



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
“FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA”**

**EFFECTO DE LA RIBOFLAVINA COMO
FOTOSENSIBILIZADOR ASOCIADO A LUZ
ULTRAVIOLETA (CROSSLINKING) SOBRE
CULTIVOS BACTERIANOS**

TESIS DE POSGRADO

Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta el

DR. FERNANDO LÓPEZ MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS

DR ALBERTO HABER OLGUIN



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Enrique Graue Wiechers

Profesor Titular del Curso

Universidad Nacional Autónoma de México

Dra. Claudia E. Murillo Correa

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Dr Alberto Haber Olguín

Director de Tesis

Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana

Agradecimientos

A mi MADRE por ser un gran ejemplo de lucha, constancia y que la transmite a sus hijos.

A mi PADRE por ser un ejemplo de carácter inteligencia y el motivo de admiración y amor a la oftalmología.

A mis HERMANAS Jessica y Jaz por su cariño, apoyo y consejos.

A mis AMIGOS y a Sandra por su gran apoyo y cariño

AI INSTITUTO CONDE DE VALENCIANA por permitir realizarme en mi formación profesional

A mi tutor Alberto Haber , y asesores por mantener, animar y apoyar esta idea.

A todos mis AMIGOS que apoyaron con el desarrollo de este trabajo.

A todo el personal del Servicio de Laboratorio e Investigación del instituto

INDICE

	Página.
I.- INTRODUCCIÓN.....	4-11
II.- JUSTIFICACIÓN.....	11
III.- OBJETIVOS.....	13
IV.- DISEÑO DEL ESTUDIO.....	13
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	11-14
VI.- METODOLOGÍA	13-14
VII.- RESULTADOS.....	14-22
VIII.- DISCUSIÓN.....	23
IX.- CONCLUSIÓN.....	23
XIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	24-27

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (o *Pseudomonas pyocyanea*) es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar.(1) Es un patógeno oportunista para los humanos así como también para las plantas.(2)

La *P. aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos, como la piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente), y piorubina (rojo pardo). King, Ward, & Raney desarrollaron *Pseudomonas* Agar P (aka King A media) para mejorar la producción de piocianina y piorubina y *Pseudomonas* Agar F (aka King B media) para la fluoresceína.(5)

La *P. aeruginosa* es frecuentemente y preliminarmente identificada por su apariencia perlada y olor suigeneris in vitro. La identificación definitiva clínica de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye identificar la producción de ambas piocianina y fluoresceína como su habilidad de crecer a 42 °C. La *P. aeruginosa* es capaz de crecer en combustible diesel y kerosene, donde se conoce su utilización de un hidrocarburo, causando estragos de corrosión microbiana; y creando una gelatina oscura que a veces inapropiadamente se le llama "alga".

El término *Pseudomona* significa 'falsa unidad', procede del griego pseudo, que significa 'falso', y monas, que significa unidad simple. El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes. *Aeruginosa* es el nombre latino para el cardenillo u 'óxido de cobre'. Esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, visto en los cultivos de laboratorio " de *P. aeruginosa* ". La biosíntesis de piocianina es regulada por mecanismos homeostáticos, como en un biofilme asociada a la colonización de *P. aeruginosa* en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística

Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, *P. aeruginosa* infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones sistémicas. (4) *Pseudomonas* puede causar neumonías a grupos (5), necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios(6). La piocianina es un factor de virulencia y se ha conocido que puede hasta limitar la duplicación de otros microorganismos como es el caso de la bacteria *C. elegans* por estrés oxidativo. Sin embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina (7). Uno en diez hospitales se infectan con *Pseudomonas*. la fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *P. aeruginosa*. Este agente es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua corriente y es el más común agente causante de altas fiebres en infecciones es *P. aeruginosa*.

En vegetales la *P. aeruginosa* induce signos de "podredumbre de raíces" en la *Arabidopsis thaliana* (Thale cress) y *Letuca sativa* (lechuga)(8,9,10,11,12), la asociación de los factores de virulencia son los mismos para vegetales que para animales(8),(15).



Figura 1 Microscopia de escaneo rastrear psedudomona tomada de Iglewski BH *Pseudomonas*. In: Baron's Medical Microbiology

Walker et al han demostrado en 2001 que en la colonización radicular, *P. aeruginosa* forma biofilmes que confieren resistencia contra los antibióticos secretados por las raíces. La raza patógena *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 causa mortalidad de plantas 7 días de postinoculación en *Arabidopsis* y en *Ocimum basilicum*. *P. aeruginosa* forma biofilmes antes de la mortalidad alrededor de las raíces. Ya infectado, las raíces de *Ocimum* secretan ácido rosmarínico, un multifuncional éster del ácido cafeico que exhibe in vitro actividad antibacterial contra células pláctónicas de ambas razas de *P. aeruginosa* con un mínimo de concentración inhibitoria de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Sin embargo, el ácido rosmarínico no produjo niveles de concentración mínimos inhibitorios en exudados de raíces de *Ocimum*, antes de *P. aeruginosa* que forma un biofilme que resiste los efectos microbiales del ácido rosmarínico, y al final causa mortalidad de plantas. La inducción de la secreción de ácido rosmarínico suplementando las raíces y con suplementación exógena de exudados de raíces de *Arabidopsis* con ácido rosmarínico antes de la infección, confiriendo resistencia a *P. aeruginosa*.^[10]

P. aeruginosa es frecuentemente aislada de sitios no estériles (boca, esputo, y demás) y en esas circunstancias, frecuentemente representa una colonización, sin infección. El aislamiento de *P. aeruginosa* de especímenes no estériles debería interpretarse con cautela y el aviso del microbiólogo o el médico infectólogo deberían corroborarse antes del comienzo del tratamiento.

