



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE EL
PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO ANIMAL
Galleria mellonella.

ANGELA LORENA CANTOR ORTÍZ
BIVIANA PAOLA CADENA SANCHEZ

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C
2019



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE EL
PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO ANIMAL
Galleria mellonella.

Asesor:

MARCELA GÓMEZ GARZÓN MSc.

Asesor Interno:

JOVANNA ACERO MONROY MSc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C
2019

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo principalmente a Dios, por habernos dado la vida y permitirnos haber llegado hasta este momento tan importante de nuestra formación profesional. A nuestras familias, por ser un apoyo incondicional durante todo el proceso, por el esfuerzo que hicieron para que llegáramos hasta acá y por ese amor que nos brindan día a día, y finalmente a la Marcela Gómez, porque sin ella este trabajo no hubiera sido posible, por los lindos momentos, de risas y de regaños, pero sobre todo por ser la mejor profesora.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los logros más anhelados.

Deseamos expresar nuestros más sinceros agradecimientos a la Dra. Marcela Gómez directora de esta tesis, a la Profesora Jovana Acero, por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, por el respeto a nuestras sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que tomamos esta iniciativa.

Así mismo, agradecemos a la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS) por permitir usar sus instalaciones, equipos y financiar todo el proceso investigativo; a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, por ser testigos de este proceso de formación durante 5 años, y por darnos las bases para ser grandes profesionales que en un futuro serán representantes de la institución.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos de otras personas. En este caso nuestro más sincero agradecimiento a Jefferson Parga, con cuyos aportes, ideas y tiempo facilitaron muchos de los puntos a tocar en este proyecto.

Gracias a nuestros padres, por el tiempo que nos han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Por habernos proporcionado la mejor educación y lecciones de vida sin las cuales no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo. Por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijas, son los mejores padres.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN		10
OBJETIVOS		12
14		
14		
1. 15		
2. 19		
19		
2.1.1. 19		
2.1.2. 21		
22		
2.2.1. 23		
2.2.2. 25		
27		
2.3.1. 28		
2.3.2. 28		
3. 30		
30		
30		
3.2.1. 30		
3.2.2. 30		
3.2.3. 31		
31		
31		
32		
33		
33		
33		
34		

35	
36	
38	
4. 39	
39	
40	
42	
43	
45	
50	
52	
54	
5. 55	
6. 60	
7. 61	
ANEXOS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Mecanismo invasivo de <i>Listeria monocytogenes</i> . (18)	17
Figura 2 <i>Galleria mellonella</i> . A. Adulto. B. Larva. Cortesía Marcela Gómez.	20
Figura 3 Mecanismo de acción de las NPsAg frente a las bacterias. (39, 40)	23
Figura 4 Larvas de <i>Galleria mellonella</i> fijadas con FAATD.	29
Figura 5 Características microbiológicas de <i>Listeria monocytogenes</i> . A. Crecimiento en Agar Sangre. B. Morfología en Gram. C. Motilidad a 25 y 37°C Autoras.	33
Figura 6 Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)	33

Figura 7 Microscopia SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)	34
Figura 8 Curva de sobrevivencia Kaplan Meier <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	34
Figura 9 Curva de sobrevivencia Kaplan Meier <i>Listeria monocytogenes</i> Clínica	35
Figura 10 Sobrevivencia de <i>Galleria mellonella</i> infectada con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratada con NPsAg-47 a 50 ng/mL	37
Figura 11 Sobrevivencia de <i>Galleria mellonella</i> infectada con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratadas con NPsAg-47 a 100 ng/mL	37
Figura 12 Hemocitos de <i>Galleria mellonella</i> observados en hemolinfa. A. Coloración Wright. B. Coloración Giemsa. Autores.	44
Figura 14 Comparación respuesta celular inmune de <i>Galleria mellonella</i> a infección por <i>Listeria monocytogenes</i> y durante el tratamiento con NPsAg-47	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Listeria monocytogenes</i> . Tomado de: NCBI (19)	15
Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>Galleria mellonella</i> . Tomado de: NCBI (29)	19
Tabla 3 Condiciones de las larvas <i>Galleria mellonella</i> .	25
Tabla 4 Sistema de puntajes de índice de salud. Tomada de: (46)	26

Tabla 5 Grupos <i>Galleria mellonella</i> para determinación de DL50 de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
Tabla 6 Controles para la determinación de CMI	28
Tabla 7 Inoculación de larvas para evaluación de infección in vivo	28
Tabla 8 Inoculación de larvas para evaluación histológica	29
Tabla 9 Inoculación de larvas para evaluación de respuesta inmune celular	30
<i>Tabla 10</i> Características de los diferentes tipos de hemocitos de <i>Galleria mellonella</i> . Imágenes de las Autoras.	32
Tabla 11 Determinación de CMI para NPsAg-47 y NPsAg-49	36
Tabla 12 Determinación de CMB para NPsAg-47 y NPsAg-49	36
Tabla 13 Histología de <i>Galleria mellonella</i> inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 0	39
Tabla 14 Histología de <i>Galleria mellonella</i> inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 2	40
Tabla 15 Histología de <i>Galleria mellonella</i> inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 3	41
Tabla 16 Histología de <i>Galleria mellonella</i> inoculada con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 5	42
Tabla 17: Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en cerebro, intestino y cuerpo graso de <i>Galleria mellonella</i> con tinción de Gram y Auramina-Rodamina	43
Tabla 18 Comparación de la respuesta inmune celular en <i>Galleria mellonella</i> durante infección con <i>Listeria monocytogenes</i> y tratamiento con NPsAg-47	43
Tabla 19 Recuento en placa de UFC de <i>Listeria monocytogenes</i>	46

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA DURANTE
EL PROCESO INFECCIOSO DE *Listeria monocytogenes* EN EL MODELO
ANIMAL *Galleria mellonella*.**

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un microorganismo involucrado en las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), se asocia al desarrollo de infecciones gastrointestinales, que pueden desencadenar septicemia y/o meningitis por su capacidad invasiva. Debido a los reportes de resistencia a antibióticos se propone evaluar la efectividad de las nanopartículas de plata (NPs Ag) frente a la infección por *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.

Se realizó la evaluación in vivo de larvas de *Galleria mellonella* infectándolas con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 en Dosis letal 50 (DL50) 1.5×10^7 UFC/mL, aplicando el tratamiento de NPs Ag 47 a concentración de 50 y 100 ng/ml, obtenidas mediante las técnicas in vitro de Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB); luego se realizó el seguimiento diario, la generación de curvas de sobrevivencia, observación histológica y la evaluación de hemocitos.

El seguimiento histológico durante la infección de las larvas permitió ver los daños que produce la invasión en la cabeza, intestino, cuerpo graso y espacio intersticial; y la evaluación de hemocitos se determinó mediante el recuento celular comparando larvas sanas, larvas infectadas y larvas tratadas, la cual permitió observar un aumento de la respuesta inmune en las larvas tratadas.

Las NPs Ag si inhiben el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* y potencian la respuesta inmune celular en la evaluación in vivo con larvas de *Galleria mellonella*. Se estableció que la mejor es la NPsAg-47 a una concentración de 50ng/ml. Las NPs Ag obtenidas por síntesis verde de *Borjoja patinoa* presentaron una baja toxicidad en el modelo animal.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, *Galleria mellonella*, Antibiotic resistance.

Autores: Angela Lorena Cantor Ortiz, Biviana Paola Cadena Sanchez

Asesores: Marcela Gómez Garzón; Jovanna Acero Godoy.

INTRODUCCIÒN

La Listeriosis está descrita entre las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social, económico y a la gravedad del cuadro clínico que provoca. La enfermedad es causada por *Listeria monocytogenes*, bacilo Gram positivo intracelular y oportunista que en personas inmunosuprimidas, mujeres embarazadas, neonatos y personas de la tercera edad ocasiona gastroenteritis, meningitis bacteriana, complicaciones en el embarazo y la muerte. Esta bacteria tiene como característica principal su adaptación a condiciones ambientales extremas (pH, salinidad, temperatura), que termina siendo un problema en la industria alimentaria al igual que su capacidad de generar biopelículas en diferentes superficies.

Por otra parte, *Galleria mellonella* es un modelo animal que en los últimos años ha sido usado para evaluar patogénesis *in vivo* de gran variedad de microorganismos, como bacterias, levaduras y parásitos. Este modelo permite replicar la infección gracias a sus características: estructuras anatómicas, temperatura corporal y su sistema inmune muy similar a la de los mamíferos, al generar respuesta inmune innata y/o adquirida, inducida por hemocitos o células inmunes de la larva.

La nanotecnología abarca el campo de aplicación de fabricación de materiales a nivel de nano escala mediante diferentes métodos, prevaleciendo la síntesis verde, para ser usada en este caso, con fines farmacéuticos. Las nanopartículas permiten tener una nueva visión acerca del uso inhibitorio de microorganismos, y su consecuente utilidad como tratamiento en diferentes infecciones. Es de saber que la resistencia a antibióticos ha generado grandes problemas en salud pública, porque las bacterias con el tiempo, han reconocido las rutas que toman los fármacos convencionales y han generado mutaciones, con el fin de resistir a esos mecanismos de ataque. Las nanopartículas de plata, en estudios de evaluación de eficacia como antimicrobiano *in vitro*, ha demostrado ser un efectivo biocida no sólo con *Listeria monocytogenes*, sino también frente a otros microorganismos como bacterias, hongos y virus. (1)

Este trabajo, en el ámbito académico, está encaminado a la utilización de larvas de *Galleria mellonella*, que serán inoculadas con la Dosis Letal 50 (DL₅₀) de la cepa *Listeria monocytogenes* y se evaluará el uso de nanopartículas de plata (NPs Ag) para el control infeccioso de la bacteria, con el fin de evaluar la propiedad antimicrobiana de estas nuevas moléculas.

Teniendo en cuenta lo anterior, la pregunta de investigación generada fue: ¿Las NPs Ag controlan el proceso de infección de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*?

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el papel de nanopartículas de plata (NPs Ag) frente a la infección de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.

Objetivos específicos

- Determinar la DL_{50} adecuada para la infección de *Galleria mellonella* con la bacteria *Listeria monocytogenes*.
- Evaluar el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella*.
- Estudiar el tratamiento del proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* en *Galleria mellonella* con NPs Ag
- Comparar la respuesta inmune de *Galleria mellonella* previamente inoculada con nanopartículas de plata y *Listeria monocytogenes*

1. ANTECEDENTES

En 1926, Murray y col, aislaron de la sangre de conejos bacilos Gram positivos y los llamaron *Bacterium monocytogenes*. El primer caso de Listeriosis en humanos fue reportado en 1929 y por mucho tiempo se consideró una zoonosis. En 1940, Pirie clasifica estos bacilos catalasa positivos en el género *Listeria*. El primer brote en humanos por consumo de productos alimenticios contaminados, fue reportado en 1983 por Schlech. (2, 3)

Torres y col. en el año 2005, realizaron una revisión sobre *Listeria monocytogenes* donde abarcaron características generales, involucrando virulencia y serotipificación; fisiopatología de la infección, donde mencionan la Listeriosis y la susceptibilidad del paciente, factores claves en la presentación de la enfermedad; el modelo animal, esencial para la continua investigación del agente y sus cambios fisiopatológicos frente al hospedero; la población en riesgo, donde identifica a los pacientes más susceptibles; la sensibilidad a antibióticos y el tratamiento mediante el uso de penicilinas o ampicilina asociadas a gentamicina como primer elección; ciclo infeccioso y genes implicados en la virulencia. (4)

Camacho y col. en el año 2011, estudiaron el riesgo de desarrollar infección por *Listeria monocytogenes* por el consumo de alimentos. Determinaron la prevalencia de riesgo de infección en Colombia asociado al queso fresco durante el periodo 2000-2009; concluyen que es difícil determinar el riesgo por falta de información. Además, evidenciaron que todas las etapas de la cadena de producción hasta la llegada del producto al consumidor, presentan riesgo de contaminación debido a la característica de ubicuidad del microorganismo. Finalmente, proponen las medidas de prevención y desinfección para disminuir la contaminación. (5)

Muñoz y col. en el año 2013, realizaron un estudio sobre la determinación de la prevalencia de *Listeria monocytogenes* a nivel de los manipuladores de alimentos que están relacionados con lácteos y cárnicos de origen bovino en 10 departamentos de Colombia. Se tomaron 1.322 muestras de materia fecal y frotis de manos, 128 manipuladores resultaron positivos para *Listeria monocytogenes*. Concluyen que es de vital importancia que todos los manipuladores de alimentos se encuentren debidamente capacitados en materia de educación sanitaria. (6)

Joyce y col. en el año 2010, utilizaron larvas de *Galleria mellonella* como un modelo de infección alternativo para algunos patógenos humanos, ya que son susceptibles y pueden usarse a temperatura de incubación de 37°C. Se demostró que la inoculación de *Listeria monocytogenes* inicia con una infección inmediata en el modelo animal y que la producción de listeriolisina es necesaria para la toxicidad y el crecimiento bacteriano. La destrucción de hemocitos acompaña la patogénesis de *L. monocytogenes* y está precedida por la activación del sistema de

fenoloxidasa. Además, *Listeria innocua* es patógena para *G. mellonella* a través de un mecanismo de persistencia que implica un mecanismo alternativo de patogenicidad en este modelo. (7)

Mukherjee y col. en el año 2010, estudiaron la patogenicidad en el modelo animal *Galleria mellonella*, el cual fue escogido para determinar la capacidad virulenta entre la cepa patógena de *Listeria monocytogenes* y la cepa no patógena de *Listeria innocua*. Es el primer estudio en que se generaron curvas de sobrevivencia mediante la evaluación de la mortalidad de las larvas. Se observó que una hora después de la infección se presentó disminución del recuento de UFC, dando a conocer que la defensa del invertebrado fue eficaz, reduciendo la carga bacteriana. Entre las 24 a 48 horas de la infección, se observó un aumento de las UFC bacterianas, indicando que la mortalidad se debe al aumento de la carga bacteriana. En cuanto al estudio realizado al comparar *Listeria sp* patógena y no patógena, se demostró que hay una diferencia significativa en la morbilidad entre los dos casos. La inoculación con 10^6 UFC resultó significativamente mayor para *L. innocua* que en *L. monocytogenes* para la tasa de mortalidad; La inoculación con diferentes serotipos de *L. monocytogenes* dio lugar a varias tasas de muerte. El serotipo 4b mostró una alta tasa significativa de muerte de larvas, mientras que las patógenas de 4a, 4c y 4d se atenuaron fuertemente, con respecto al serotipo patógeno 1 / 2a cepa EGD-e. (8)

Grounta y col. en el año 2016, evaluaron el efecto in vivo de dos cepas de bacterias ácido lácticas (*L. pentosus* y *L. plantarum*) aisladas durante la fermentación de olivas negras y con actividad probiótica probada. Inocularon a *Galleria mellonella* con las cepas de bacterias vivas o muertas al calor directamente en la hemolinfa y se incubaron a 37°C por 24 horas. Luego las larvas se inyectaron en el proleg con *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* y fueron incubadas a 37°C en la oscuridad. Como resultado se obtuvo que, mediante seguimiento por curvas de sobrevivencia, el uso adicional de sobrenadantes libres de células (SFC) de cada cepa de bacterias ácido lácticas (LAB) no dio lugar a ningún aumento de sobrevivencia significativa pero curiosamente se originó un descenso pronunciado de *L. Monocytogenes* en la hemolinfa a las 24 horas y 48 horas después de la infección. Se concluyó que la atenuación en la infección por *Listeria monocytogenes* fue significativa con bacterias vivas y muertas por calor; en cambio para *S. aureus* las bacterias vivas atenuaron la infección, pero las muertas por calor solo por un periodo de 24 horas. (9)

Martínez y col. en el año 2017, evaluaron in vivo cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas de brotes de origen alimentario y evaluaron el potencial de virulencia de las cepas a diferentes concentraciones. Se inyectó el inóculo bacteriano a las larvas de *Galleria mellonella* en grupos de 30 larvas para cada cepa y dilución. Se tomaron de control cepas de *Listeria* aisladas de alimentos. Como resultados se encontró que las muestras clínicas tienen mayor

potencial de virulencia que las tomadas de alimentos. En cuanto a la asociación con brotes gastrointestinales, tanto cepas clínicas como de origen alimentario, mostraron alta virulencia, que se vio reflejada en la mortalidad de las larvas. (10)

Marini y col. en el año 2018, evaluaron las propiedades antibacterianas y antivirales de los aceites esenciales in vivo e in vitro extraídos de *Cannabis sativa* contra aislados de *Listeria monocytogenes* de pacientes que fueron diagnosticados con Listeriosis invasiva entre 2014 - 2016 en Italia. Se determinó CMI y CMB de los aceites esenciales contra los 11 aislamientos de *Listeria monocytogenes* de sangre y líquido cefalorraquídeo. Por pruebas moleculares se determinó la expresión génica y el efecto de los aceites sobre cada gen. Se realizaron pruebas de formación de biopelícula con el aceite esencial para observar si hay inhibición, se llevó a cabo la infección de la línea celular Caco-2 para determinar la capacidad de *Listeria* para ingresar a las células y la infección in vivo de larvas *Galleria mellonella* para análisis por curvas de sobrevivencia. Los resultados demostraron que los aceites esenciales contribuyen a la actividad bactericida del patógeno y la motilidad flagelar también se ve reducida en presencia de los aceites. En la expresión de los genes, se observó reducción de la expresión de *prfA*, *motA* y *motB*.; en cuanto a la biopelícula, se observó reducción de la producción en las diferentes concentraciones de los aceites esenciales. La invasión de *Listeria* a las células Caco-2, en presencia del aceite esencial se redujo de un 25% a un 97% y en cuanto a la prueba in vivo con las larvas, se observó sobrevivencia superior al 90%. (11)

