY, Gebreamlak ZB, Niriayo YL. Clinical and economic burden of healthcare-associated infections: A prospective cohort study. *Plos one*. 2023;18(2):e0282141.
57. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629-55.
58. Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS*. *PLOS ONE*. 2011;6(12):e29113.
59. Liu Q-m, Zhou D-b, Yamamoto Y, Ichino R, Okido M. Preparation of Cu nanoparticles with NaBH₄ by aqueous reduction method. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2012;22(1):117-23.
60. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PDJCSHP. Analysis of cell viability by the MTT assay. 2018;2018(6).
61. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(47).
62. Dusane DH, Lochab V, Jones T, Peters CW, Sindeldecker D, Das A, et al. Electroceutical Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Scientific Reports*. 2019;9(1):2008.
63. M. Shawki M, M. Eltarahony M, E. Moustafa M. The impact of titanium oxide nanoparticles and low direct electric current on biofilm dispersal of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*: A comparative study. *Papers in Physics*. 2021;13:130005.
64. Niepa THR, Wang H, Gilbert JL, Ren D. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* cells by cathodic electrochemical currents delivered with graphite electrodes. *Acta Biomaterialia*. 2017;50:344-52.
65. Schmidt-Malan Suzannah M, Karau Melissa J, Cede J, Greenwood-Quaintance Kerryl E, Brinkman Cassandra L, Mandrekar Jayawant N, et al. Antibiofilm Activity of Low-Amperage Continuous and Intermittent Direct Electrical Current. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(8):4610-5.
66. Lochab V, Jones TH, Dusane DH, Peters CW, Stoodley P, Wozniak DJ, et al. Ultrastructure imaging of *Pseudomonas aeruginosa* lawn biofilms and eradication of the tobramycin-resistant variants under in vitro electroceutical treatment. *Scientific Reports*. 2020;10(1):9879.
67. Ruiz-Ruigomez M, Badiola J, Schmidt-Malan SM, Greenwood-Quaintance K, Karau MJ, Brinkman CL, et al. Direct Electrical Current Reduces Bacterial and Yeast Biofilm Formation. *International Journal of Bacteriology*. 2016;2016(1):9727810.
68. Voegelé P, Badiola J, Schmidt-Malan Suzannah M, Karau Melissa J, Greenwood-Quaintance Kerryl E, Mandrekar Jayawant N, et al. Antibiofilm Activity of Electrical Current in a Catheter Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(3):1476-80.



69. Sandvik EL, McLeod BR, Parker AE, Stewart PS. Direct Electric Current Treatment under Physiologic Saline Conditions Kills *Staphylococcus epidermidis* Biofilms via Electrolytic Generation of Hypochlorous Acid. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e55118.
70. Qi W, Jonker MJ, de Leeuw W, Brul S, ter Kuile BH. Reactive oxygen species accelerate de novo acquisition of antibiotic resistance in *E. coli*. *iScience*. 2023;26(12):108373.
71. Habash Marc B, Goodyear Mara C, Park Amber J, Surette Matthew D, Vis Emily C, Harris Robert J, et al. Potentiation of Tobramycin by Silver Nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(11):10.1128/aac.00415-17.
72. Farrant Katie V, Spiga L, Davies Jane C, Williams Huw D. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to the Innate Immune System-Derived Oxidants Hypochlorous Acid and Hypothiocyanous Acid. *Journal of Bacteriology*. 2020;203(2):10.1128/jb.00300-20.
73. Laha D, Pramanik A, Laskar A, Jana M, Pramanik P, Karmakar P. Shape-dependent bactericidal activity of copper oxide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Materials Research Bulletin*. 2014;59:185-91.
74. Price-Whelan A, Dietrich Lars EP, Newman Dianne K. Pyocyanin Alters Redox Homeostasis and Carbon Flux through Central Metabolic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(17):6372-81.
75. Dettman JR, Sztepanacz JL, Kassen R. The properties of spontaneous mutations in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*. 2016;17(1):27.
76. Besse A, Groleau M-C, Déziel E. Emergence of Small Colony Variants Is an Adaptive Strategy Used by *Pseudomonas aeruginosa* to Mitigate the Effects of Redox Imbalance. *mSphere*. 2023;8(2):e00057-23.
77. Blank M. Protein and DNA reactions stimulated by electromagnetic fields. *Electromagnetic biology and medicine*. 2008;27(1):3-23.

X. Anexos

Diagrama