Cuando *P. aeruginosa* es aislada de sitios estériles (sangre, hueso, colecciones profundas), debe tomarse con mucha seriedad y en la mayoría de los casos requiere tratamiento rápido y oportuno .

La *P. aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran cantidad de diferentes familias de antibióticos. Es indispensable usarlos con una guía de tratamiento acorde con los resultados de antibiogramas (sensibilidad de la cepa de *P. aeruginosa* a diferentes potentes antibióticos), más que a elegir determinado antibiótico empíricamente. Si se comienza con un antibiótico genérico empíricamente), hay que realizar lo adecuado para obtener cultivos y elegir el mejor de los resultados bioquímicos, revisando el elegido.

Los antibióticos que han mostrado actividad contra *P. aeruginosa* incluyen:

- Aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina);
- Quinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina pero no moxifloxacina)
- Cefalosporinas (ceftazidima, cefepima, cefpiroma, pero no cefuroxima, ceftriaxona, cefotaxima)
- Ureidopenicilinas (piperacilina, ticarcilina: *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a todas las otras penicilinas)
- Carbapenemos (meropenemo, imipenemo, y no ertapenema)
- Polimixinas (polimixina B, colistina)
- Monobactamos (aztreonam)
- Estos antibióticos deben aplicarse siempre por vía parenteral con la excepción de las fluoroquinolonas. Por esta razón, en algunos hospitales, la fluoroquinolona está severamente restringida para evitar el desarrollo de raza resistentes de *P. aeruginosa*

S. epidermidis

Los estafilococos coagulasa-negativo son las bacterias más comúnmente aisladas en los laboratorios microbiológicos (16). Entre ellos el *S. epidermidis*, que se caracteriza por ser coagulasa negativo y novobiocina sensible, fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un patógeno importante (17) y es considerado el agente causal de múltiples entidades clínicas, entre ellas: Infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis de válvula nativa, bacteremia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmítis después de cirugía ocular, infecciones de dispositivos médicos o cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama)(18).

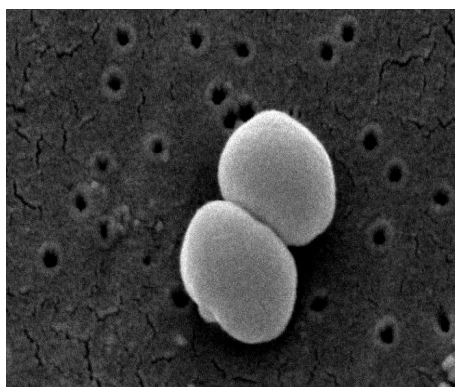


Fig 2 Microscopia por escaneo Rastrer tomada de Iglewski BH . In: Baron's Medical Microbiology Otra característica importante de esta bacteria es la susceptibilidad antimicrobiana que presenta, ya que el *S. epidermidis* ha desarrollado resistencia a la meticilina en forma paralela al desarrollo de resistencia del *S. aureus*, pero mostrando tasas mucho mas elevadas que esta última, y que ha ido incrementándose de manera importante en los últimos 20 años. Mientras que a inicio de los '80s se indicaban tasas de resistencia a la meticilina del 20%, en 1999 estas llegaron al 80% (19). Esta es la razón por la cual en la actualidad se considera que la vancomicina es el tratamiento de elección para las infecciones causadas por este germen (18). Las colonias de la *S. epidermidis* son típicamente pequeñas, blancas o amarillentas, aproximadamente 1-2 milímetros de diámetro después de la incubación de noche. El organismo es sensible al [desferrioxamine](#), y esta prueba se utiliza para distinguirlo casi del resto de los estafilococos. Los [estafilococos](#) hominis, que es también sensible, producen el ácido de [trehalosa](#), así que lo pueden generalmente distinguir de epidermdis.

EFFECTOS UV

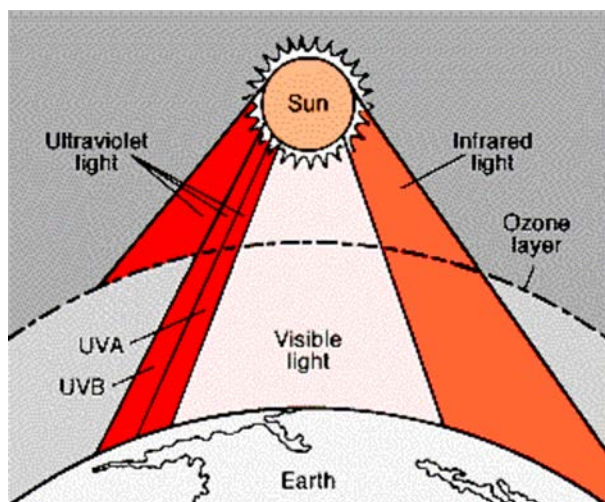


Fig 3 Ilustra la presencia de rx con las diferentes longitudes de onda tomada de Pathak. Sunscreens: Progress and perspectives on photoprotection of human skin against UVB and UVA radiation. J Dermatol 1996; 23:783-800.

El sol emite diversos tipos de radiaciones: rayos X, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta (RUV), luz visible, radiaciones infrarrojas y otras.

Desde el punto de vista fotobiológico el espectro solar en la superficie terrestre (nivel del mar) está formado por radiaciones con longitudes de onda de energía electromagnética comprendida entre 290 y 3000 nm. Y debido a esta gran diversidad, desde el punto de vista de la práctica clínica se considera que el espectro solar está formado por: radiaciones ultravioleta (290-400 nm), luz visible (400-760 nm) y radiaciones infrarrojas (>1800 nm). (20).

La proporción de cada una de las radiaciones es la siguiente:

Proporción y atenuación de las radiaciones incidentes sobre la superficie terrestre.