Padilla y col. en el año 2017, estandarizaron el protocolo histológico para larvas de *Galleria mellonella*, debido a que no existía ninguno publicado. En el protocolo se utilizó como fijador FAATD, compuesto por Alcohol de 96°, Formaldehído, Ácido acético, Dimetilsulfóxido y Ácido tricloracético,; se realizaron cortes transversales y longitudinales de la larva y se llevaron a cassettes, para procesarse automática y manualmente. De acuerdo a los resultados microscópicos de las larvas coloreadas con Hematoxilina eosina (H&E) se seleccionan los reactivos, tiempos y procesos apropiadas para obtener de rutina placas histológicas de alta calidad. (12)

Gurunathan y col. en el 2014, muestran un avance de la tecnología con el uso de las nanopartículas de plata (NPsAg), al ser utilizadas como agentes antibacterial, antifúngico, antiviral y anti-inflamatorio, debido a sus propiedades físicas, biológicas y químicas. Adicionalmente, describen un método simple, confiable y rentable, “la síntesis verde” de NPsAg, al tratar con iones de plata un extracto de hoja de *Allophylus cobbe*. (13)

Flores M. en el 2017 investigó el efecto bactericida de las nanopartículas y desinfectantes sobre bacterias multirresistentes. Compararon la eficacia de las NPsAg (comerciales y sintetizadas con té verde) con dos desinfectantes comerciales cuyos principios activos era el cloruro de benzalconio e iodopavidona. Se encontró que la concentración mínima inhibitoria máxima para el cloruro de benzalconio fue de

128 mg/L y de 4025 mg/L para la iodopavidona en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. Con las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a una concentración de 25.8 mg/L se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano del 90% para *E. coli*, 65% para *Salmonella* y 63 % para *S. aureus*. Con las nanopartículas de plata comerciales se inhibió el 100 % de crecimiento bacteriano de *E. coli* y *S. aureus* y del 91 % para *Salmonella spp.* con una concentración de 7.93 mg/L. Aunque las nanopartículas de plata no tienen un efecto inhibitor inmediato como ocurrió con los desinfectantes, pueden ser usadas a largo plazo y disminuir la cantidad excesiva de desinfectantes empleada para la inhibición bacteriana a corto plazo. (14)

Markowska K. y col. (2018) estudiaron el efecto de las NPsAg sobre la permeabilidad de la pared de *L. monocytogenes* el medir el flujo de salida de carboxifluoresceína, ADN y proteínas. Se demostró que la NPsAg aumentó la lisis de *L. monocytogenes* y, en menor medida, la autólisis del peptidoglicano aislado. Observaron el aumento en el flujo de salida de carboxifluoresceína, ADN y proteínas. Los resultados obtenidos permiten concluir que el peptidoglicano, componente principal de la pared celular, es el blanco de la actividad de las NPsAg contra *L. monocytogenes*. (15)

2. MARCO TEÓRICO

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es una bacteria intracelular oportunista, capaz de invadir células y diseminarse por todo el tejido, (16, 17) se encuentra en diferentes entornos ambientales y productos alimenticios. (18) Es un bacilo Gram positivo, clasificado taxonómicamente como se observa en la Tabla 1, anaerobio facultativo, puede crecer a temperaturas y pH bajos, y soporta altas concentraciones de sal, razón por la cual se considera un gran problema en la industria alimenticia. (17, 19)

Tabla 1 Clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes*. Tomado de: NCBI. (20)

REINO	Bacteria
FILO	Firmicutes
CLASE	Bacilos
ORDEN	Bacillales
FAMILIA	Listeriaceae
GÉNERO	Listeria
ESPECIE	<i>Listeria monocytogenes</i>

La enfermedad que causa se llama listeriosis, la cual puede ser perinatal o no perinatal. Se adquiere por consumir alimentos contaminados y puede afectar animales y humanos, principalmente a los que se encuentran inmunocomprometidos, las mujeres embarazadas y los recién nacidos. A la mayoría de las personas que presentan listeriosis, les genera una gastroenteritis, mientras que, los que presentan alguna enfermedad de base, pueden desarrollar sepsis bacteriana, meningitis bacteriana o infección del feto, provocando complicaciones del embarazo y abortos. La enfermedad cobra importancia ya que *Listeria monocytogenes* tiene la capacidad de atravesar las tres barreras: hematoencefálica, fetoplacentaria y gastrointestinal. (17, 21)

2.1.1. Invasión celular

Tras la ingesta de alimentos contaminados por el individuo, la bacteria entra al organismo y al llegar al intestino infecta a las células epiteliales intestinales y se disemina hasta la linfa y la sangre que la conducen a bazo e hígado, donde infectan células fagocíticas como macrófagos y células no fagocíticas como enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. (19)

El ingreso a las células fagocíticas se da por fagocitosis y en las no fagocíticas por unión a receptores mediadores de endocitosis, InIA e InIB que se unen a E-cadherina y Met (factor de crecimiento de hepatocitos) e inducen la agrupación de otros receptores que facilitan la absorción de la bacteria a la célula; el receptor FCGR1A fue identificado para fibroblastos y monocito. Los receptores InIA e InIB afectan la rigidez del citoesqueleto al provocar la polimerización de actina y desestabilización de la superficie celular, permitiendo su ingreso y movilidad intra e intercelularmente en el citoplasma. (17, 19). En la Figura 1, se observa el mecanismo invasivo de *Listeria monocytogenes*.

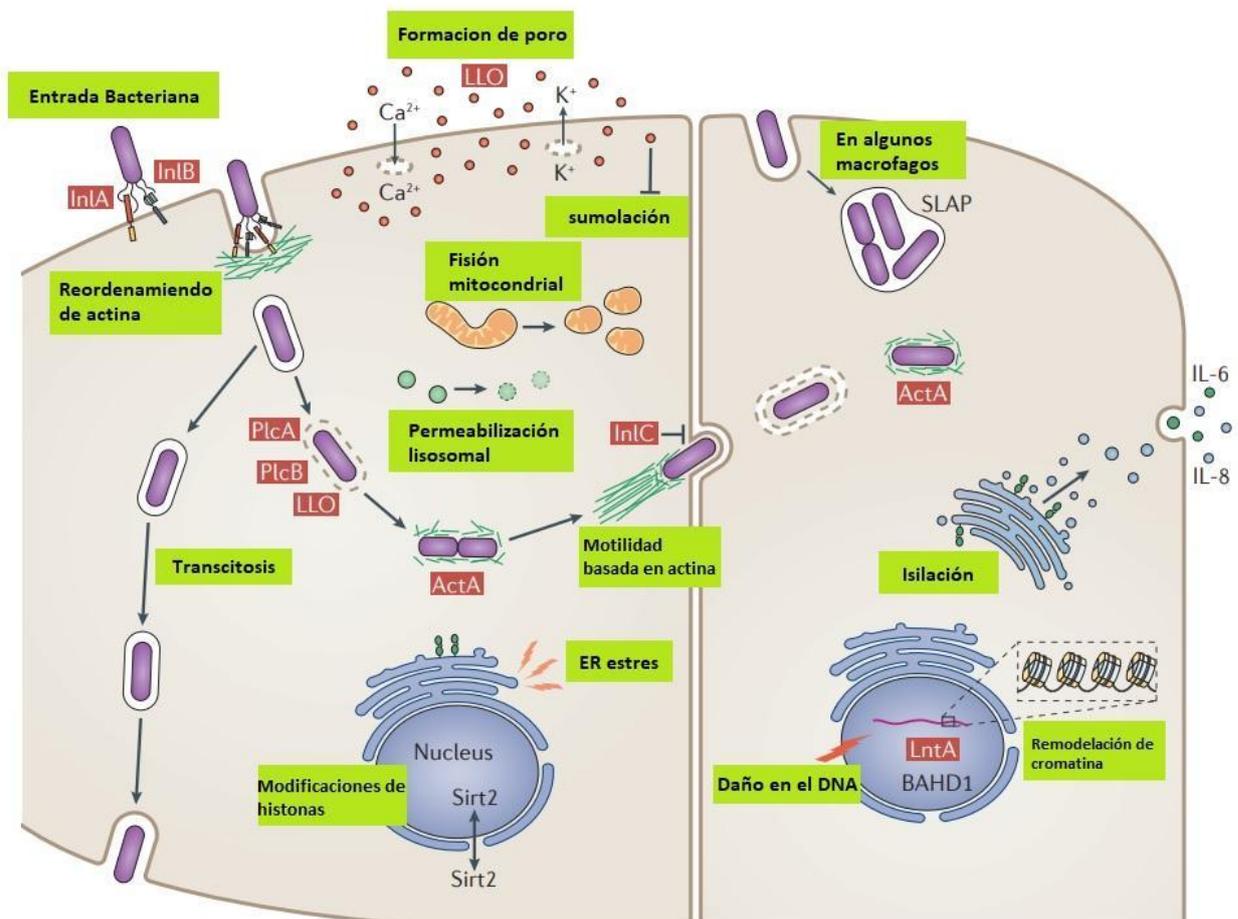


Figura 1 Mecanismo invasivo de *Listeria monocytogenes*. Tomado de: (19) Liliana Radoshevich

Dentro de la célula, la bacteria se internaliza en una vacuola y produce listeriolisina O (LLO) y fosfolipasas A y B (PlcA y PlcB), proteínas que rompen la vacuola por formación de poros y la bacteria escapa al citosol de la célula. (28) En ocasiones se ha observado que *Listeria* no escapa del fagosoma, ya que esa vacuola le permite moverse más rápido a través de las células, por lo tanto, las bacterias pueden considerarse tanto vacuolares como citosólicos. (19, 22)

En el citosol celular las bacterias se reproducen y expresan ActA, una proteína de superficie esencial que media la polimerización de la actina del huésped. Induce cambios en la morfología de los organelos de la célula huésped, así LLO altera la morfología de las mitocondrias y genera fisión mitocondrial restringiendo el contacto con el retículo endoplasmático para beneficiar la división eficiente de las bacterias; también afecta al retículo endoplasmático, excediendo la capacidad de la demanda en proteínas bloqueando la traducción e importación de proteínas y altera a los lisosomas que tiene funciones en la homeostasis celular, secreción, crecimiento celular, reparación de la membrana o la muerte celular y los permeabiliza desencadenando estrés oxidativo y daño al ADN. (19, 23) Los factores de virulencia de listeria llegan al núcleo eucariótico para inducir cambios epigenéticos (expresión de los genes).

L. monocytogenes es capaz de polimerizar actina y moverse de una célula a otra por expresión en su superficie de ActA, que junto al complejo ARP, induce la polimerización de actina y de tallos de actina con suficiente fuerza para pasar de una célula a otra. (23, 24) Ya dentro de la otra célula, se repite el ciclo de vida, célula a célula, hasta invadir todo el tejido.

2.1.2. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son necesarios para que la bacteria pueda ingresar a un organismo e infectarlo, por eso están presentes en gran parte del ciclo de vida. Todos los genes de virulencia son controlados por PrfA, conocido como el regulador de la expresión de los productos genéticos. (22, 25)

- **InlA e InlB:** Implicadas en la entrada de la bacteria a las células fagocíticas no profesionales. Promueven la absorción bacteriana por las células hospedadoras; InlB se conoce también como molécula de señalización. (22, 25, 26)
- **InlC:** Tiene gran expresión en células infectadas. Interactúa con (IKK α) y con la proteína citoesquelética para inhibir la respuesta inmune innata y para la propagación célula a célula. (25)
- **LLO:** Promueven el escape de la bacteria de la vacuola, forman poros bajo la influencia de Ca⁺⁺ y el flujo de salida de K⁺ para facilitar el escape de la bacteria. Es capaz de fragmentar la mitocondria. (25) Estudios recientes indican que también LLO puede ser secretada de manera extracelular, formando poros en las membranas plasmáticas del huésped; eso permite que haya flujo de salida de potasio y calcio, alterando el equilibrio iónico de la célula huésped y otros procesos celulares. (23, 26)

- **ActA:** Proteína de superficie que permite a *Listeria* moverse intra e intercelularmente, mediante la activación de ARP, que nuclea la actina y activa mediante factores para que se del movimiento bacteriano; también protege a las bacterias de la autofagia. (25)
- **Mpl:** son importantes en el proceso de la diseminación, del escape vacuolar y es requerida en el procesamiento de ActA y la resolución de la protuberancia. (27)
- **InlJ:** tiene repeticiones ricas en leucina que forman una escalera de cisteína y le permite comportarse como una adhesina. Su expresión es tardía en la infección. (25)
- **InlK:** contribuye en el escape de la autofagia, solo se expresa in vivo. (25)
- **InlP:** Factor de virulencia con fuerte tropismo a la placenta, se ha encontrado representado en el patógeno *Listeria monocytogenes* y es ausente en cepas patógenas no humanas. Interfiere en las vías de defensa del huésped. (28)
- **PrsA2:** chaperona de secreción post translocacional que contribuye al plegamiento y actividad de los factores de virulencia secretados.

Los que están mejor caracterizados son los que codifican a Listeriolisina O (LLO), el factor de polimerización de actina (ActA), la metaloproteasa (Mpl), las fosfolipasas (PlcA y PlcB), las internalinas principales (InlA e InlB) y la proteína secretada InlC. (19)

Galleria mellonella

Galleria mellonella es la polilla grande de la cera que pertenece a la familia *Pyralide* como se observa en la Clasificación taxonómica de la tabla 2. Su actividad es nocturna y presenta órganos timpánicos abdominales, es decir que percibe ondas y vibraciones. La mayoría de orugas son fitófagas (se nutren de plantas), pero algunas se alimentan de otros materiales como harina, granos, forraje o cera como en el caso de *Galleria*.

La etimología del nombre de la familia viene del latín *Pyralis*, que a su vez viene del griego *Pyrausta* y que significa “pequeño animal que vive en el fuego”. Eso es debido a la creencia que estos insectos vivían en fuego por su comportamiento de fototropismo positivo, es decir, tienen tendencia a dirigirse a cualquier tipo de luz. (29)

Tabla 2 Clasificación taxonómica de *Galleria mellonella*. Tomado de: NCBI. (30)

Linaje de <i>Galleria mellonella</i>	
REINO	Metazoa
FILO	Arthropoda
CLASE	Insecta
ORDEN	Lepidópteros
FAMILIA	Pyralidae
GÉNERO	Galleria
ESPECIE	<i>Galleria mellonella</i>

Durante años se han utilizado los roedores como modelos animales para estudios, pero sus elevados costos y limitaciones éticas han llevado al uso de modelos invertebrados como *Galleria mellonella*. Sus larvas han sido utilizadas para estudios de virulencia y eficacia antimicrobiana. Numerosos estudios han confirmado que la patogenicidad microbiana y los determinantes de virulencia son iguales en humanos, ratones y larvas. Al igual que los mamíferos, los insectos poseen un sistema inmune innato; formado por células de la hemolinfa capaces de fagocitar o encapsular invasores microbianos, y respuesta humoral que incluye la producción inducible de lisozima y de pequeños péptidos antibacterianos. (31, 32)

2.1.3. Ciclo biológico

El ciclo biológico de los lepidópteros es complejo y consta de distintas fases en las que ocurren un conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos. La metamorfosis es el proceso mediante el cual las larvas inmaduras se transforman en adultos maduros a la vez que el crecimiento del insecto se para. (33, 34)

El ciclo comienza con la fecundación de los **huevos**, son colocados entre 400 y 1800 huevos a una temperatura 30-35°C y humedad específica 75-85 % para la eclosión. Tardan 6 semanas en hacer un ciclo completo. Los adultos ponen sus huevos en las celdillas de las colmenas y salen a los 3 a 5 días; en el día 19, las larvas se desarrollan y crecen lo suficiente para cristalizar, este proceso dura entre 8 y 15 días. Cuando llega el momento la larva, llamada **oruga** sale del huevo, su fin es crecer y acumular gran cantidad de reservas energéticas para poder realizar los procesos de transformación que se producirán. Las larvas de *Galleria mellonella* se

alimentan de todo tipo de tejidos orgánicos y su peso final suele ser de dos o tres mil veces su peso inicial. Cuando se convierte en crisálida deja de comer, permanece inmóvil, se encoge, pierde colores y fabrica un capullo. (33, 34)

La última fase del estadio larval, es la **pupa**; este estadio representa una pausa respecto a las funciones vitales y se interrumpe casi toda la relación del insecto con el exterior. Las crisálidas pueden durar pocos días o varias semanas, a veces duran todo el invierno. Gran parte de las crisálidas tienen movimientos muy restringidos y es allí cuando se produce la fase drástica de metamorfosis completa. En una colmena, el nacimiento se produce casi a la vez de todas las crisálidas y empieza cuando se rompe la piel que envuelve el **adulto** (imago) que está compuesta de quitina. Lo primero que hacen las mariposas es excretar los materiales absorbentes producidos en la crisálida en forma de líquido turbio llamado meconio. Entonces, el adulto con las alas blandas colgando, busca un lugar donde poderlas extender, inyecta hemolinfa por las nervaduras alares, a menudo específicas, y aire por los conductos traqueales que tiene en las alas y en unos minutos quedan planas y bien desplegadas. Una vez extendidas, adopta una postura de reposo y el sol las secará y las dejará rígidas y la mariposa ya podrá volar, que es lo que hará durante la mayor parte de su vida, para dispersarse, para alimentarse, para aparearse, para huir o para migrar. (33, 34)

Las características del adulto son (Figura 2A):

- Tiene el cuerpo dividido en tres partes: la cabeza, el tórax y el abdomen.
 - La cabeza tiene un par de antenas, tres pares de piezas bucales más o menos modificadas.
 - El tórax consta de tres segmentos y soporta tres pares de patas y dos pares de alas
 - El abdomen está segmentado y en él se sitúan los órganos y aparatos viscerales.
 - La respiración es aérea y se realiza a través de un sistema traqueal abierto.
- (33)



Figura 2 *Galleria mellonella*. A. Adulto. B. Larva. Cortesía Marcela Gómez.