- 40% luz visible
- 50% radiación infrarroja
- 10% radiación ultravioleta

Aunque el sol emite radiaciones de longitud de onda menores a 290 nm, dichas radiaciones no llegan a la superficie terrestre debido a la selectiva absorción que sufren por parte de las moléculas de ozono y oxígeno molecular presentes en la estratosfera .

Por lo tanto, hay una radiación incidente de elevada energía que se ve atenuada por los componentes de la estratosfera, haciendo que la energía que recibamos sea menor a la inicial.

La mayoría de los efectos perjudiciales para la salud, principalmente sobre la piel, se deben a la acción de la radiación ultravioleta. La luz visible y la radiación infrarroja son generalmente inocuas para el hombre (21). Por convenio, el espectro ultravioleta se subdivide arbitrariamente en tres bandas de mayor a menor longitud de onda. Estas bandas o regiones se denominan UVA, UVB y UVC respectivamente.

La región UVA abarca de los 400 a los 320 nm. Este espectro es el responsable de la reacción de pigmentación de la piel, y de muchos otros efectos como son el fotoenvejecimiento de la piel (elastosis solar) y la fotosensibilización (22).

La banda correspondiente a UVB engloba a las radiaciones comprendidas entre los 320 y 290 nm. Tiene también una marcada acción pigmentógena y es la región responsable de las quemaduras solares; otro efecto importante que se le atribuye es el cáncer cutáneo.

La radiación UVC comprende las longitudes de onda menores a 290 nm (200-290 nm). Esta región es eritematógena, mutagénica y carcinogénica; pero no está presente en la superficie terrestre debido a la filtración producida por la capa de ozono.

Existe una creciente preocupación respecto las radiaciones UVC y UVB, ya que debido a la persistente y continua degradación de la capa de ozono de la estratosfera por parte de los fluorocarbonos, CFCs, etc., se prevé un incremento de los niveles de irradiación sobre la superficie terrestre de estas dos regiones del espectro ultravioleta, así como de los efectos nocivos que estas radiaciones pueden producir sobre la salud (23).

Comparada con la energía UVB, la radiación UVA genera mayor estrés oxidativo. En el conjunto de la radiación solar, la energía UVA es 10 veces más eficiente que

la UVB en la producción de reacciones de peroxidación lipídica. La radiación UVA es más citotóxica que la UVB . La energía UVA daña el DNA mediante la producción de rupturas de cadena y la oxidación de los ácidos nucleicos (24).

Antecedentes (crosslinking)

La biomecánica de la córnea es una disciplina científica que trata del equilibrio y de la deformación del tejido sometido a cualquier fuerza (25). Surge de la conjunción de conocimientos y conceptos físico-matemáticos, arquitectónicos y mecánicos pero también biológicos. Explora la función y estructura de la cornea e intenta establecer bases para predecir su respuesta dinámica ante situaciones fisiológicas y patológicas.

Los conocimientos de las características estructurales y fisiológicas de la córnea (26) junto con el desarrollo de modelos para el estudio de la tonometría (27, 28) constituyen el origen de las bases biomecánicas de la córnea, las que tomarán mayor consistencia y se harán explícitas a lo largo del estudio de una patología, como veremos a continuación. En 1978 los autores Foster y Yamamoto realizan un estudio donde cuestionan si la rigidez corneal se encuentra disminuida en el queratocono (29). En 1980 se publica un trabajo que discute las propiedades biomecánicas de la córnea normal y del queratocono, donde se concluye que una resistencia mecánica disminuida permite la protusión del tejido (30). Posteriormente se establece que el entrecruzamiento de las fibras colágenas se encuentra alterado y disminuido en el queratocono, lo que junto a rupturas en la membrana de Bowman, favorecen la «debilidad» estructural (31). A su vez en un estudio retrospectivo se observó que en personas diabéticas, donde el entrecruzamiento de fibras colágenas está aumentado, disminuye la posibilidad de desarrollar queratocono (32), remarcando la relevancia de la rigidez estructural en el desarrollo de la patología.

CONCEPTOS BÁSICOS SOBRE BIOMECÁNICA DE LA CÓRNEA

Existen diferentes factores que determinan la estabilidad de la córnea y que se pueden definir en extra e intra-corneales . Éstos se conjugan como fuerzas contrapuestas en equilibrio dinámico . Dentro de los factores extra-corneales, el más importante es la presión intraocular que ejerce una fuerza sobre la cara interna de la córnea (33-35). Menos relevante resulta la presión atmosférica que actúa sobre la cara externa, a la que se suman los párpados (34), los músculos extraoculares, (indirectamente a través de sus inserciones esclerales) y el músculo ciliar que durante la acomodación produce un acortamiento del diámetro corneal e induce un cambio de curvatura equivalente a 0,60-0,72 dioptrías (12).

Los factores intra-corneales son los inherentes a la propia estructura corneal, la cual posee la elasticidad y características necesarias para soportar las presiones ejercidas por los factores extra-corneales manteniendo de este modo su curvatura estable y sus cualidades ópticas (26). Esto es debido en parte al espesor corneal, pero sobre todo a la especial disposición, densidad y entrecruzamientos de las fibras colágenas del estroma (36). Éste representa el 90% del espesor corneal y

está compuesto por agua, glicosaminoglicanos y fibrillas de colágeno (300 a 500) dispuestas en láminas, extendidas de limbo a limbo sin interrupción formando una intrincada red (37). Cuando es sometida a compresión o estiramiento, la cornea reorganiza sus láminas e incrementa su elasticidad hasta llegar a un nuevo estado de equilibrio (38,39). Esta red presenta diferencias regionales: las láminas dispuestas oblicuamente a la superficie corneal se entrecruzan más densamente en el tercio estromal anterior que en los dos tercios posteriores, donde se disponen paralelas a la superficie corneal (37-41). Además, el estroma posterior presenta mayor concentración del proteoglicano queratán sulfato (más hidrofílico) y el estroma anterior presenta mayor concentración del proteoglicano dermatán sulfato (menos hidrofílico) (37). Por las diferencias estructurales, se postula que fundamentalmente el tercio estromal anterior es quien determina la estabilidad de la curvatura corneal y experimentalmente se ha demostrado que éste presenta mayor resistencia al edema, sosteniendo al resto de la estructura, en parte por la presencia de la membrana de Bowman (41).

La función de la membrana de Bowman es también discutida (42), pero se sostiene que la misma es importante para mantener la estabilidad de la curvatura de la cornea, lo cual se observa en trabajos experimentales (19,20). Aunque esto se contrapone con la experiencia clínica, donde la mayoría de las personas operadas de queratotomía fotorrefractiva (PRK) (en quienes la membrana de Bowman fue ablacionada) no derivan normalmente en ectasias corneales.

Otras formas actuales de modificar la estructura corneal sin debilitarla, induciendo también cambios refractivos se puede lograr mediante la introducción de segmentos intraestromales, queratoplastia conductiva o a través del tratamiento de la cornea con luz ultravioleta (UVA).

Mediante la colocación de segmentos intra-estromales (INTACS, Anillos de Ferrara) se produce un incremento periférico del espesor corneal y se induce un aplanamiento central que posibilita la corrección de miopías bajas (18-19), aunque los anillos de Ferrara según su grosor se postula que pueden llegar a corregir hasta 12 dioptrías (18). Estabilizan y aumentan la rigidez de la estructura corneal, por lo que pueden demorar la progresión del queratocono y las ectasias postquirúrgicas (18) remarcando que el efecto biomecánico posiblemente será mayor en córneas adelgazadas (43).

La queratoplastia conductiva es una técnica basada en la emisión de radiofrecuencia para la corrección de la hipermetropía (leve-moderada), que produce un aumento homogéneo de la temperatura en un área establecida del estroma corneal periférico, induciendo la contracción de las fibras colágenas y una respuesta biomecánica con aplanamiento corneal periférico y elevación central que derivan en la modificación de la refracción (44).

Como se ha mencionado anteriormente, con respecto a la biomecánica no sólo es importante el espesor corneal sino también las características de su estructura interna, especialmente la densidad y entrecruzamiento de fibras colágenas.

No es posible aumentar la densidad de fibras colágenas pero si su entrecruzamiento, mejorando las propiedades biomecánicas del tejido. Este fenómeno observado en el envejecimiento (45) y en pacientes diabéticos (32), procesos donde aumenta el entrecruzamiento de fibras colágenas, también puede lograrse al tratar la cornea con riboflavina (como sustancia fotosensibilizante) y su posterior exposición a luz UVA (a una distancia y tiempo determinado), tratamiento que parece no ser tóxico para el resto de las estructuras oculares (46-47-48).

También se ha demostrado que además de aumentar el entrecruzamiento, aumenta el diámetro de las fibras de colágeno (datos experimentales), resultando un factor más para mejorar la estabilidad de la estructura corneal (49).

El efecto del tratamiento se ha probado clínicamente en un estudio prospectivo, abierto, en pacientes con queratocono, con un seguimiento de hasta 4 años, donde se observa que detiene la evolución de la enfermedad (49). Este tratamiento también podría resultar eficaz para las ectasias post-quirúrgicas e incluso como coadyuvante en cirugías refractivas corneales, para reforzar la estabilidad corneal (49).

JUSTIFICACION:

La utilización de riboflavina como fotosensibilizador aunado al uso de luz ultravioleta constituye la primera aproximación para aumentar la estabilidad corneal , la cual se puede ver alterada de múltiples formas , como lo es la cirugía refractiva , el queratocono entre otras , por esta razón la creciente utilización de este recurso nos atrae a encontrar nuevas aplicaciones en el área oftalmológica , como lo es la cualidad esterilizadora que presenta la luz UV mas substancias fotosensibilizadoras para su potencial utilización en procesos infecciosos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la aplicación de luz ultravioleta mas fotosensibilizadores es capaz de inhibir la replicación bacteriana in Vitro bajo diversas circunstancias .

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar la inhibición en la replicación bacteriana in Vitro en la zona de incidencia de la luz ultravioleta en condiciones similares a las descritas para el tratamiento crosslinking .

DISEÑO

Experimental

HIPÓTESIS :

La luz ultravioleta emitida mediante la lámpara de crosslinking UVX asociado al uso de riboflavina como fotosensibilizador posee cualidades esterilizantes sobre cultivos bacterianos .

HIPOSTESIS ALTERNA

La luz ultravioleta emitida mediante la lámpara de crosslinking UVX asociado al uso de riboflavina como fotosensibilizador no posee cualidades esterilizantes sobre cultivos bacterianos .

MATERIAL Y METODOS

8 cajas de petri en las cuales se realizo cultivo en 4 para pseudomona a y 4 para s epidermidis. fig A

1ml el cual contenía 5000 unidades formadoras de colonias para pseudomona a y otro para s epidermidis.

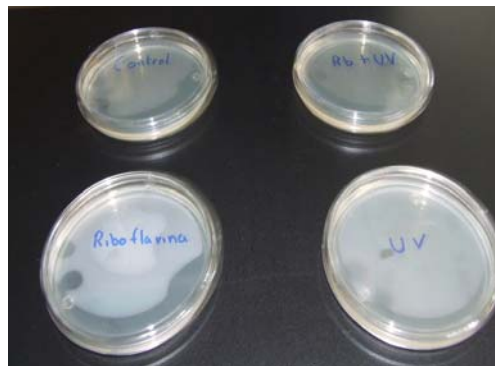
Riboflavina 0.1% diluido en dextrán al 20 %

Lampara de cross linking (UVX) Cross-linking

Las características y especificaciones de la lámpara de luz ultravioleta son las siguientes :

340 nm de longitud de onda

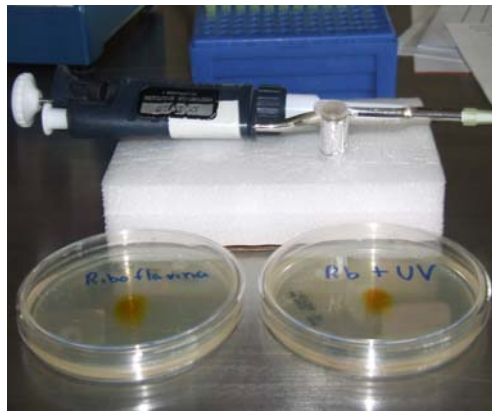
30 minutos de aplicación continua a 5 cm de distancia de los cultivos .