Las características de la larva son (Figura 2B):

- Tiene una forma cilíndrica y generalmente la parte central del cuerpo es mucho más gruesa.
- La cabeza es lobulosa y el cuerpo está dividido en trece segmentos y es bastante blando. En los segmentos torácicos tienen los 3 pares de patas verdaderas, y en los abdominales hay de a cinco pares de patas falsas, que no son más que protuberancias membranosas
- Algunas especies tienen pelos urticantes para protegerse.
- Tienen aparato bucal masticador, muy importante debido a que su función principal es almacenar comida. (33)

2.1.4. Respuesta inmune

La respuesta innata de los insectos se compone de dos elementos principales, el celular y la respuesta humoral. La respuesta celular está mediada por células fagocíticas llamadas hemocitos. Estos se encuentran dentro de la hemolinfa y funcionan de manera análoga a la sangre de los mamíferos. Estas células están involucradas en la fagocitosis, encapsulación y coagulación de los elementos extraños. Por otro lado, la respuesta humoral está mediada por moléculas efectoras solubles que inmovilizan y destruyen al patógeno. (34)

Respuesta Inmune Celular

En los insectos se encuentran al menos 8 tipos de hemocitos de los cuales 6 se han identificado en *Galleria mellonella* entre los que se encuentran:

- Prohemocitos
- Plasmocitos
- Células granulares
- Coagulocitos
- Esferocitos

- Oenocitoides

En *Galleria mellonella* los plasmocitos y las células granulares juegan un papel importante en la defensa celular y están implicados en la fagocitosis, formación de nódulos y encapsulación. La encapsulación comienza con la unión de células granulares al objeto extraño que desencadena la liberación de material Péptidos dispersores de plasmocitos (PSP) que promueven la unión de múltiples capas de plasmocitos alrededor del objetivo dando como resultado una cápsula lisa. La fagocitosis en insectos y en mamíferos es muy similar y afecta a plasmocitos como a células granulares. *Galleria mellonella* expresa en los hemocitos una proteína con alta homología con la calreticulina humana encontrada en los neutrófilos. Una vez fagocitados, los agentes son eliminados por varios mecanismos, incluyendo especies reactivas de oxígeno (superóxido) generadas por el estallido oxidativo, que es iniciado por el complejo NADPH oxidasa. (34)

Respuesta Inmune Humoral

- **Oponinas:** *Galleria mellonella* produce varias proteínas plasmáticas que actúan como oponinas al reconocer y se unen a componentes microbianos similares a los receptores de las células en los mamíferos. Apolipoproteína III es un importante transportador de lípidos intercambiables que juega un papel importante en la respuesta inmune innata como reconocimiento de patrones, muestra afinidad por los ligandos hidrofóbicos, como lipopolisacáridos y ácido lipoteicoico. Este también muestra alta homología con la apolipoproteína E de mamíferos (apoE), que está involucrada en la detoxificación de LPS (lipopolisacáridos bacterianos), la estimulación de la fagocitosis y la liberación de óxido nítrico (NO) de las plaquetas. También se ha demostrado el papel multifuncional de apoLp-III, al estimular la actividad antibacteriana de la hemolinfa y la producción de superóxido por los hemocitos y mejorar la actividad del péptido antimicrobiano cecropina. (34, 35)
- **Péptidos antimicrobianos (PAM):** son péptidos de defensa del huésped, se encuentran entre todas las clases de vida y juegan un papel importante en la inmunidad innata que muestra actividad microbicida de amplio espectro. Un análisis de la hemolinfa de *G. mellonella* identificó 18 PAM y que se producen principalmente en el cuerpo graso, en los hemocitos, en el tracto digestivo, las glándulas salivales y el tracto reproductivo. Las cecropinas Son activos contra las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La moricinas tienen actividad fuerte contra los hongos filamentosos. Estos péptidos son ricos en prolina y aumentan la permeabilidad de las bacterias e inhibe el crecimiento de levaduras.(34, 35)

- **Lectinas:** Las lectinas son proteínas divalentes o multivalentes que pueden aglutinar células u otros materiales que tengan un oligosacárido de complementariedad apropiada. Aunque se ha demostrado la capacidad de las lectinas para aglutinar bacterias y precipitar glicoconjugados, es posible que este mecanismo no sea el más importante in vivo. Más bien, el papel de estas proteínas parece estar relacionado al reconocimiento de la partícula extraña y a facilitar su fagocitosis (opsonización).(34, 35)
- **Lisozimas:** La lisozima fue el primer factor antibacteriano purificado de la hemolinfa de los insectos, con gran similitud a las lisozimas de vertebrados en cuanto a contenido de aminoácidos. La lisozima de *G. mellonella* muestra actividad no enzimática contra hongos que se asemeja al modo de acción de los péptidos de defensa catiónicos. (34, 35)
- **Atacinas:** las atacinas facilitan la acción de cecropinas y lisozimas, de modo tal que estas tres proteínas trabajan en conjunto para la destrucción de bacterias. (34, 35)
- **Diptericinas:** Es una serie de proteínas antibacterianas inducibles, parece ser una serie de siete proteínas relacionadas. La composición y secuencia de aminoácidos indica que constituyen una nueva familia de proteínas antibacterianas, diferentes a las cecropinas y atacinas. (34, 35)
- **Sistema de profenoloxidasa (proPO):** Como parte de las reacciones de defensa en invertebrados frecuentemente se observa melanización. La enzima involucrada en la síntesis del pigmento de melanina es la fenoloxidasa (G-difenoloxígeno-óxido reductasa), la cual es capaz de oxidar los fenoles a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a melanina. Al ser activado el sistema proPO, éste genera algunos factores que estimulan a los hemocitos para la eliminación de material extraño. De este modo, además de su papel en la melanización, el sistema de proPO es capaz de estimular reacciones celulares de defensa como son: la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación. (34, 35)

Nanopartículas de plata

La nanotecnología es un campo aplicado al estudio y elaboración de productos a nano escala con gran variedad de propiedades que se pueden aplicar en diferentes campos. El desarrollo de la nanotecnología, tiene que ir acompañado con estudios de toxicidad que permitan conocer los efectos de estas a la salud humana y al medio ambiente (22). Las nanopartículas de metales y óxidos metálicos muestran propiedades biológicas, ópticas y magnéticas.

La plata, es un metal que ha tenido aplicación en la producción de joyas, utensilios, monedas, fotografías, explosivos y como agente desinfectante con fines médicos. Antiguamente era empleado en vasijas para almacenar bebidas, porque se consideraba que preservaba las condiciones del líquido; era usado también para la curación de heridas y tratamiento de úlceras. La actividad antimicrobiana se estableció en el siglo XIX y disminuyó su uso al introducirse en uso de los antibióticos. (36, 37)

2.1.5. Mecanismo de acción

Se ha creído que la actividad antimicrobiana de las NPs Ag es similar a la de la plata iónica, pero no su efecto biocida. El principal blanco que tienen las NPs Ag son las proteínas expuestas en la membrana celular de las bacterias, su actividad resulta de la alteración de estas proteínas, inhibiendo el proceso de transporte de electrones de la cadena respiratoria, con el fin de afectar la permeabilidad y generar apoptosis como se observa en la figura 3. Se ha observado que tienen mayor eficiencia relacionado al tamaño de las nanopartículas y la clase de bacterias a las que vayan dirigidas, teniendo en cuenta que las bacterias Gram positivas, tienen una pared celular con mayor cantidad de peptidoglicano que las Gram negativas y dificulta el ingreso de las nanopartículas al espacio donde se encuentra la membrana celular. (38)

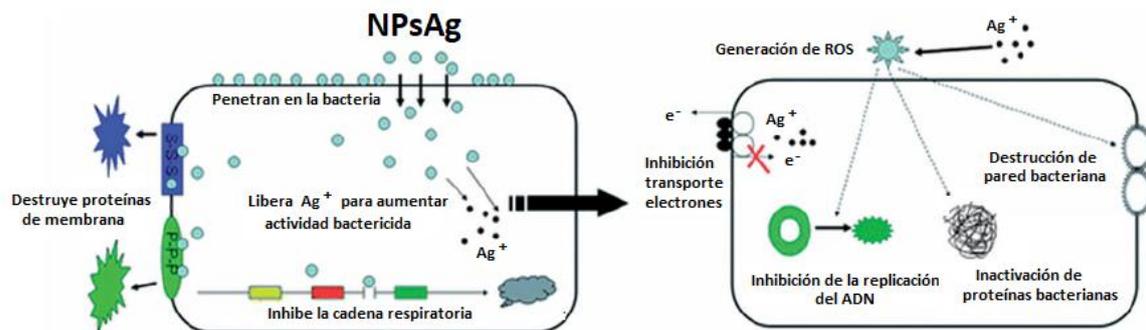


Figura 3 Mecanismo de acción de las NPsAg frente a las bacterias. Tomado de: (39)

2.1.6. Propiedades bactericidas

Las NPsAg son conocidas como oligodinámicas, es decir, tienen la capacidad de producir efecto bactericida en concentraciones muy bajas. Esta propiedad es dada por la reactividad que tienen las partículas de plata frente a proteínas, enzimas, ADN y ARN, debido a la interacción con grupos funcionales tipo tiol, hidroxilo, imidazol o amina; genera cambios en la permeabilidad y la respiración de la membrana; y por su tamaño, que le permite ingresar fácilmente a los microorganismos provocando interferencia en los procesos microbianos. (36, 40)

En los últimos años las NPsAg han ganado interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las principales aplicaciones en industria de la nanotecnología son:

En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con NPsAg para así evitar el crecimiento bacteriano.

Se está evaluando la utilización de las NPsAg contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos.

En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las NPsAg contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos.

Tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las NPsAg se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos. (41)

3. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El modelo que se abordó la investigación fue descriptiva experimental.

Población

3.1.1. Larvas

570 larvas de *Galleria mellonella* obtenidas comercialmente de Scientia que cumplieron con los criterios de inclusión adjuntos en la tabla 3.

Tabla 3 Condiciones de inclusión de las larvas *Galleria mellonella*.

Parámetro	Criterio
Estadio	Última fase larvaria
Peso	180 a 200 mg
Tamaño	2.0 a 3.0 cm de largo
Salud	No deben presentar estado de letargo o que estén sin movimiento. No deben tener pigmentación que indiquen proceso de melanización. Se descartan aquellas que tengan signos de pupación.

3.1.2. *Listeria monocytogenes*

Se evaluaron dos cepas de *Listeria monocytogenes*:

Listeria monocytogenes ATCC 7644 se obtuvo del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Listeria monocytogenes de origen clínico del cepario de microbiología de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS).

Se conservaron las cepas por el método de congelación: Se tomaron algunas colonias de la cepa original con asa calibrada 10µl y se colocaron en tubos eppendorf que tenían medio skim milk con glicerol; seguido de este procedimiento se llevaron a congelar a -80°C hasta el momento que se necesitaran nuevamente las cepas. (42)

Se descongeló un vial de cada cepa y se realizó repique en agar sangre en condiciones de aerobiosis a 37°C. Se mantuvo viva solo durante cada ensayo. Se repitió este proceso las veces que fue necesario. A las cepas de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y clínica se les realizó observación microscópica de bacilos Gram positivos con coloración de Gram y prueba de motilidad a 25 y 37°C. (10)

3.1.3. Nanopartículas de plata

En este estudio se probaron dos nanopartículas: NPsAg-47 y NPsAg-49, las cuales fueron sintetizadas por síntesis verde de *Borojoa patinoi* en la Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE).

Inoculación de larvas *Galleria mellonella*

Se siguió el protocolo estandarizado por Páez y col. (43) Las larvas de *Galleria mellonella* se limpiaron y seleccionaron de acuerdo a los criterios de inclusión y se mantuvieron en oscuridad en cajas plásticas con tapa y sistemas de ventilación a 37°C; junto con los alimentos artificiales proporcionados por los proveedores de las larvas hasta el momento de la inoculación. (32, 44)

Se realizó la inoculación de microorganismos a las larvas de la siguiente manera: las larvas seleccionadas fueron llevadas a refrigeración por 5 minutos a 5°C, para facilitar el proceso de inoculación, se realizó asepsia de la larva con un escobillón humedecido con alcohol en la parte inferior donde se realizaría la inoculación, se inyectó 10 µL en el proleg (propierna) izquierdo de manera intraperitoneal utilizando una jeringa Hamilton a cada larva. Se revisó que la larva no sufriera daño durante la inoculación, si alguna no presentó movilidad se descartó del estudio.

Seguimiento de larvas *Galleria mellonella*

Las larvas inoculadas se incubaron durante 5 días a 37°C y se realizó seguimiento a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas, registrando en una hoja control (Anexo 1) para cada larva del grupo siguiendo el Sistema de puntajes de índice de salud propuesto por Loh JM y col. tabla 4. (45)

Tabla 4 Sistema de puntajes de índice de salud. Tomada de: (45)

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN	PUNTAJE
Actividad	Ninguna actividad	0
	Actividad mínima con estimulación	1
	Activo cuando es estimulada	2
	Activo sin estimulación	3
Formación de capullo	Sin capullo	0
	Capullo parcial	0.5
	Capullo lleno	1
	Melanización completa (negro)	0
	Manchas oscuras en gusano de cera marrón	0

Melanización	>3 manchas en el gusano de cera beige	2
	<3 manchas en el gusano de cera beige	3
	Sin melanización	4
Sobrevivencia	Muertas	0
	Vivas	2

Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de sobrevivencia al ingresar los datos de sobrevivencia y días de incubación en Microsoft Excel y en Stata10 se graficaron curvas de sobrevivencia de Kaplan Meier. (32)

Interpretación de curvas de sobrevivencia de Kaplan meier

Las curvas de sobrevivencia, permiten evaluar el porcentaje de larvas vivas durante un tiempo determinado de observación. Las curvas se van generando a medida que mueren las larvas, disminuyendo su porcentaje. (46)

Determinación de Dosis Letal 50 (DL₅₀) *Listeria monocytogenes* en larvas *Galleria mellonella*

Para la determinación de la DL₅₀ de las cepas de *Listeria monocytogenes* clínica y ATCC 7644 cultivadas en Agar Sangre Cordero, en PBS se preparó concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml, que corresponde a lectura de absorbancia de 0,08-0,1 en turbidímetro de MicroScan. A partir de esa concentración se realizaron diluciones de $1,5 \times 10^7$ UFC/ml, $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, $1,5 \times 10^5$ UFC/ml y $1,5 \times 10^4$ UFC/ml (32). Se inoculo cada dilución en los grupos descritos en la tabla 5.

Tabla 5 Grupos *Galleria mellonella* para determinación de DL50 de *Listeria monocytogenes*

GRUPO	CONCENTRACIÓN	LARVAS
1	$1,5 \times 10^8$ UFC/ml	20
2	$1,5 \times 10^7$ UFC/ml	20
3	$1,5 \times 10^6$ UFC/ml	20
4	$1,5 \times 10^5$ UFC/ml	20
5	$1,5 \times 10^4$ UFC/ml	20
Control 1	Sin inocular	20
Control 2	10 μ L PBS	20

De acuerdo a las curvas de sobrevivencia generadas por Kaplan Meyer se determinó la DL_{50} de *Listeria monocytogenes*.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para Nanopartícula de Plata

Se realizó determinación de la CMI por prueba de microdilución con caldo Mueller-Hinton siguiendo el protocolo de CLSI en una placa de poliestireno de 96 pocillos, por triplicado. Se evaluaron dos nanopartículas NPsAg-47 y NpsAg-49 en concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 μ g/ml. Se evaluó su acción sobre *Listeria monocytogenes* a 1.5×10^4 UFC/mL. (47)

Se montaron los siguientes controles de viabilidad y pureza como se indica en la Tabla 6.

Tabla 6 Controles para la determinación de CMI

Control 1	Caldo Mueller-Hinton
Control 2	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
Control 3	<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica
Control 4	NpsAg-47
Control 5	NpsAg-49

Se incubó la placa a 37°C durante 24 horas y se realizó la lectura correspondiente en el lector de microplacas para absorbancia Chromate.

Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

La determinación de la CMB se llevó a cabo por triplicado para cada concentración. Para ello se preparó cajas de Petri estéril con 25mL de agar Mueller-Hinton, se sembraron alícuotas de 10 μ L de los pocillos correspondientes con asa calibrada de las concentraciones establecidas en el CMI. Se incubaron a 37°C por 24 horas.(47)

Sobrevivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Listeria monocytogenes* y tratadas con NPsAg-47 a dos concentraciones

De la determinación de CMI y CMB se seleccionó la NPsAg-47 a 100 y 50 μ g/ml y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 a 1.5×10^7 UFC/ mL. Se inocularon los grupos de *Galleria mellonella* de acuerdo a la tabla 7. Se realizó seguimiento de larvas por 120h y se registraron los cambios en hoja de registro (Anexo 1). (43)

Tabla 7 Inoculación de larvas para evaluación de infección in vivo

GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	20 larvas con NPsAg-47 a 100 µg/ml y <i>Listeria monocytogenes</i>
2	20 larvas con NPsAg-47 a 50 µg/ml y <i>Listeria monocytogenes</i>
Control 1	20 larvas sin inocular
Control 2	20 larvas con PBS
Control 3	20 larvas con NPsAg-47 a 100 µg/ml
Control 4	20 larvas con NPsAg-47 a 50 µg/ml
Control 5	20 larvas con <i>Listeria monocytogenes</i>

Estudio Histológico de larvas *Galleria mellonella*

De acuerdo al protocolo estandarizado por Padilla L., Páez D.,(12) el estudiante de Citohistología Jefferson Parga de FUCS realizo el proceso histológico y posterior coloración con Hematoxilina-Eosina (H&E) evaluar los daños provocados por *Listeria monocytogenes* en los diferentes tejidos de larvas *Galleria mellonella*.