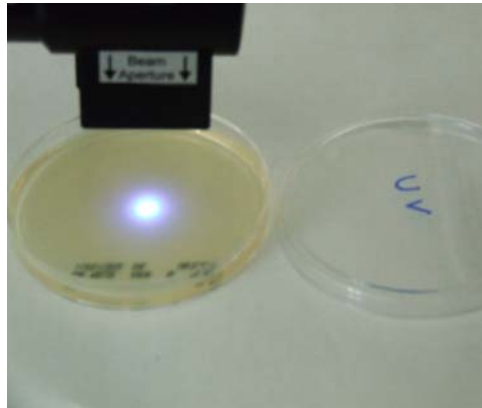
A: Cajas de Petri



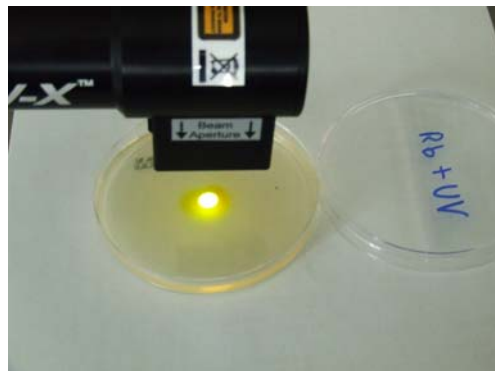
B: Lampara de crosslinking con filtro calibrador



C : Riboflavina



D:Luz ultravioleta incidiendo en cultivo bacteriano



E : luz ultravioleta con riboflavina incidiendo en cultivo

Figura 4 Nos muestra los materiales que se utilizan en el estudio. Cajas de cultivo 1, cross-linking con su calibrador de uv, micropipeta y riboflavina 3 y forma en la que se aplica los uv 4, rayos uv +riboflavina 5

MÉTODOS :

Cultivo en caja de petri con cepa correspondiente a *S. epidermidis* con dilución de 1ml para 5000 UFC diluida en la superficie del medio el cual se constituyo con agar sal y manitol.

Se utilizaron 4 cajas de petri con el cultivo antes descrito , a las cuales se les sometió a las siguientes condiciones:

1.- Cultivo control en el que se incubo a 36 grados c , y al cual no se le aplico luz ultravioleta ni riboflavina (cultivo control).

2.-Cultivo el cual fue sometido en una área especifica de su superficie central a riboflavina al 1 % diluida en dextrán al 20 % aplicándolo cada 5 minutos posteriores a las 4 horas de cultivo durante 30 minutos .

3.- Cultivo el cual fue sometido a la incidencia de la luz ultravioleta proyectada mediante la lámpara UVX a 5 cm de distancia en la parte central de la caja de petri sobre el agar , 4 horas después de su cultivo, utilizando 4.5 mm de diámetro correspondiente al tipo s del dispositivo.

4.-Cultivo el cual fue sometido en una área especifica de su superficie central a riboflavina al 1 % diluida en dextrán al 20 % aplicándolo cada 5 minutos posteriores a las 4 horas de cultivo durante 30 minutos con la incidencia de luz ultravioleta proyectada mediante lámpara UVX a 5 centímetros de distancia previa calibración del aparato usándose un diámetro de 4.5 mm que corresponde al tipo s del dispositivo.

Cultivo en caja de petri con cepa correspondiente a *P. aeruginosa* con dilución de 1ml para 5000 UFC diluida en la superficie del medio el cual se constituyo con agar sal y manitol.

Se utilizaron 4 cajas de petri con el cultivo antes descrito , a las cuales se les sometió a las siguientes condiciones:

1.- Cultivo control en el que se incubo a 36 grados c , y al cual no se le aplico luz ultravioleta ni riboflavina (cultivo control).

2.-Cultivo el cual fue sometido en una área especifica de su superficie central a riboflavina al 1 % diluida en dextrán al 20 % aplicándolo cada 5 minutos posteriores a las 4 horas de cultivo durante 30 minutos .

3.- Cultivo el cual fue sometido a la incidencia de la luz ultravioleta proyectada mediante la lámpara UVX a 5 cm de distancia en la parte central de la caja de petri sobre el agar , 4 horas después de su cultivo, utilizando 4.5 mm de diámetro correspondiente al tipo s del dispositivo.

4.-Cultivo el cual fue sometido en una área especifica de su superficie central a riboflavina al 1 % diluida en dextrán al 20 % aplicándolo cada 5 minutos posteriores a las 4 horas de cultivo durante 30 minutos con la incidencia de luz

ultravioleta proyectada mediante lámpara UVX a 5 centímetros de distancia previa calibración del aparato usándose un diámetro de 4.5 mm que corresponde al tipo s del dispositivo.

Para cada caja de petri con cultivo en cada una de las circunstancias antes descritas se marco con un plumón indeleble la zona central (en la parte posterior), la cual coincidió con la incidencia de la luz ultravioleta o bien con la instilación de la riboflavina en esa zona .

Posteriormente se analizaron las características macroscópicas del cultivo a las 24 , 72 hrs y 7 días , llevando un control fotográfico del mismo .

Resultados:






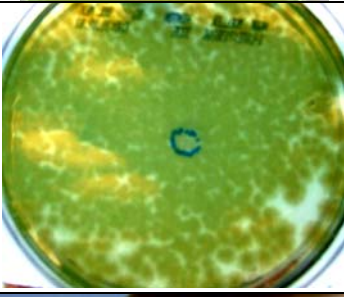


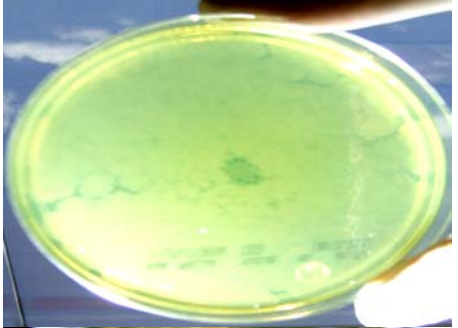
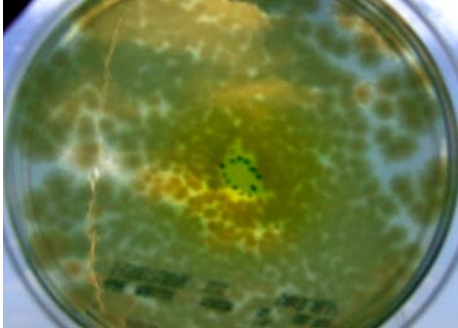
	Gram +						Gram -					
	Incidencia luminica			No Incidencia luminica			Incidencia luminica			No Incidencia luminica		
	24 hrs	72 hrs	7 días	24 hrs	72 hrs	7 días	24 hrs	72 hrs	7 días	24 hrs	72 hrs	7 días
Control	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Riboflavina	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
UV	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí
Cross-linking Riboflavina + UV	no	no	no	sí	sí	sí	no	no	no	sí	sí	sí

Si = crecimiento bacteriano

No = Inhibición evidente de crecimiento .

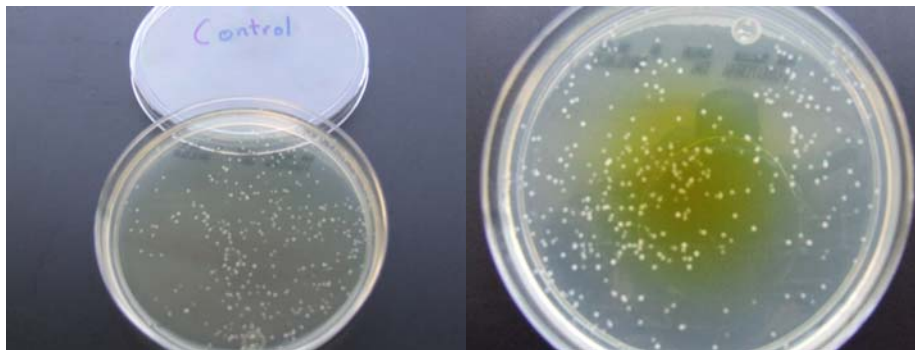
En base a los resultados antes descritos se confirma la hipótesis formulada.

Control Fotográfico

	GRAM (+)	GRAM (-)
CONTROL		
RIBOFLAVINA		
UV		
RB +UV	 	 

CUADRO DE RESULTADOS: Podemos observar a manera de resumen que en los cultivos de control (C) , riboflavina (R) , aplicación de uv (UV), se tiene crecimiento bacteriano mientras que en el de riboflavina + ultravioleta (RB+UV)hay ausencia de crecimiento en la zona de influencia.

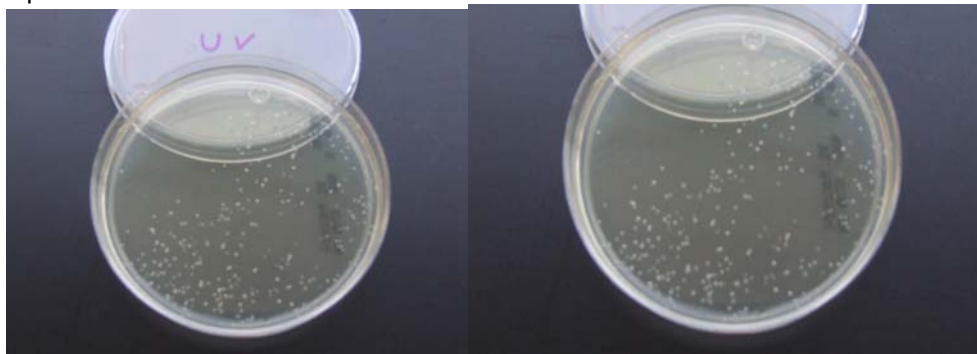
GRAM +



CONTROL A LAS 24 HRS

RB A LAS 24 HRS

Figura 5 Nos muestra el cultivo de gram + a las 24 hrs del control y de RB fotografia tomada para este protocolo



UV LAS 24 HRS

Figura 6 Nos muestra el cultivo de gram + a las 24 hrs en el que solo se aplico UV fotografia tomada para este protocolo

RB + UV A LAS 24 HRS

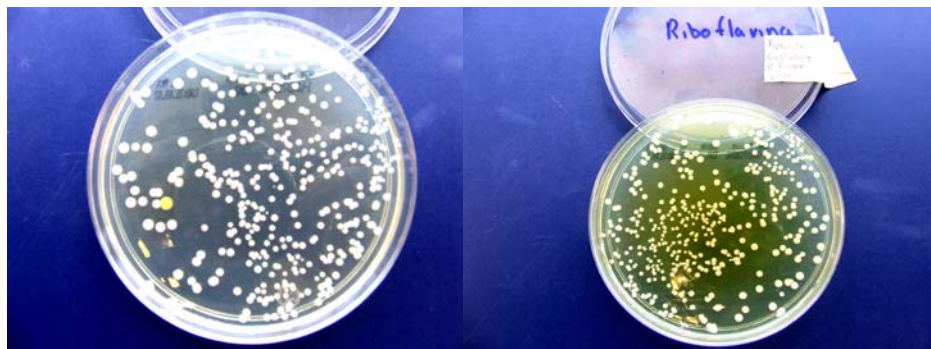




RB + UV A LAS 24 HRS

Figura 7 Nos muestra el cultivo de gram + a las 24 hrs RB + UV en donde se inhibe el crecimiento bacteriano en la zona de tx fotografia tomada para este protocolo