Láminas de cortes histológicos de las larvas previamente fijadas fueron coloreadas con Gram para evaluar la presencia de *Listeria monocytogenes* en los diferentes tejidos de larvas *Galleria mellonella*.

Se inocularon los grupos de *Galleria mellonella* de acuerdo a la tabla 8. (43)

Tabla 8 Inoculación de larvas para evaluación histológica

GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	20 larvas Inoculación con <i>Listeria monocytogenes</i> a 1.5×10^7 UFC/ mL
Control 1	20 larvas sin inocular
Control 2	20 larvas inoculadas con 10µL PBS

Para cada grupo se procesaron cinco larvas en los días de incubación 0, 1, 3 y 5. Las larvas se fijaron con FAATD, inyectando 0,4ml y se sumergieron en el fijador, 24h en refrigeración (Figura 4).(12).



Figura 4 Larvas de *Galleria mellonella* fijadas con FAATD. Autoras.

Las larvas fueron transportadas al laboratorio de Citohistología la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud sede Centro para su procesamiento histológico.

Las láminas de larvas de días de incubación 0, 1, 3 y 5 para coloración de Gram, se colorearon de acuerdo a los tiempos estandarizados por el laboratorio así: se aplicó Cristal violeta durante un minuto previamente filtrado, se lavó con agua y se aplicó Lugol de Gram durante un minuto, se realizó lavado con agua, se cubrió con alcohol de Gram durante 30 segundos, se lavó con agua y para finalizar se aplicó Fucsina de Gram durante un minuto, se dejó secar cada lámina y se observó al microscopio en campo claro bajo 100X. Se evaluó la presencia de bacilos Gram positivos

Evaluación de la respuesta inmune celular de *Galleria mellonella* a la infección por *Listeria monocytogenes*

La respuesta inmune celular de *Galleria mellonella* frente a la infección de *Listeria monocytogenes* se realizó por recuento total de hemocitos y su viabilidad en los días 0, 2, 3 y 5 de incubación. Se inocularon los grupos de *Galleria mellonella* de acuerdo a la tabla 9.

Tabla 9 Inoculación de larvas para evaluación de respuesta inmune celular

GRUPO	CANTIDAD Y CARACTERÍSTICAS
1	10 <i>Galleria mellonella</i> sin inocular

2	<i>10 Galleria mellonella + Listeria monocytogenes</i>
3	<i>10 Galleria mellonella + Listeria monocytogenes + NPsAg- 47 (50ng/ml)</i>
4	<i>10 Galleria mellonella + Listeria monocytogenes + NPsAg-47 (100ng/ml)</i>
5	<i>10 Galleria mellonella + + NPsAg- 47 (50ng/ml)</i>
6	<i>10 Galleria mellonella + NPsAg-47 (100ng/ml)</i>

De cada grupo se seleccionaron tres larvas y se llevaron a refrigeración durante 5 minutos. Utilizando aguja de insulina, se pinchó entre dos de los segmentos de la superficie del cuerpo y se presionó la larva hasta obtener la hemolinfa que se recogió en tubo con EDTA y se mezcló. Inmediatamente se montó cámara de Newbauer con mezcla de 10µl de la muestra y 10µl de azul de tripán. Se realizó lectura en el equipo Countess II FL Cell counter y se grabó el resultado y la curva generada. Este recuento se realizó por duplicado.

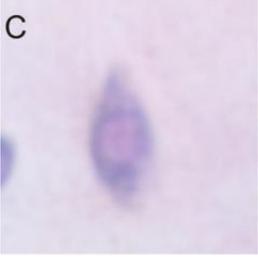
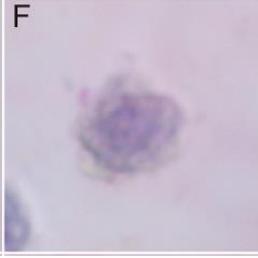
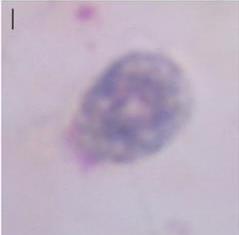
Recuento diferencial de hemocitos de *Galleria mellonella* en infección por *Listeria monocytogenes*

Con cuatro larvas de la tabla 9 se tomó hemolinfa y se realizaron extendidos sobre lámina portaobjetos. Se permitió secar a temperatura ambiente. Una lámina se coloreo con Wright así: se cubrió la lámina completamente con el colorante y se agregaron unas gotas de agua destilada y con una pipeta se sopló y se dejó durante 5 minutos. Se lavó con agua, se dejó secar cada lámina y se observó al microscopio en campo claro bajo 100X.

Otra lámina se coloreo con Giemsa así: la extensión de hemolinfa seca se fijó con metanol durante 3 minutos y se secó al aire. Se preparó el colorante momentos previos con 0.2 ml de Giemsa y 2 ml de solución PBS pH 7.2. Se cubrió la preparación con el colorante durante 25 minutos y se lavó durante 2 minutos con la solución PBS pH 7.2. Se dejó secar cada lámina y se observó al microscopio en campo claro bajo 100X.

Para la clasificación de los hemocitos se siguieron las características presentadas en la tabla 10.

Tabla 10 Características de los diferentes tipos de hemocitos de *Galleria mellonella*. (34)

CÉLULA	IMAGEN	CARACTERÍSTICAS
Plasmocito		<p>Células pequeñas redondas o fusiformes, de 8-10μ de diámetro con una alta relación núcleo/citoplasma, su núcleo excéntrico es redondo lobulado, en tinción Giemsa el citoplasma muestra color azul. no se tiñen de rojo neutro</p>
Célula granular		<p>Suelen ser esféricas u ovoides, con una longitud de 8-12μ de diámetro. tienen una baja relación núcleo citoplasma y excéntrica, generalmente con núcleo lobulado. En tinción de Giemsa el citoplasma muestra color azul y el núcleo muestra color púrpura oscuro. Se tiñe débilmente en rojo neutro.</p>
Célula esférica		<p>Presentan una forma grumosa, son grandes 10-15μ de diámetro, altamente polimórficos, con una forma esférica e indefinida, tiene baja proporción núcleo citoplasma. Su núcleo redondo excéntrico contiene una central bien desarrollada. El citoplasma está característicamente lleno de grandes gránulos heterogéneos redondos y ovalados. se tiñen fuertemente con rojo neutro y Giemsa.</p>
Oenocitoide		<p>Tiene un diámetro de 12-20 μ y presenta una forma redonda con un núcleo pequeño y excéntrico, tiene citoplasma homogéneo con granulación acidófila, presenta vacuolas cortas citoplasmáticas. Tiñen débilmente en rojo neutro.</p>

Recuento de UFC de *Listeria monocytogenes* y comparación con el tratamiento NPsAg

Se determinó la presencia de *Listeria monocytogenes* en cuerpo graso en un grupo de 10 larvas. Se llevaron a refrigeración durante de 5min para inmovilizarlas, luego se les realizó disección con las cuchillas desechables, se extrajo los órganos para obtener el cuerpo graso que fue sumergido en PBS 1X. La solución se llevó a una lectura de absorbancia de 0,08-0,1 en turbidímetro de MicroScan que corresponde a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. (48)

Para evaluar la presencia de *Listeria monocytogenes* en cuerpo completo, se trabajó un grupo de 10 larvas completas y se trituraron en mortero estéril, se llevó a una lectura de absorbancia de 0,08-0,1 en turbidímetro de MicroScan que corresponde a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

A partir de estas diluciones, se preparó $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, $1,5 \times 10^4$ UFC/mL, $1,5 \times 10^3$ UFC/mL y $1,5 \times 10^2$ UFC/mL en PBS estéril. Con asa desechable de 10mL se sembró cada dilución en agar Mueller Hinton. Se incubo a 37°C 24h y se realizó el conteo de las colonias de acuerdo al factor de dilución. Se realizó Gram para confirmar la presencia de Bacilos Gram positivos.

4. RESULTADOS

Población

Listeria monocytogenes

Las cepas, pasaron por pruebas microbiológicas para confirmar *Listeria monocytogenes*.

Se realizó cultivo en agar sangre como se observa en la figura 5A, prueba de motilidad a 25 y 37°C como se observa en la figura 5C y Gram, donde se observaron bacilos Gram positivos mostrados en la figura 5B.

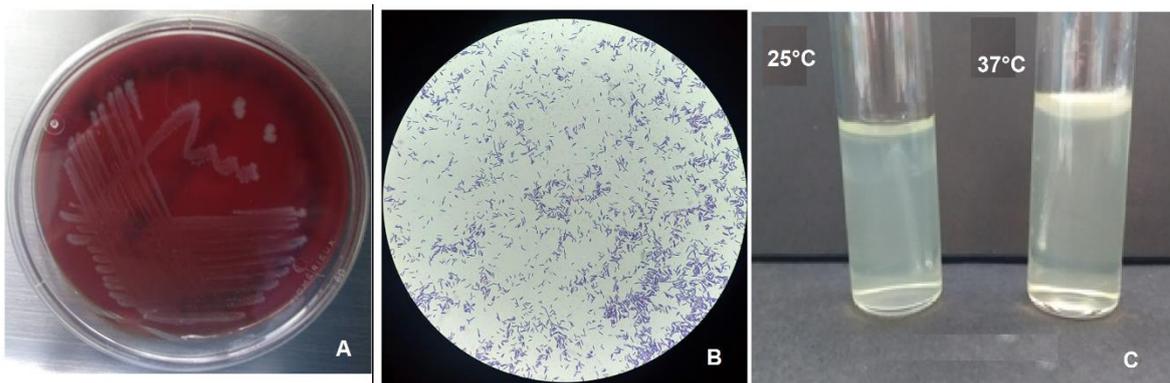


Figura 5 Características microbiológicas de *Listeria monocytogenes*. A. Crecimiento en Agar Sangre. B. Morfología en Gram. C. Motilidad a 25 y 37°C. Autoras.

Nanopartículas de plata

La siguiente información fue suministrada por Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE) corresponde a las NPsAg que se trabajaron:

- La distribución del número de las nanopartículas por el tamaño fue en promedio de 41,15 d nm de las NPsAg-47 y de 21,0 d nm de las NPsAg-49 (Figura 6).

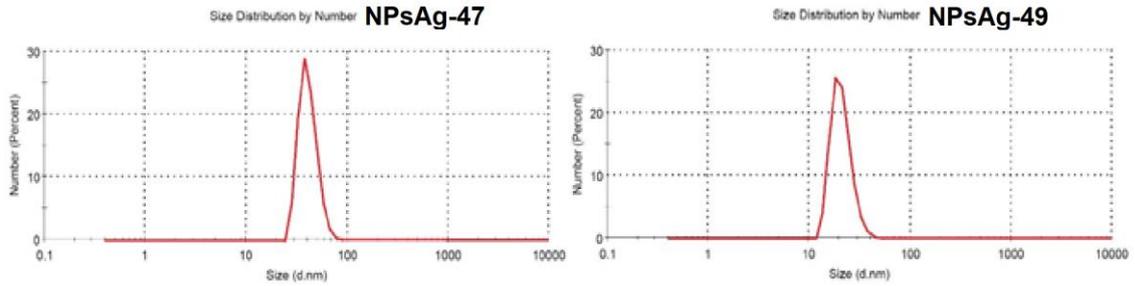


Figura 6 Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

- Por microscopía SEM se observó que NPsAg-47 presento formas alargadas y redondas, mientras que NPsAg-49 formas redondas.

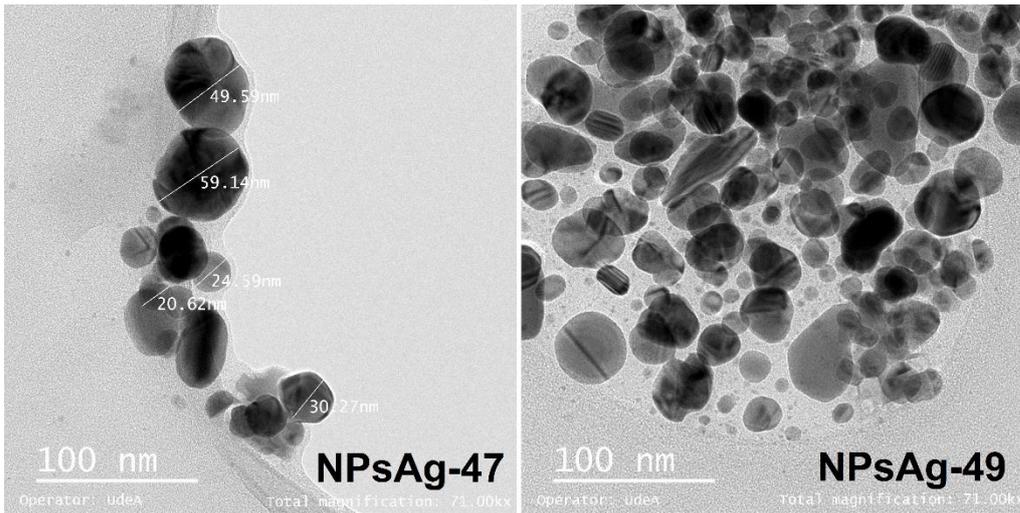


Figura 7 Microscopía SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

Determinación de Dosis Letal 50 (DL₅₀) *Listeria monocytogenes* en larvas *Galleria mellonella*

La determinación de la DL₅₀ de las dos cepas de *Listeria monocytogenes* se realizó sobre las curvas de Kaplan Meier (Figura 8 y 9).

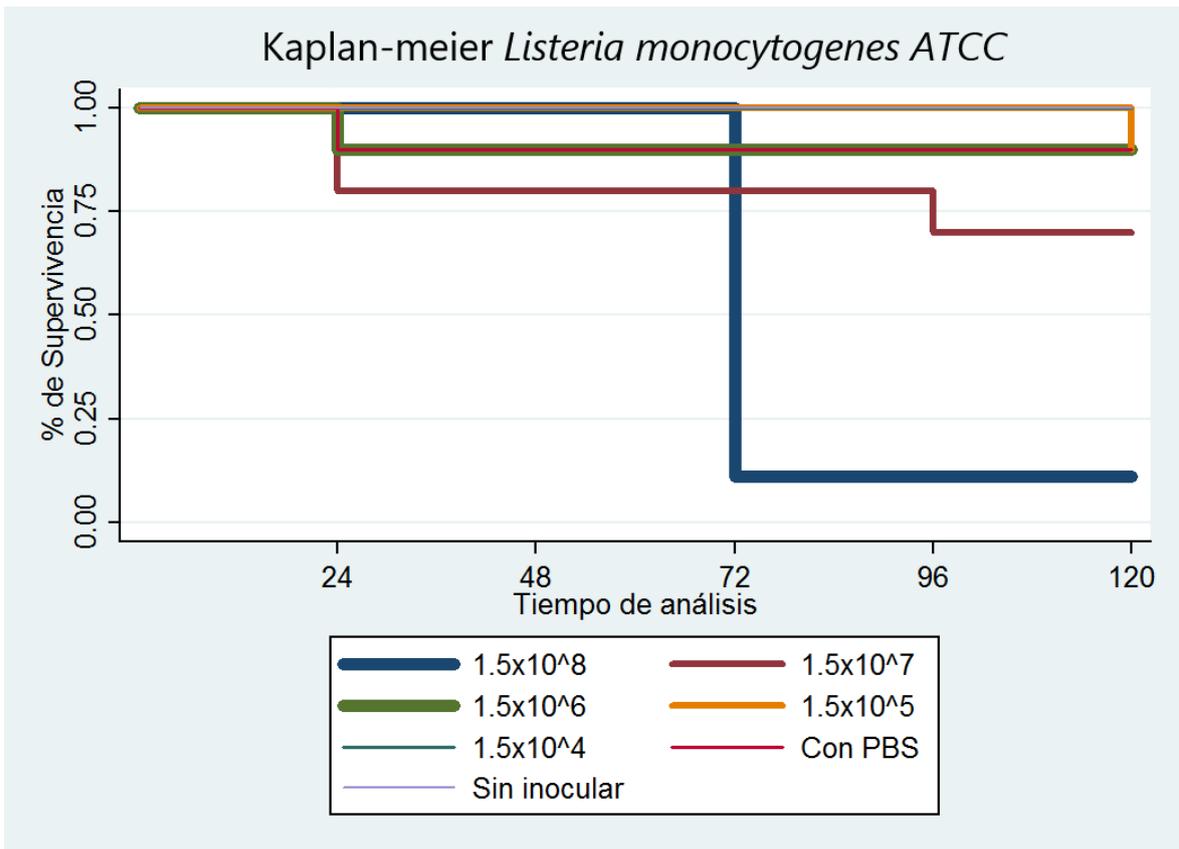


Figura 8 Curva de sobrevivencia Kaplan Meier *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