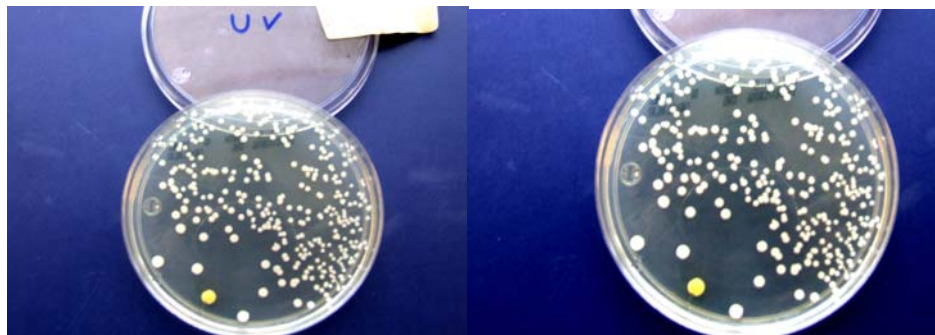
72 HRS GRAM +



CONTROL

RB

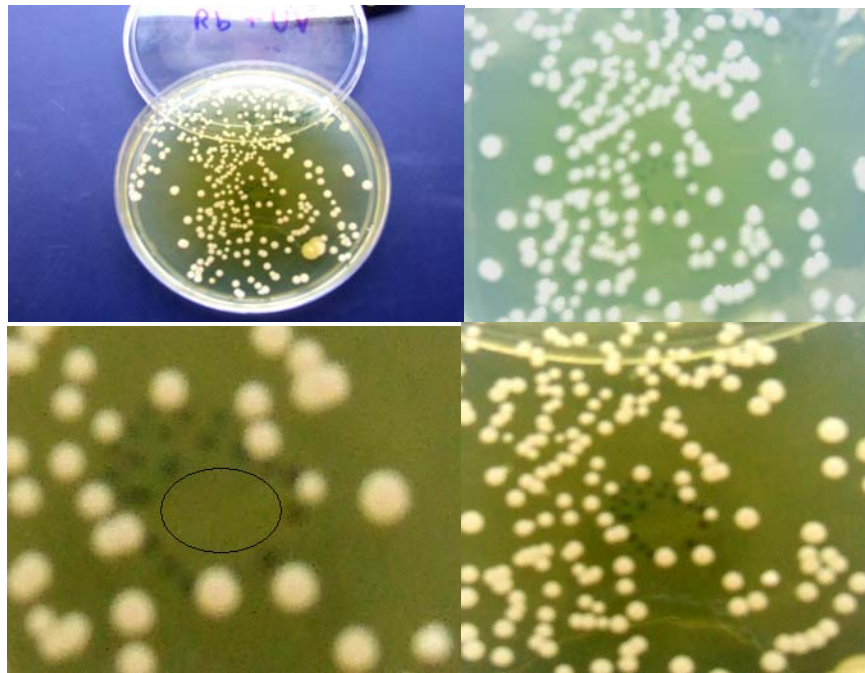
Figura 8 Nos muestra el cultivo de gram + a las 72 hrs de Control 1 y riboflavina 2 fotografia tomada para este protocolo



UV

UV

Figura 9 Nos muestra el cultivo de gram + a las 72 hrs de solo aplicación UV fotografia tomada para este protocolo



CROSS LINKING RB + UV

Figura 10 Nos muestra el cultivo de gram + a las 72 hrs en donde se aplico CROSS LINKING RB + UV. Y podemos observar claramente la inhibición del crecimiento bacteriano en la zona del tratamiento. Fotografía tomada para este protocolo

BAJO MICROSCOPIO CON PODER DE 4 X
POR DENTRO DEL LIMITE DE APLICACION DE TX MARCADO CON PTO
AZUL NO HAY EVIDENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO



Figura 11 Bajo microscopio con poder de 4 X por dentro del limite de aplicacion de tx marcado con pto azul no hay evidencia de crecimiento bacteriano. Fotografía tomada para este protocolo