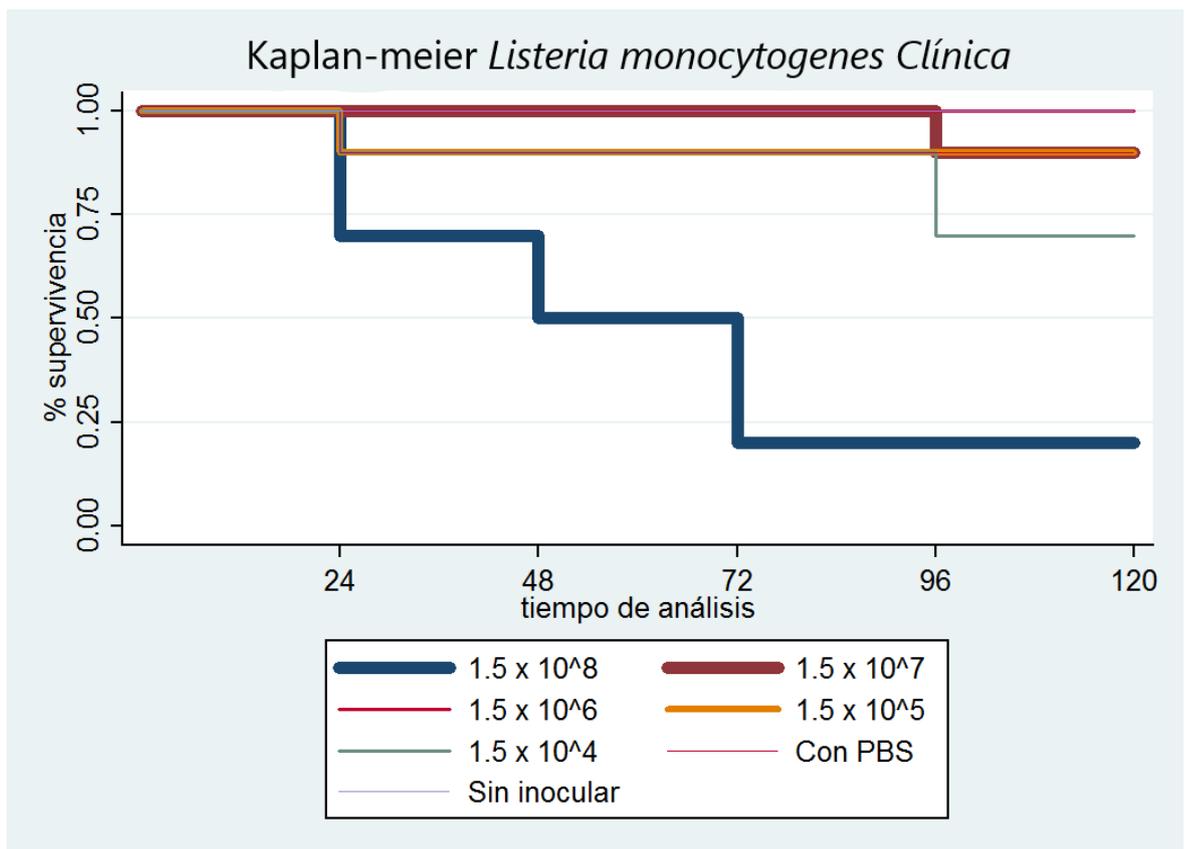


Figura 9 Curva de sobrevivencia Kaplan Meier *Listeria monocytogenes* Clínica

Se determinó que a las 120h para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 la DL₅₀ fue de 1.5×10^7 UFC/mL y para *Listeria monocytogenes* Clínica de 1.5×10^4 UFC/mL.

En cuanto a los controles, se determina que las larvas se encontraban en buen estado de salud durante las 120 h de incubación y que el PBS utilizado en las diluciones no generó ningún tipo de respuesta adversa en las larvas.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración mínima bactericida (CMB)

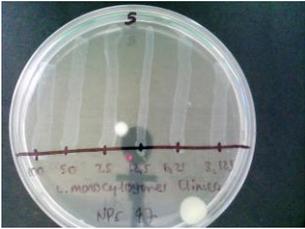
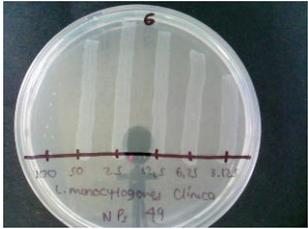
Los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las nanopartículas NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Listeria monocytogenes* Clínica son presentados en la tabla 11.

La determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Listeria monocytogenes* Clínica se presenta en la tabla 12.

Tabla 11 Determinación de CMI para NPsAg-47 y NPsAg-49

		REPLICA	CMI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	NPsAg-47	1	>100
		2	>100
		3	>100
	NPsAg-49	1	>100
		2	>100
		3	>100
<i>L. monocytogenes</i> Clínica	NPsAg-47	1	100
		2	100
		3	100
	NPsAg-49	1	>100
		2	>100
		3	>100

Tabla 12 Determinación de CMB para NPsAg-47 y NPsAg-49

	NPsAg-47	NPsAg-49
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC	> 100µg/mL	> 100µg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica	> 100µg/mL	100µg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC		
<i>Listeria monocytogenes</i> Clínica		

Sobrevivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Listeria monocytogenes* y tratadas con NPsAg-47 a dos concentraciones

Se determinó por medio de curva de sobrevivencia de Kaplan Meier la mejor concentración para trabajar la NPsAg-47, el resultado es presentado en la figura 10 y 11.

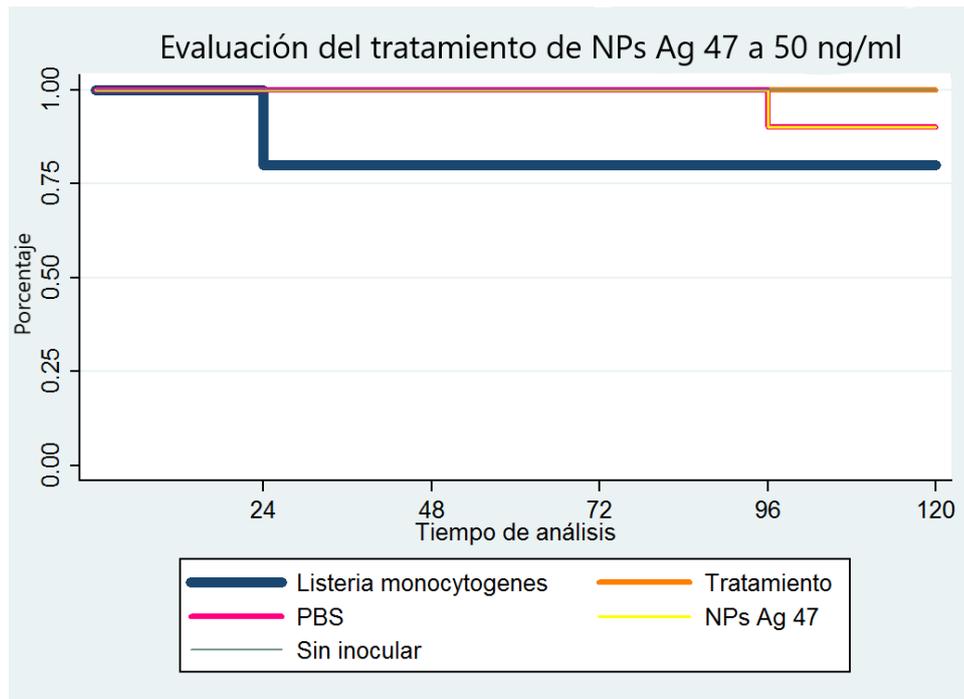


Figura 10 Sobrevivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Listeria monocytogenes* y tratada con NPsAg-47 a 50 ng/mL

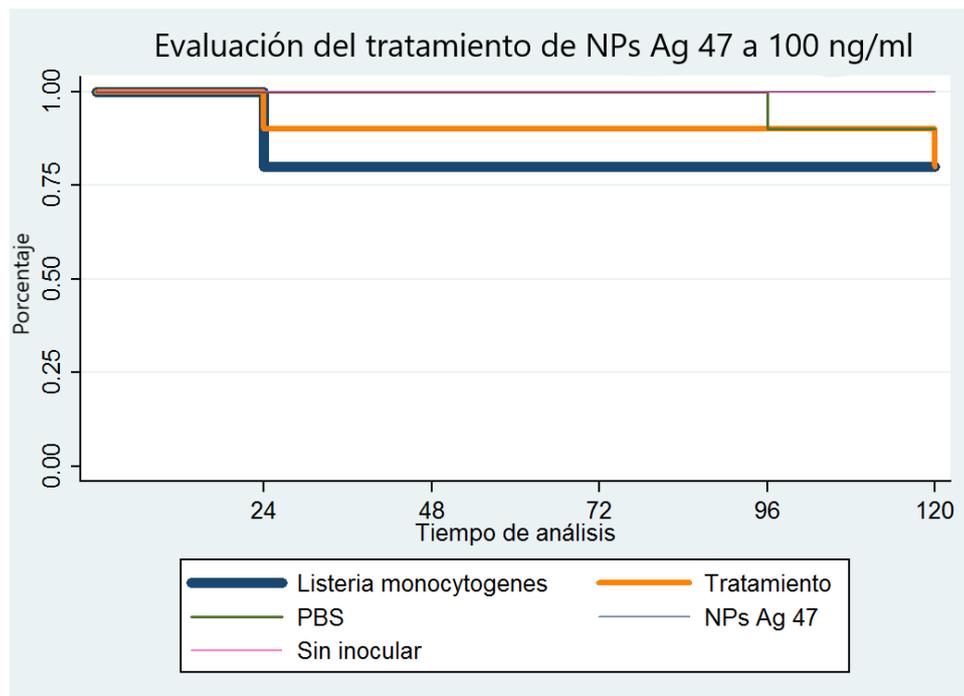
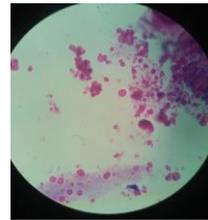


Figura 11 Sobrevivencia de *Galleria mellonella* infectada con *Listeria monocytogenes* y tratadas con NPsAg-47 a 100 ng/mL

Estudio Histológico de larvas *Galleria mellonella*

Se realizó estudio microscópico de las larvas y registró fotográfico de cinco sitios el cuerpo de la larva, identificados *Listeria monocytogenes* presenta tropismo a estos sitios de acuerdo a la literatura revisada: cabeza, intestino medio y bajo, cuerpo graso y espacio intersticial (49). Se presentó en las tablas 13, 14, 15 y 16 la comparación de los cambios histológicos para cada grupo de larvas de la tabla 8 en los días 0, 2, 3 y 5.

Tabla 13 Histología de *Galleria mellonella* inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 0

DÍA 0				
	LARVAS INOCULADAS CON NPs Ag	LARVAS INOCULADAS CON NPs + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				

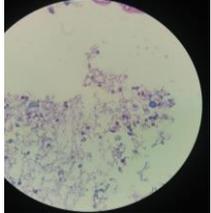
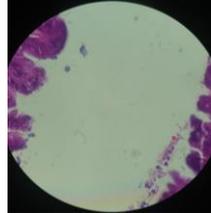
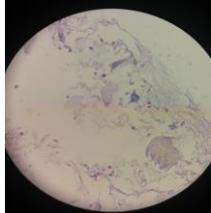
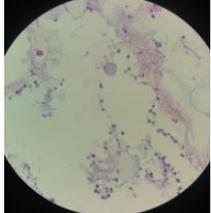
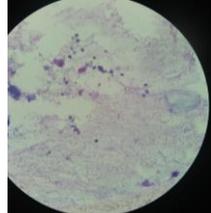
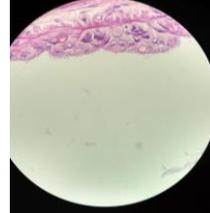
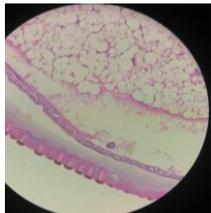
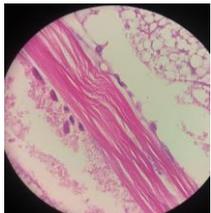
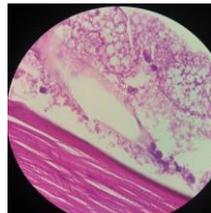
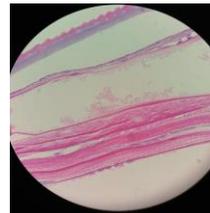
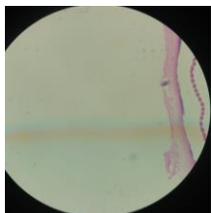
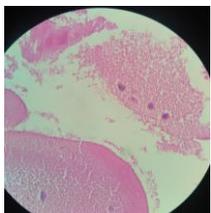
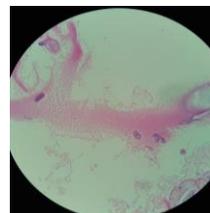
<p>INTESTINO MEDIO</p>				
<p>INTESTINO BAJO</p>				
<p>CUERPO GRASO</p>				
<p>ESPACIO INTERSTICIAL</p>				

Tabla 14 Histología de *Galleria mellonella* inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 2

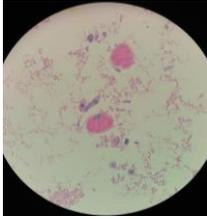
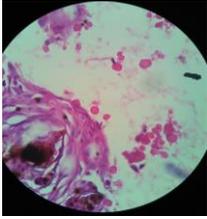
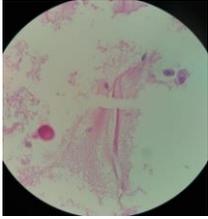
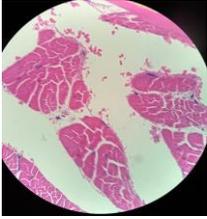
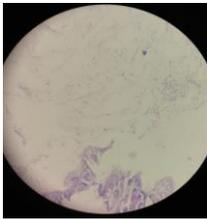
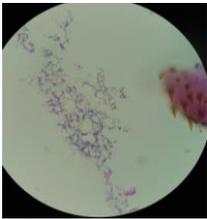
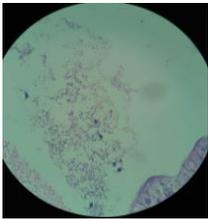
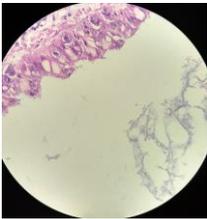
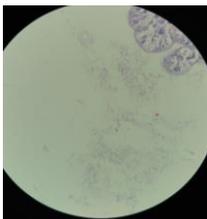
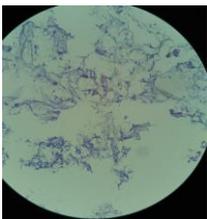
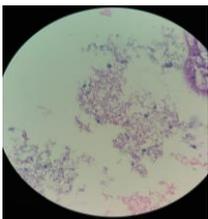
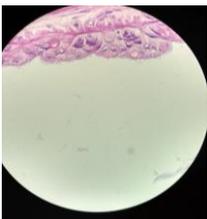
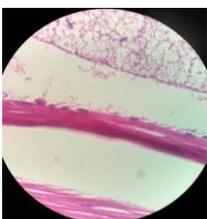
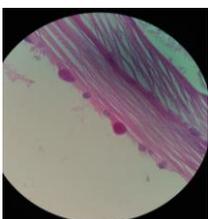
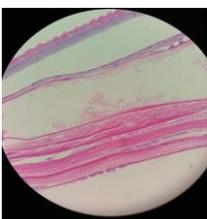
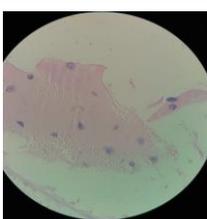
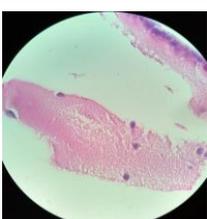
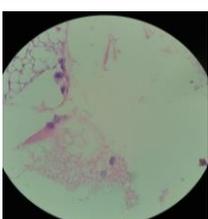
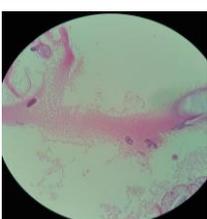
DÍA 2				
	LARVAS INOCULADAS CON NPs Ag	LARVAS INOCULADAS CON NPs + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

Tabla 15 Histología de *Galleria mellonella* inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 3

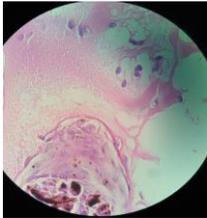
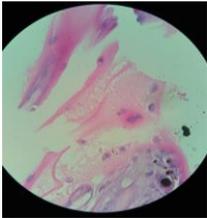
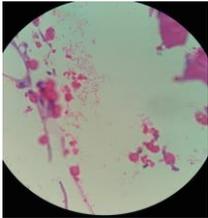
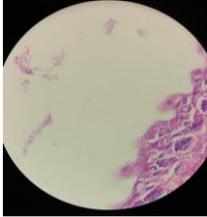
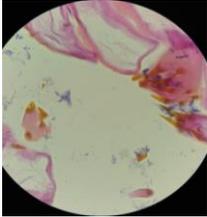
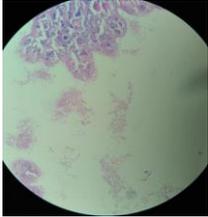
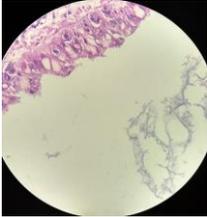
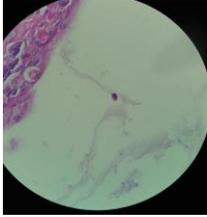
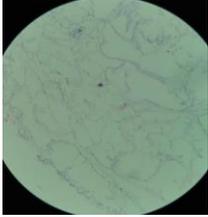
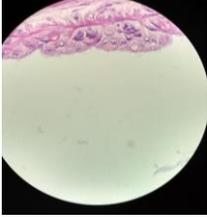
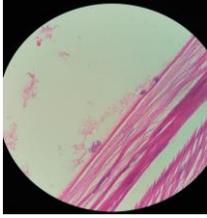
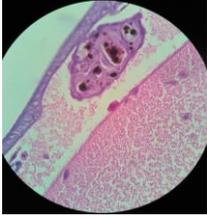
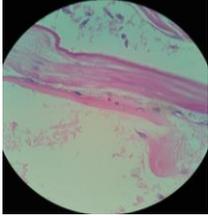
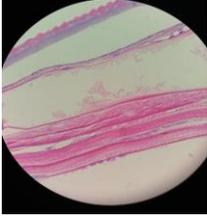
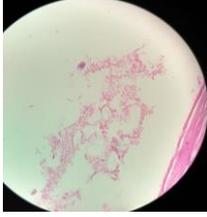
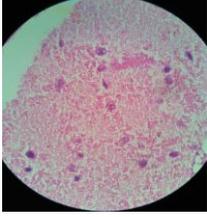
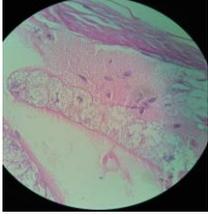
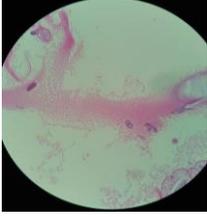
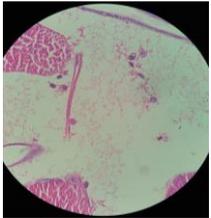
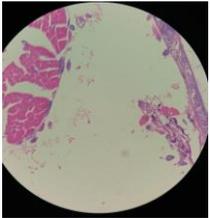
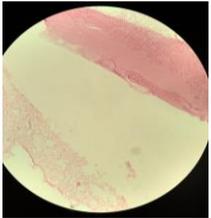
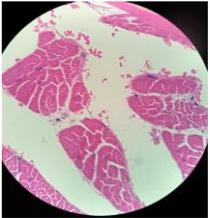
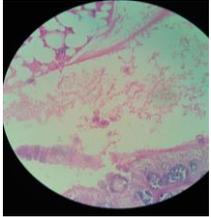
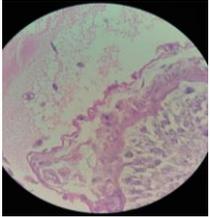
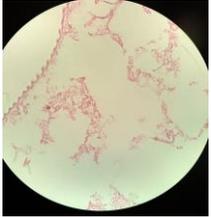
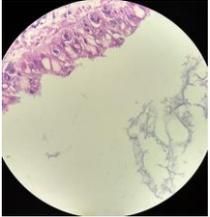
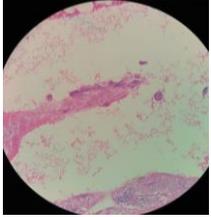
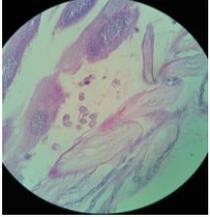
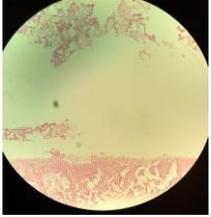
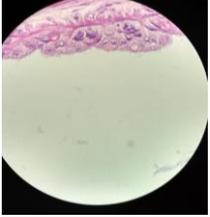
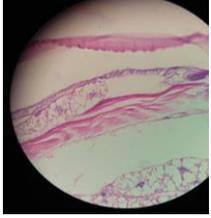
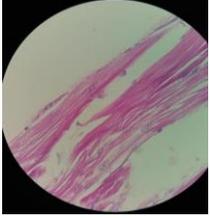
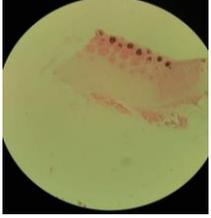
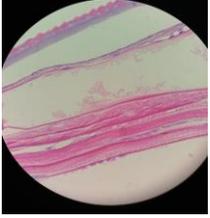
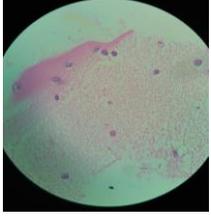
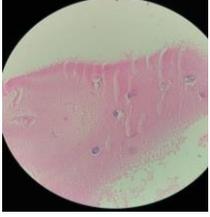
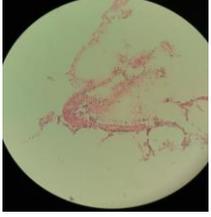
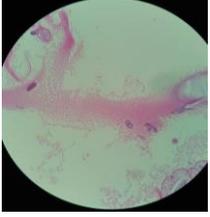
DÍA 3				
	LARVAS INOCULADAS CON NPs Ag	LARVAS INOCULADAS CON NPs + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

Tabla 16 Histología de *Galleria mellonella* inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, NpsAg-47 y tratamiento, Día 5

DÍA 5				
	LARVAS INOCULADAS CON NPs Ag	LARVAS INOCULADAS CON NPs + <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS INOCULADAS CON <i>L. monocytogenes</i> ATCC	LARVAS SIN INOCULAR
CABEZA				
INTESTINO MEDIO				
INTESTINO BAJO				
CUERPO GRASO				
ESPACIO INTERSTICIAL				

En los cortes histológicos se buscó la presencia de *Listeria monocytogenes* por medio de la coloración de Gram. Bajo objetivo de 100X en campo claro se buscó la presencia de bacilos Gram positivos en las láminas de Gram. Los resultados son presentados en la tabla 17.

Tabla 17: Presencia de *Listeria monocytogenes* en cerebro, intestino y cuerpo graso de *Galleria mellonella* con tinción de Gram

	GRAM			
	DIA	CEREBRO	INTESTINO	CUERPO GRASO
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	5	+	+	+
	0	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> + NPs-Ag	2	+	+	+
	3	+	-	-
	5	+	-	-
	0	+	+	+

Evaluación de la respuesta inmune celular de *Galleria mellonella* a la infección por *Listeria monocytogenes*

Mediante el uso del Countess II FL Cell Counter (Anexo 2), se determinó la respuesta celular que genera *Galleria mellonella* durante la infección de *Listeria monocytogenes*. Adicionalmente, se estudió la respuesta celular al adicionar el tratamiento con NPsAg-47. Los resultados son presentados en la tabla 18.

Tabla 18 Comparación de la respuesta inmune celular en *Galleria mellonella* durante infección con *Listeria monocytogenes* y tratamiento con NPsAg-47

	DI A	PLASMOCITO	GRANULAR	ESFÉRICA	OENOCITOIDE	TOTAL
SIN INOCULAR	0	796	1173	1028	883	3881
	2	759	1120	788	1045	3712
	5	1125	1397	1000	852	4374
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC	0	594	930	794	937	3255
	2	377	252	50	540	1219
	5	413	562	446	545	1966
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC y NPsAg-47	0	557	998	868	972	3396
	2	675	1013	793	675	3157
	5	828	1080	876	876	3660

Se determinó la ubicación de los diferentes tipos celulares en larvas sanas, encontrando que en la cabeza se ubican principalmente células Oenocitoides y Esféricas, en intestino medio las células Granulares y Esféricas, en hemolinfa se encuentran los Plasmocitos y en cuerpo graso los hemocitos sésiles adheridos al tejido. En larvas infectadas con *Listeria monocytogenes*, en el día cero se observó una distribución normal de las células, para el día dos se observó disminución marcada de Oenocitoides en cabeza y los Plasmocitos y células granulares concentradas en todas las estructuras larvarias. En las larvas inoculadas simultáneamente con *Listeria monocytogenes* y NPsAg-47 se presentó aumento celular, principalmente en Plasmocitos. En el grupo control de larvas inoculadas con NPsAg-47 no se detectaron cambios en el número y ubicación de las células inmunes.

Recuento diferencial de hemocitos de *Galleria mellonella* en infección por *Listeria monocytogenes*

Extendidos de la hemolinfa de larvas fueron coloreadas con Wright y Giemsa. Se estableció que con la coloración de Wright se diferencian claramente los 4 tipos de células inmunes de *Galleria mellonella* por el tamaño como se observa en la figura 12A, mientras que con Giemsa se visualiza la morfología del citoplasma, núcleo y vacuolas como se observa en la figura 12B.

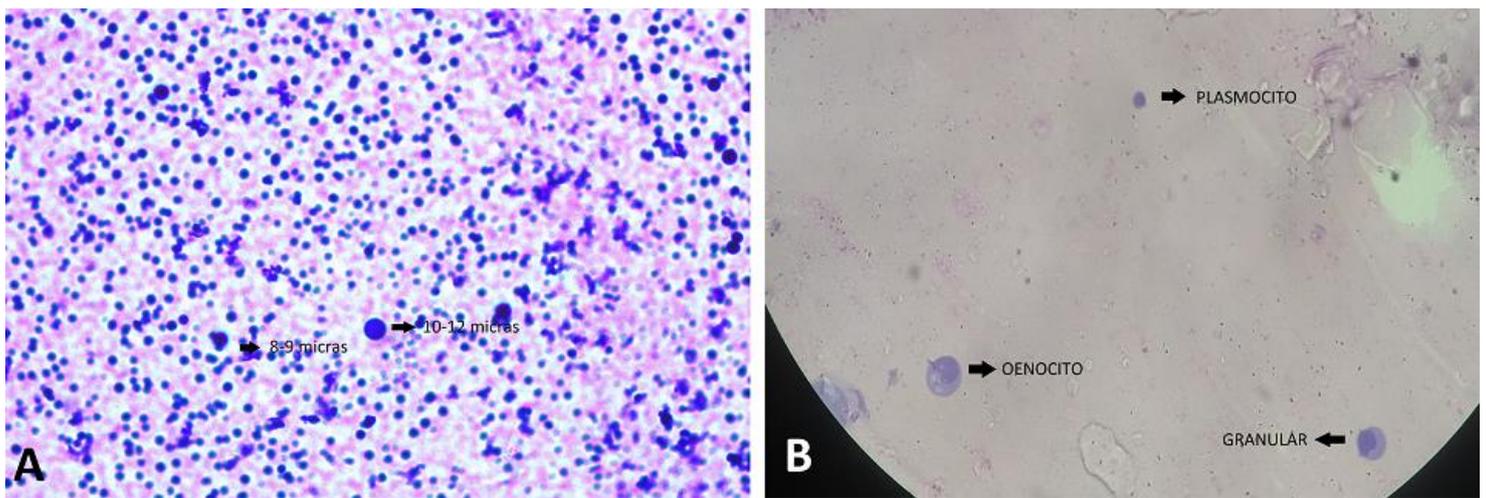
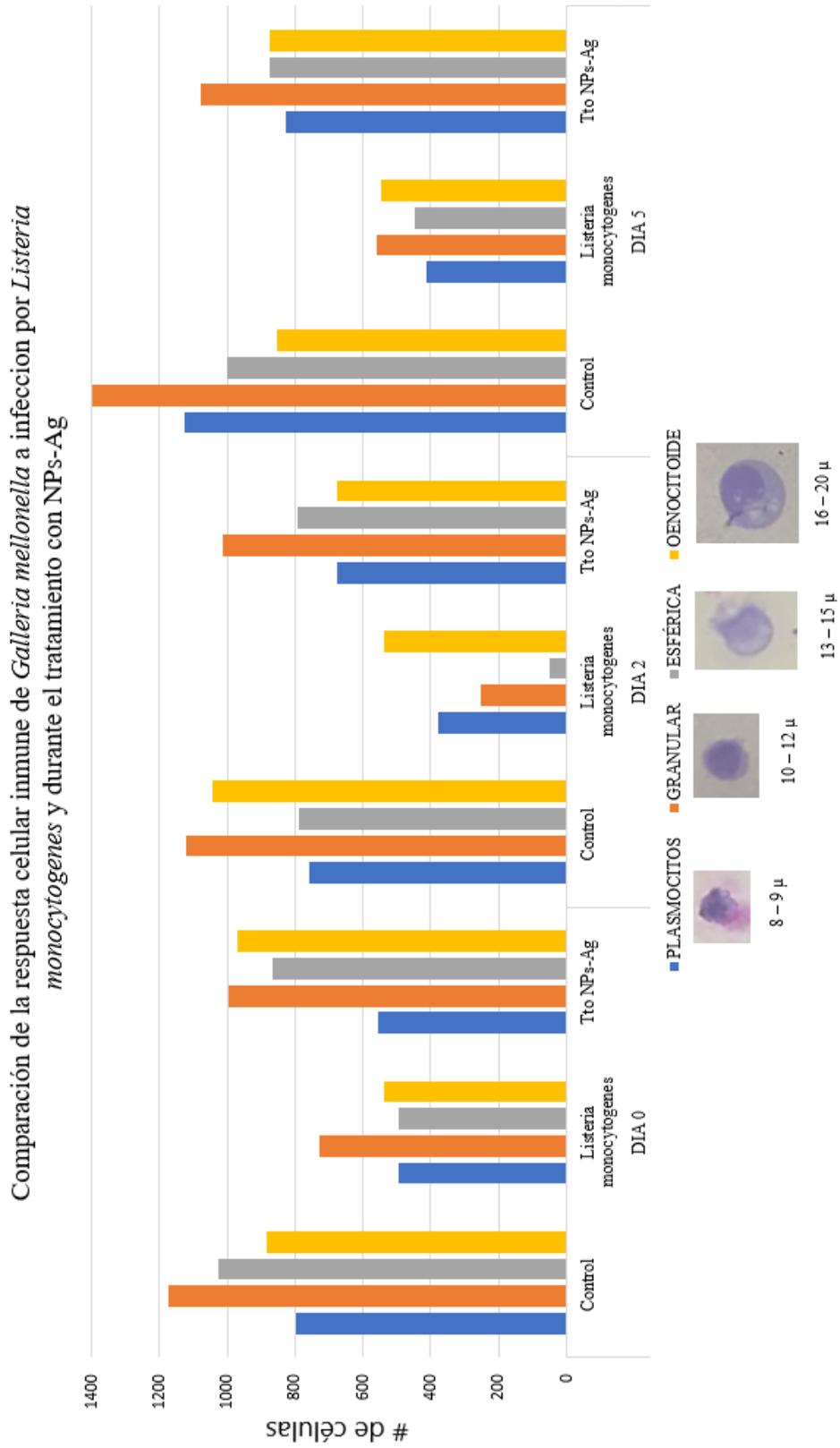


Figura 12 Hemocitos de *Galleria mellonella* observados en hemolinfa. A. Coloración Wright. B. Coloración Giemsa. Autores.

Se realizó comparación de los hemocitos en los diferentes grupos de *Galleria mellonella* en los días de seguimiento 0, 2 y 5. El resultado es presentado en la figura 12.

Figura 1 Comparación respuesta celular inmune de *Galleria mellonella* a infección por *Listeria monocytogenes* y durante el tratamiento con NPsAg-47



■ Recuento de UFC de *Listeria monocytogenes* inoculada en *Galleria mellonella*

Mediante el recuento en placa, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de *Listeria monocytogenes* en el macerado del cuerpo completo y cuerpo graso de las larvas mostrados en la tabla 19.

Tabla 19 Recuento en placa de UFC de *Listeria monocytogenes*

DIA	CUERPO COMPLETO	CUERPO GRASO
	UFC/ml	UFC/ml
0	5×10^7	3×10^7
2	1×10^3	0
3	0	2×10^6
5	50×10^2	1×10^2

5. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito determinar la capacidad inhibitoria de las NPsAg en el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes*, usando como modelo animal larvas de *Galleria mellonella*.

Se realizó un estudio de la capacidad de infección de larvas de *Galleria mellonella* mediante la determinación de la DL₅₀ de *Listeria monocytogenes*, con la cual se determinó la concentración bacteriana que provoca la muerte del 50% de la población estudiada. En los resultados reflejados en curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier, la concentración más cercana al 50% de la sobrevivencia de las larvas fue 1.5×10^7 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 serogrupo ½c y de 1.5×10^4 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* Clínica; al compararse las dos DL₅₀ se observa diferencia, esto se asocia a la patogenicidad de las cepas bacterianas, basado en la procedencia de cada una, siendo así la cepa ATCC 7644 proveniente de una casa comercial y la cepa Clínica de un aislado de un paciente con meningitis, la cual demostró mayor virulencia. La diferencia en la virulencia de *Listeria monocytogenes* ha sido observada en estudios in vivo (ratón) y en estudios in vitro (cultivos celulares); pero la correlación entre el nivel de virulencia y el origen o tipo de cepa no ha sido establecida. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas entre la virulencia de cepas de origen clínico y de alimento, siendo las primeras las que presentan dosis letales más bajas. (50) Ramírez y col. comparando cepas de *Listeria monocytogenes* serotipo 4b procedentes de cabra y sus derivados con la cepa ATCC 43249 serotipo ½a, establecieron que en ratones y células Caco-2 se presentó mayor infección y muerte por las cepas salvajes, concluyendo que esto se debe a su mayor habilidad para crecer in vivo. (51) En relación con los serotipos los ½a, ½b y 4b son los más aislados de los casos de listeriosis humana y animal con más del 90% y el serotipo ½c, ha sido encontrado como contaminante de alimentos. (4)

En cuanto a la relación dosis-respuesta, se debe tener en cuenta que la virulencia del microorganismo, generada por su exposición a diferentes ambientes, permiten desarrollar factores de virulencia que lo protegen de lo que pueda afectar su integridad y la susceptibilidad del hospedero, por la insuficiencia de la respuesta inmune. La dosis de riesgo estimada para población normal, abarca el rango de 1×10^3 a 1×10^7 UFC/ml, de acuerdo al boletín emitido por el Ministerio de Salud de Colombia en conjunto con el Instituto Nacional de Salud: *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en queso fresco en Colombia*, para el año 2011, donde también mencionan los modelos dosis-respuesta para *Listeria monocytogenes*. Se reportan como modelos animales primates, ratones y cobayas en estado de embarazo, quienes presentan DL₅₀ reportada de 1×10^7 UFC/gr, dando validez a los resultados en la larva. (52)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, se realizaron para evaluar in vitro las nanopartículas de plata. De acuerdo a los resultados, se observa que hay inhibición de la NPs-Ag 47 a la concentración de 100 µg/mL y hay muerte de la bacteria a la misma concentración con la NPs-Ag 49. La plata por sí

sola ha sido considerada por mucho tiempo un bactericida muy eficiente, pero existen reportes de su poder dañino para la salud. La nanotecnología ha incluido la utilización de diferentes metales para la síntesis de nanoproducidos, siendo la plata y el oro los más utilizados, debido a ciertas características físicas y químicas óptimas que su tamaño le confiere. (53) Finalmente se confirmó que la nanopartícula de plata es capaz de inhibir y matar *in vitro* a concentraciones bajas en comparación a otros estudios como Chauhan y col. quienes trabajaron con NPsAg obtenidas por síntesis verde de *Jatropha curcas* y realizaron evaluaciones *in vitro* a concentraciones de 0.005 a 0.333 mg/mL. También determinaron por microscopía TEM que las NPsAg interactúan con la membrana de *Listeria monocytogenes*, provocando su desintegración y daño total de la célula bacteriana a las 8h (54), lo cual afirma que las nanopartículas de plata también presentan un efecto biocida.

El comportamiento de NPsAg difiere *in vitro* de *in vivo*, por esta razón se realizó la evaluación del tratamiento con NPsAg-47 en el modelo animal infectado con *L. monocytogenes* ATCC 7644 por medio de curvas de sobrevivencia Kaplan Meier, probando las concentraciones 50ng/ml y 100ng/ml. En los resultados se observa que las larvas infectadas con tratamiento tienen mayor sobrevivencia frente a las larvas infectadas sin tratamiento, las NPsAg-47 proveen protección a *Galleria mellonella* aumentando su sobrevivencia incluso en un 100%, como es el caso de las NPsAg-47 con 50 ng/mL de concentración. La efectividad de las NPsAg obtenida en el trabajo elaborado, dan paso a nuevos estudios y generación de nuevos conocimientos frente al potencial que tiene como antimicrobiano, de acuerdo a Cardoso y col. hasta el momento no se ha reportado resistencia a las NPsAg. (38) Estevez y Santos establecieron que existe efecto antimicrobiano *in vitro* de las NPsAg y otros metales como el cobre y el oro, frente a *Clostridium sp* y a las bacterias asociadas a enfermedades periodontales como *P. gingivalis*(55, 56); también Bravo y col. probaron que NPsAg *in vitro* sobre el parásito *Perkinsus marinus* y encontraron que, si existe susceptibilidad por parte del parásito, pero la concentración obtenida *in vitro*, no causa el mismo efecto *in vivo*. (57)

También se evaluó el efecto tóxico de la NPs-Ag 47 en las curvas de sobrevivencia, donde se observa que no son tóxicas para *Galleria mellonella* debido a la sobrevivencia de 100% de las larvas estudiadas; esto se debe a que su tamaño es menor a 100nm, la exposición de la superficie específica está relacionada a su forma, que es menor en las esféricas y a la síntesis que es un método biológico exento de productos químicos que pueden afectar su toxicidad(41) (58)

Listeria monocytogenes se considera una bacteria intracelular con múltiples mecanismos involucrados en el proceso infeccioso, su estudio en un modelo animal nuevo permite generar conocimiento aplicable al seguimiento de nuevas moléculas para su tratamiento. La evaluación histológica incluyó la comparación entre el tejido de las larvas sanas, infectadas con *L. monocytogenes* y las que fueron tratadas con las nanopartículas. Las larvas de *Galleria mellonella* que fueron inoculadas con NPsAg, no presentaron ninguna alteración en los tejidos evaluados microscópicamente, lo que llevo a proponer que no se

generó citotoxicidad. Hussaim y col. determinaron que al trabajar NPsAg de *Pandanus odorifer* en 24 ratas albinas Suizas son bastante tolerables en las ratas y las NPs no afecta la función del hígado y el riñón, entonces dicho compuesto es apto como portador de drogas o como adyuvante. (59)

En las larvas infectadas con *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 se generó respuesta inmune, se observó el desplazamiento y aumento de las células al paso de los días de incubación y también se observa la presencia de bacterias dentro del intestino de la larva. La respuesta celular al día 5 no logra su objetivo y la bacteria invasiva causa destrucción del tejido generalizado. En las larvas infectadas y tratadas con la NpsAg 47, se observó el aumento celular principalmente en hemolinfa y la disminución de la infección durante los días 3 y 5, comparado con el tejido de las larvas infectadas, no se observó destrucción tisular y sí una mayor actividad celular. Lo anterior indica que la NPsAg-47 si actúan como biocida y genera mayor protección a la larva.

La acción biocida de NPsAg-47 se evaluó por la tinción de Gram, mediante la presencia de bacilos Gram positivos. Woods y col. y Jiménez y col. proponen la utilización sobre cortes de tejidos de la tinción de Gram, gracias a su poder diferencial y por proporcionar información preliminar valiosa sobre la identificación del agente causal. (60, 61) Se observó la presencia de bacterias en las larvas infectadas durante los 5 días de incubación, pero en las larvas tratadas con NPsAg-47, la infección fue disminuyendo con el paso del tiempo, no observamos bacterias desde el día 3 en intestino y cuerpo graso, pero se mantuvo la presencia en cerebro al día 5. En el estudio realizado por Rodríguez y col. se demostró que el empleo de nanopartículas formadas por polímeros específicos es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), con estos resultados abrieron la puerta a la administración de NPs de forma directa al cerebro para tratar patologías infecciosas del sistema nervioso central. (62)

Por medio del recuento en placa comprobamos la acción del sistema inmune al determinar la disminución de la población bacteriana con el paso de los días, tanto en el cuerpo completo de la larva como en el cuerpo graso. En el día 5 se recuperaron 5000 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* en cuerpo completo y 100 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* en el cuerpo graso, esto debido a que en el cuerpo graso se encuentran concentradas todas las células inmunes periféricas y se sintetizan los péptidos antimicrobianos con actividad lítica junto con la función que cumple cada uno de los hemocitos. (63) Sin embargo al llegar al día 5, el sistema inmune de la larva no logró eliminar por completo las bacterias, por esta razón se llevó a cabo la evaluación de la respuesta celular, llevando a cabo el tratamiento con nanopartículas de plata.

De acuerdo al recuento total de células se observa que *Galleria mellonella* inoculada con *Listeria monocytogenes* presentó los recuentos más bajos al comparar con las larvas de *Galleria mellonella* no inoculadas, demostrando la capacidad que tiene esta bacteria de invadir de manera rápida la larva y las células mononucleadas. Bogus y col. obtuvieron un resultado similar al inocular larvas con *Actinobacillus pleuropneumoniae*, recuentos bajos

de hemocitos y alta tasa de mortalidad de las larvas. (64) Hillyer expone que las células granulares durante el proceso infeccioso son las más abundantes, debido a su función fagocítica que se inicia cuando es reconocido algo extraño y es unido a unas proteínas de membrana plasmática del fagocito y concluye que la población normal de hemocitos, en su gran mayoría está formada por fagocíticos. (63) Wu y col. en un estudio realizado sobre el índice de fagocitosis, encontró los recuentos más altos para las células granulares que para otros tipos, al infectar larvas con *Escherichia coli*, (34). Al comparar el recuento celular de las larvas infectadas y tratadas con las larvas no inoculadas, se observa que no hay una reducción marcada, demostrando la potencialización de la respuesta inmune.

Ayala y col. estudiaron la capacidad infectiva de las bacterias de acuerdo a su rápida capacidad de reproducción y determinó que es afectada por NPsAg, los cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en una forma dependiente del tiempo de exposición. (65) El número de hemocitos que hay en la inoculación de *Galleria mellonella* con *Listeria monocytogenes* y la Nanopartícula de plata, es bastante similar al que tiene *Galleria mellonella* sin inocular, es de esperarse debido a que el sistema inmune y la nanopartícula de plata tiene su tiempo de acción, no se requiere de un prolongado tiempo de exposición para que las nanopartículas de plata tengan actividad, Ayala y col. determinaron que se necesitan al menos 9 horas de acción para lograr eliminar el total de la población de bacterias resistentes a antibióticos. (65)

En las larvas infectadas con *Listeria monocytogenes*, se observa la disminución marcada de las células en el rango del día 0 al día 2 y se observa un mínimo aumento para el día 5 que relacionado con la observación histológica se evidencia destrucción de tejido en toda la larva. Las células granulares fueron las que se observaron en mayor cantidad durante la infección, lo cual según exponen Hillyer es dado debido a su función fagocítica Y Wu, mencionando que son las que se encuentran en mayor cantidad en comparación a los otros tipos. Las larvas que fueron tratadas, al compararlas por días de incubación y frente a las infectadas, se demuestra la acción de las NPs Ag como potenciadores celulares, ya que aumento el numero celular. Ayala, determinó que las bacterias son afectadas por NPsAg, las cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en una forma dependiente del tiempo de exposición mayor.

Por medio del recuento diferencial, se pudo demostrar las características para identificar los cuatro tipo de células inmunes según su tamaño, estas fueron: los plasmocitos son las células más pequeñas, con un diámetro de 8-10 micra, con núcleo excéntrico redondo y lobulado y con una relación núcleo/citoplasma; por otra parte las células granulares miden de 8-12 micras, núcleo excéntrico y nucleolo prominente, citoplasma color azul, y núcleo púrpura oscuro; los esferocitos miden de 10-15 micras, tienen una baja relación núcleo/citoplasma, y orgánulos; por último los oenocitos miden de 12-20 micras, citoplasma homogéneo, vacuolas citoplasmáticas y pequeños gránulos. (34)

Finalmente, Las NPs-Ag, fueron de gran ayuda frente a la destrucción o disminución de la carga bacteriana y proporcionaron una ayuda como agente de amplio espectro, siendo importante su capacidad antibacteriana.

6. CONCLUSIONES

La DL_{50} para la infección de *Galleria mellonella* fue de 1.5×10^7 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 serogrupo 1/2c y de 1.5×10^4 UFC/mL para *Listeria monocytogenes* Clínica.

Galleria mellonella es un modelo animal adecuado para el estudio de microorganismos invasivos como ocurre durante el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes*. La reproducibilidad de la enfermedad a 37°C es una ventaja de este modelo. El seguimiento histológico durante la infección de las larvas permitió ver los daños que produce la invasión en la cabeza, intestino, cuerpo graso y espacio intersticial.

El sistema inmune celular de las larvas es comparativo al sistema de los mamíferos, respondiendo a la infección de *Listeria monocytogenes*. Las NPsAg obtenidas por síntesis verde de *Borojoa patinoa* presentaron una baja toxicidad en el modelo animal.

Las NPsAg sí inhibe el proceso infeccioso de *Listeria monocytogenes* y potencian la respuesta inmune celular en la evaluación in vivo con larvas de *Galleria mellonella*. Se estableció que la mejor es la NPsAg-47 a una concentración de 50 ng/ml. Es necesario seguir estudiando las ventajas y desventajas de utilizar NPsAg para tratar infecciones invasivas como la Listeriosis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Belluco S, Losasso C, Patuzzi I, Rigo L, Conficoni D, Gallochio F, et al. La plata como antibacteriano hacia *Listeria monocytogenes*. . *Frontiers in microbiology*. 2016;7:307.
2. Hof H. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 35. England2003. p. 199-202.
3. Cossart P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect*. 9. France2007. p. 1143-6.
4. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. 2005.
5. Camacho A, Castaño M, Cortes M, Correa D, Olivares M, Pérez T, et al. Evaluación de riesgos *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia.2011. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266069853_EVALUACION_DE_RIESG_OS_DE_Listeria_monocytogenes_EN_QUESO_FRESCO_EN_COLOMBIA.
6. Muñoz A, Chaves J, Rodríguez E, Realpe M. *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: Un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Scielo [Internet]*. 2013; vol.33 no.2. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000200014.
7. Joyce SA, Gahan CG. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology*. 156. England2010. p. 3456-68.
8. Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskas A, Chakraborty T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(1):310-7.
9. Grounta A, Harizanis P, Mylonakis E, Nychas G, Panagou E. Investigación del efecto de diferentes tratamientos con bacterias del ácido láctico en el destino de la infección por *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en *Galleria mellonella* Larvas. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161263.
10. Martinez M, Wiedmann M, Ferguson M, Datta A. Assessment of *Listeria monocytogenes* virulence in the *Galleria mellonella* insect larvae model. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184557.
11. Marini E, Magi G, Ferretti G, Bacchetti T, Giuliani A, Pugnali A, et al. Attenuation of *Listeria monocytogenes* Virulence by *Cannabis sativa* L. Essential Oil. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:293.
12. Padilla L, Peñuela D. Implementación del proceso histológico para el estudio microscópico de larvas de *Galleria mellonella*. Bogotá: Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud; 2017.
13. Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters*. 2014;9(1):373.
14. Flores M. Efecto bactericida de Nanopartículas de plata y desinfectantes sobre bacterias multirresistentes. 2017.
15. Markowska K, Grudniak AM, Milczarek B, Wolska KI. The Effect of Silver Nanoparticles on *Listeria monocytogenes* PCM2191 Peptidoglycan Metabolism and Cell Permeability. *Pol J Microbiol*. 2018;67(3):315-20.

16. Reniere ML, Whiteley AT, Portnoy DA. An In Vivo Selection Identifies *Listeria monocytogenes* Genes Required to Sense the Intracellular Environment and Activate Virulence Factor Expression. *PLOS Pathogens*. 2016;12(7):e1005741.
17. Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol*. 4. England2006. p. 423-34.
18. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(1):286.
19. Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 16. England2018. p. 32-46.
20. NCBI. Taxonomy *Listeria monocytogenes* [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1639&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>].
21. de Noordhout CM, Devleeschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(11):1073-82.
22. Xayarath B, Alonzo F, 3rd, Freitag NE. Identification of a peptide-pheromone that enhances *Listeria monocytogenes* escape from host cell vacuoles. *PLoS Pathog*. 2015;11(3):e1004707.
23. Malet JK, Cossart P, Ribet D. Alteration of epithelial cell lysosomal integrity induced by bacterial cholesterol-dependent cytolysins. *Cell Microbiol*. 2017;19(4).
24. Kuhbacher A, Emmenlauer M, Ramo P, Kafai N, Dehio C, Cossart P, et al. Genome-Wide siRNA Screen Identifies Complementary Signaling Pathways Involved in *Listeria* Infection and Reveals Different Actin Nucleation Mechanisms during *Listeria* Cell Invasion and Actin Comet Tail Formation. *MBio*. 2015;6(3):e00598-15.
25. Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(49):19484-91.
26. Phelps CC, Vadia S, Arnett E, Tan Y, Zhang X, Pathak-Sharma S, et al. Relative Roles of Listeriolysin O, InlA, and InlB in *Listeria monocytogenes* Uptake by Host Cells. *Infect Immun*. 2018;86(10).
27. Alvarez DE, Agaisse H. The Metalloprotease Mpl Supports genus-species id="named-content-1">*Listeria monocytogenes* Dissemination through Resolution of Membrane Protrusions into Vacuoles. *Infection and Immunity*. 2016;84(6):1806.
28. Faralla C, Rizzuto GA, Lowe DE, Kim B, Cooke C, Shioh LR, et al. InlP, a New Virulence Factor with Strong Placental Tropism. *Infect Immun*. 2016;84(12):3584-96.
29. Rodríguez L. Ciclo biológico de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae). 2015.
30. NCBI. Taxonomy *Galleria mellonella* [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>].
31. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012(70):e4392.

32. Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. 2017;10(1):428.
33. Villas I, Llorente M. Ciclo biológico de la polilla grande la cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758). 2006.
34. Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell*. 2016;48(4):297-304.
35. Vargas F, Ortega M. El sistema inmune humoral de los insectos 1994. Available from: <http://www.bashanfoundation.org/contributions/Ortega-A/ortegahumoral.pdf>.
36. Vergara-Gómez A, Toledo-Trejo E. Acción Bactericida de Nanopartículas de Plata Utilizando extractos de Aloe Vera, para una posterior Aplicación en vendajes y parches. *Revista de Simulación y Laboratorio*. 2017;Vol.4 No.11:53-8.
37. Monge M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *Fundación DialNet*. 2009:33-41.
38. Cardoso P. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud 2016. Available from: <http://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2016/04/260-Nanoparti%CC%81culas-de-plata.pdf>.
39. Gómez M. Usos terapéuticos de nanomateriales y nanopartículas. *Revista Repertorio De Medicina Y Cirugía [Internet]*. 2019 Available from: <https://revistas.fucsalud.edu.co/index.php/repertorio/article/view/871>.
40. Flores CY, 2014. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida. *Repositorio institucional de la UNLP*. 2014.
41. Ávalos A, Haza A, Morales P. Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud y el medio ambiente 2013. 1-23 p.
42. Parra S. Implementación y evaluación de los métodos de Conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) 2006. Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/55>.
43. Paez N, Villamarín L. Influencia de las nanopartículas de plata en los procesos infeccioso de *Candida albicans* en *Galleria mellonella*. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2017.
44. Evans C, Clavijo D, Mora H. Estudio de la virulencia de cepas mutantes de *Candida Albicans* en el organismo modelo *Galleria mellonella*. *JÓVENES EN LA CIENCIA*. 2018;vol 4.
45. Loh JM, Adenwalla N, Wiles S, Proft T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*. 2013;4(5):419-28.
46. E A. **Interpretación de las curvas de sobrevivencia**. *Scielo*. 2007;59:75-83.
47. CLSI. M100 Estándares de rendimiento para antimicrobianos Pruebas de susceptibilidad 27 ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
48. Góngora J, Díaz-Roa A, Gaona MA, Cortés-Vecino J, Bello F. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de cuerpos grasos y hemolinfa derivados de la mosca *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae). *Infectio*. 2015;19:3-9.
49. Tango C. Listeriosis *Medlineplus* 2017 [Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001380.htm>].

50. Norrung B, Andersen JK. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 30. England 2000. p. 228-32.
51. Ramírez G, Lara A, García C, Díaz E, Tenorio V. Virulencia de cepas de *Listeria monocytogenes* procedentes de cabras y sus derivados. *Revista mexicana de ciencias pecuarias.* 2014;5:341-55.
52. Camacho A, Castaño M, Cortes M, Correa D, Olivares M, Pérez T, et al. Evaluación de riesgos *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia 2011. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266069853_EVALUACION_DE_RIESGOS_DE_Listeria_monocytogenes_EN_QUESO_FRESCO_EN_COLOMBIA.
53. Gómez M. Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía.* 2018;27(2):75-80.
54. Chauhan N, Tyagi AK, Kumar P, Malik A. Antibacterial Potential of *Jatropha curcas* Synthesized Silver Nanoparticles against Food Borne Pathogens. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:1748.
55. Estevez Posada B. Biosíntesis y caracterización de NPs de Ag con *Eisenhardtia polystachya* (palo azul) y su inhibición sobre el crecimiento de *Clostridium sp* Universidad Autónoma del Estado de México 2017.
56. Santos T. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS EM BACTÉRIAS DA PERIODONTITA CRÔNICA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS 2018.
57. Bravo C. Efecto de las Nanopartículas de plata en la sobrevivencia in vitro del parásito *Perkinsus marinus* y su efecto in vivo en la situación *Crassostrea corteziensis*. . CICESE 2018.
58. Vera A, Farías C, Castañeda F. Síntesis de Nanopartículas Metálicas por Rutas Verdes 2017; 9
59. Hussain A, Alajmi MF, Khan MA, Pervez SA, Ahmed F, Amir S, et al. Biosynthesized Silver Nanoparticle (AgNP) From *Pandanus odorifer* Leaf Extract Exhibits Anti-metastasis and Anti-biofilm Potentials. *Frontiers in microbiology.* 2019;10:8.
60. Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of cytologic and histologic stains. *Clinical microbiology reviews.* 1996;9(3):382-404.
61. Jiménez G, Vélez A. Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *MEDICINA & LABORATORIO.* 2012;18:557-73.
62. Rodríguez M. Nanopartículas funcionalizadas para favorecer su paso por la BHE (II). Facultad de farmacia universidad Complutense. 2016.
63. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* 2016;58:102-18.
64. Boguś MI, Uber ML-, Polańska MA, Mosiewicz M, Włóka E, Sobocińska M. La infección por hongos provoca cambios en el número, morfología y la difusión de la capacidad de *Galleria mellonella* hemocitos 2018. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/phen.12246>.
65. Ayala N. Nanopartículas de plata como microbicidas: actividad y mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. REPOSITORIO ACADÉMICO DIGITAL Universidad Autónoma de Nuevo León. 2010.

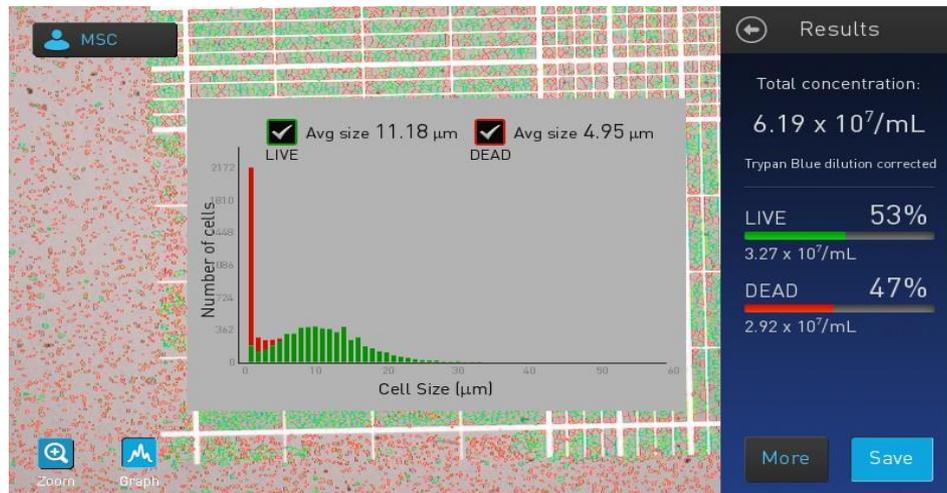
ANEXOS

ANEXO 1. TABLA DE SEGUIMIENTO

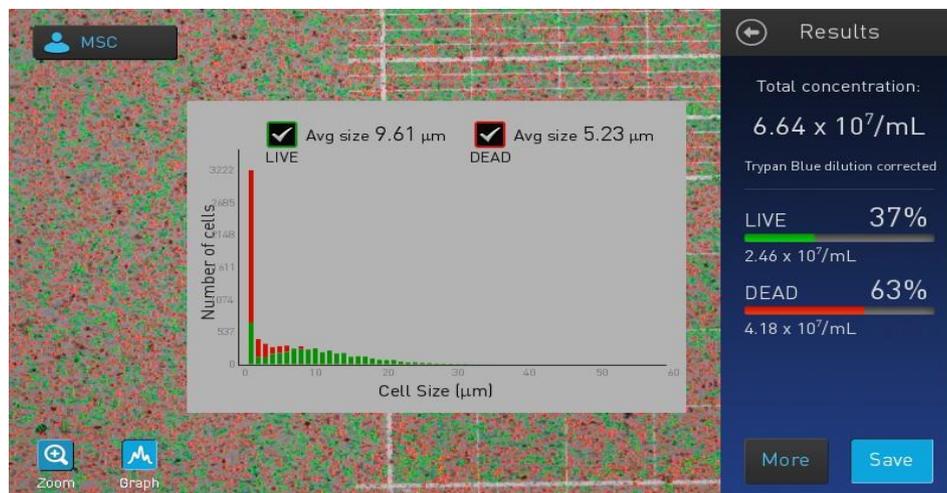
FECHA:						
PROTOCOLO:						
Tabla 4. TABLA DE REGISTRO						
Número de larva	Días	Peso	Actividad	Formación de capullo	Melanización	Supervivencia
1	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
2	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
3	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
4	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
5	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
6	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
7	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
8	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
9	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					
10	1.					
	2.					
	3.					
	4.					
	5.					

ANEXO 2. RESULTADOS DEL RECuento EN EL EQUIPO COUNTESS II FL CELL COUNTER

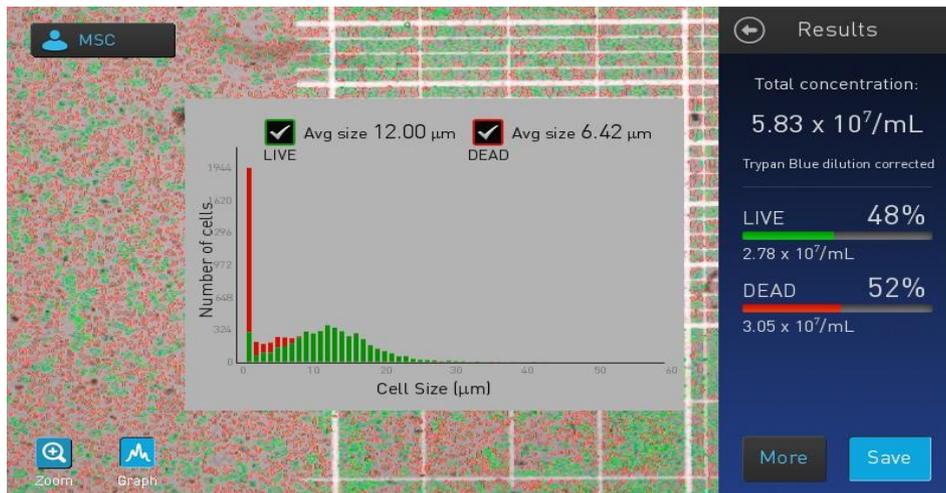
DIA 0



Galleria mellonella sin inocular.

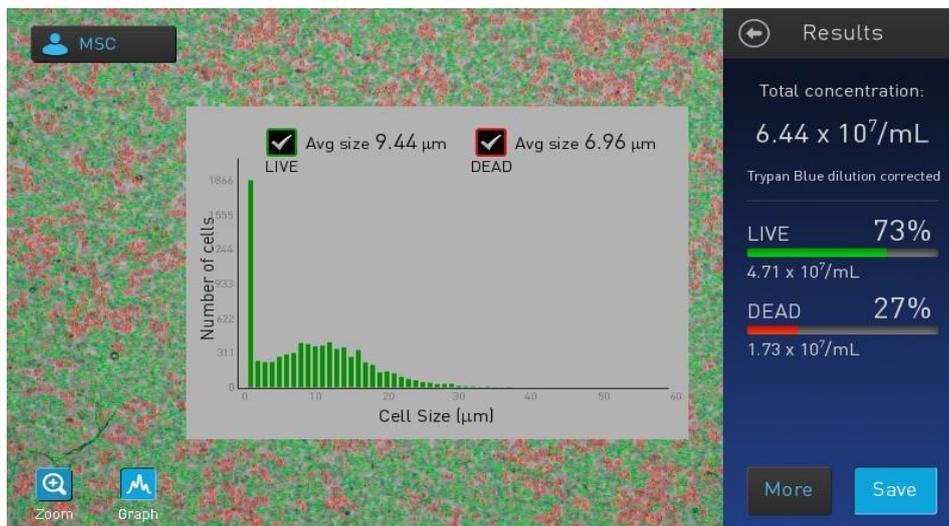


Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC.

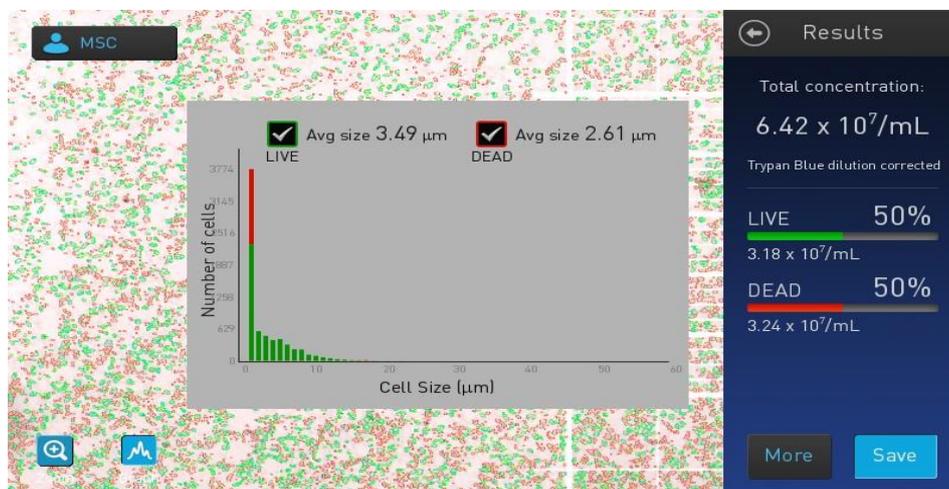


Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC y NPgAg.

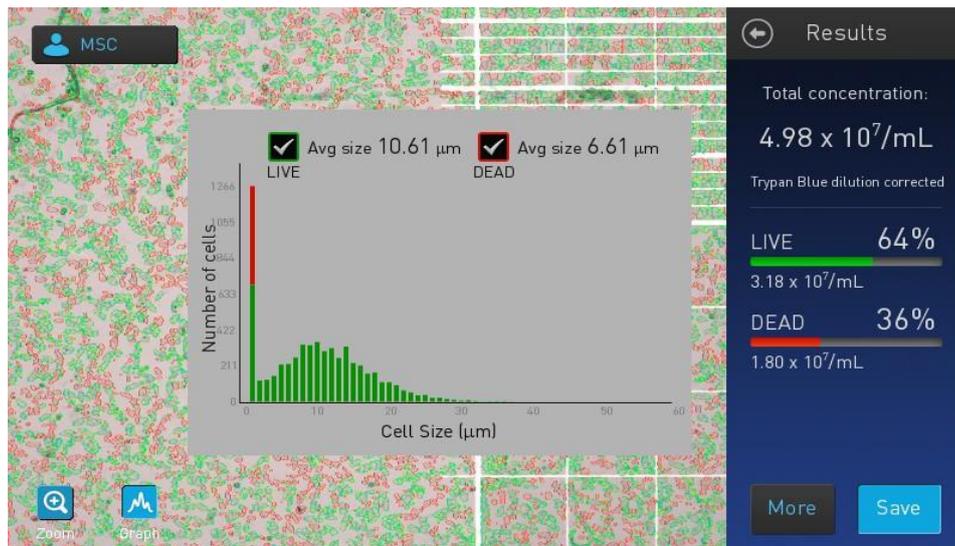
DIA 2



Galleria mellonella sin inocular.

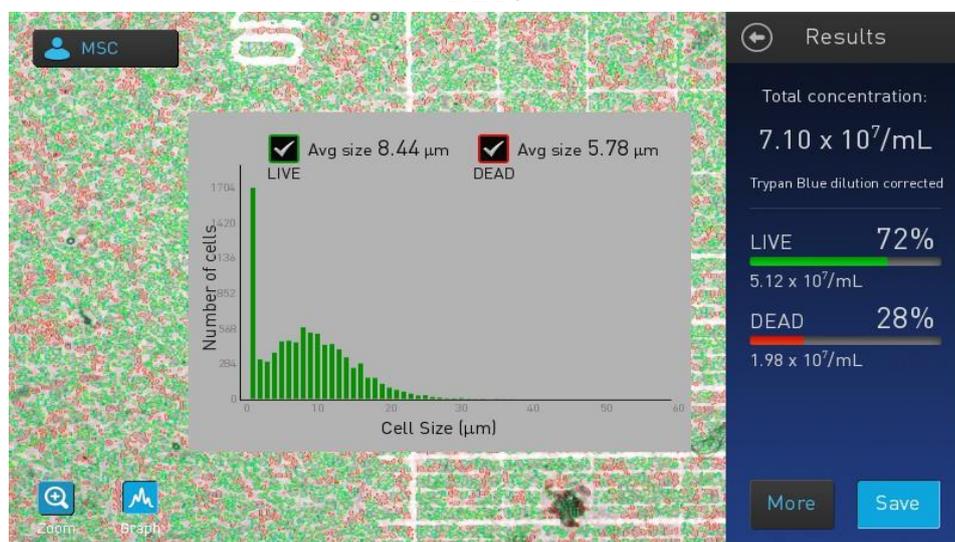


Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC.

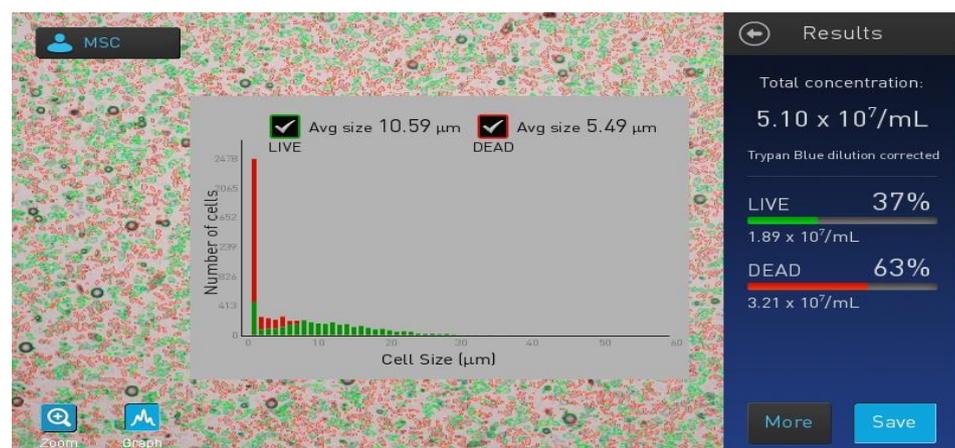


Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC y NPAsg.

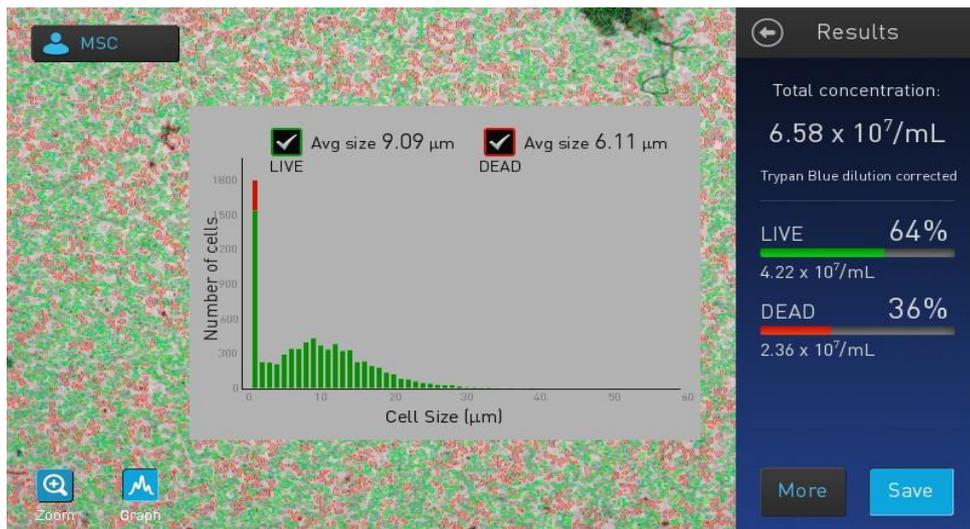
DIA 5



Galleria mellonella sin inocular.



Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC.



Galleria mellonella inoculada con *Listeria monocytogenes* ATCC y NPsAg.