POR FUERA DE LA ZONA DE TX INMEDIATAMENTE ENCONTRAMOS LAS COLONIAS DE S EPIDERMIDIS

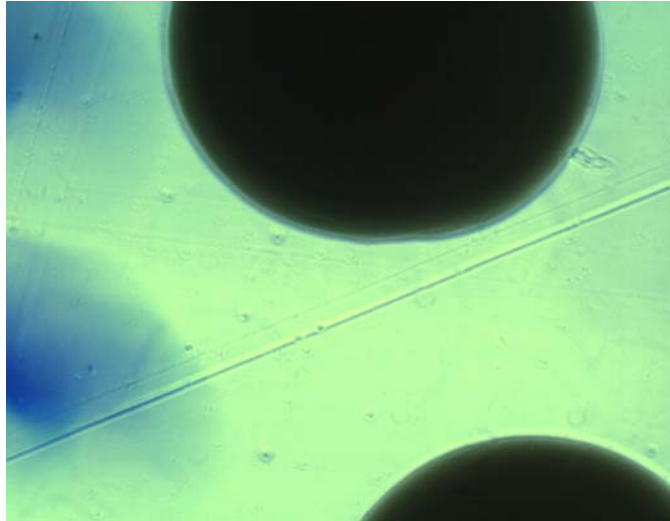


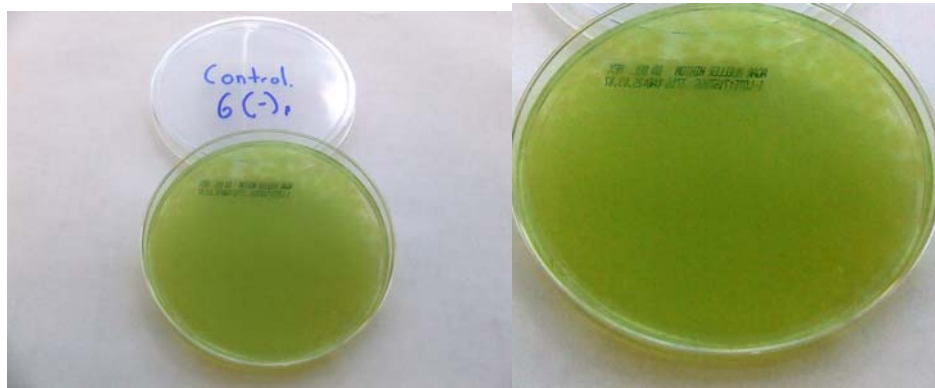
Figura 12 Bajo microscopio con poder de 4 X por fuera de la zona de tx inmediatamente encontramos las colonias de S Epidermidis. Fotografia tomada para este protocolo

GRAM -



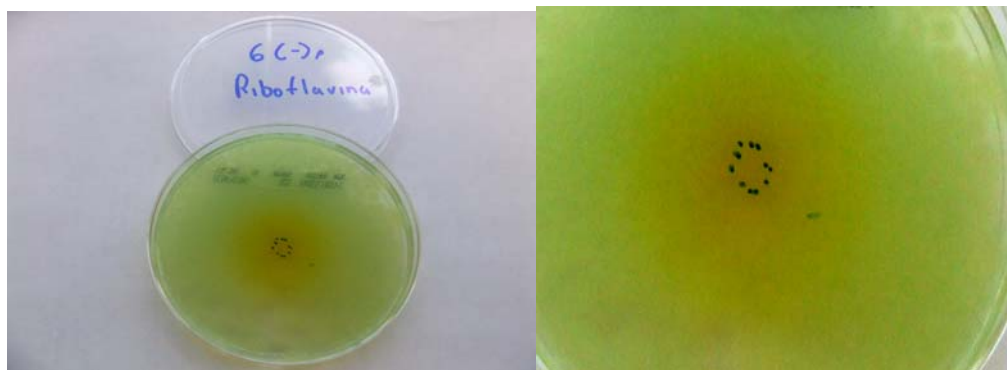
Figura 13 se calibra el Crosslinking y se aplica la RB en las 2 cajas con micropipeta 5 microlitros cada 10 min Fotografia tomada para este protocolo

24 hrs



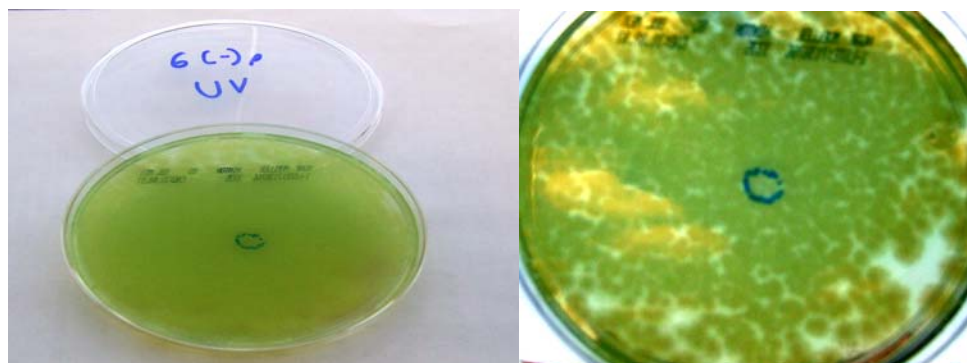
CONTROL

Figura 14 Cultivo de control gram - a las 24 hrs en donde encontramos crecimiento por toda la caja . Fotografia tomada para este protocolo



RB 24 HRS

Figura 15 Cultivo con RB Gram - a las 24 hrs. De igual forma vemos la presencia de crecimiento en toda la caja. Fotografia tomada para este protocolo

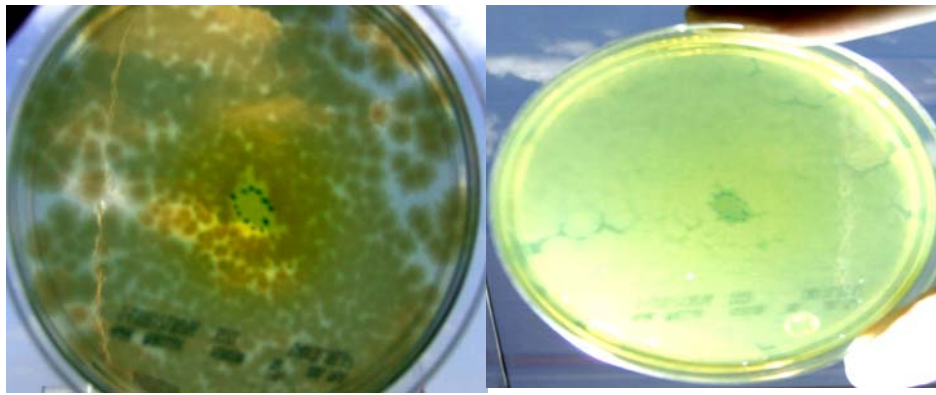


UV 24 HRS

Figura 16 Cultivo con UV Gram - a las 24 hrs. De igual forma vemos la presencia de crecimiento en toda la caja. Fotografia tomada para este protocolo

SIN FLASH

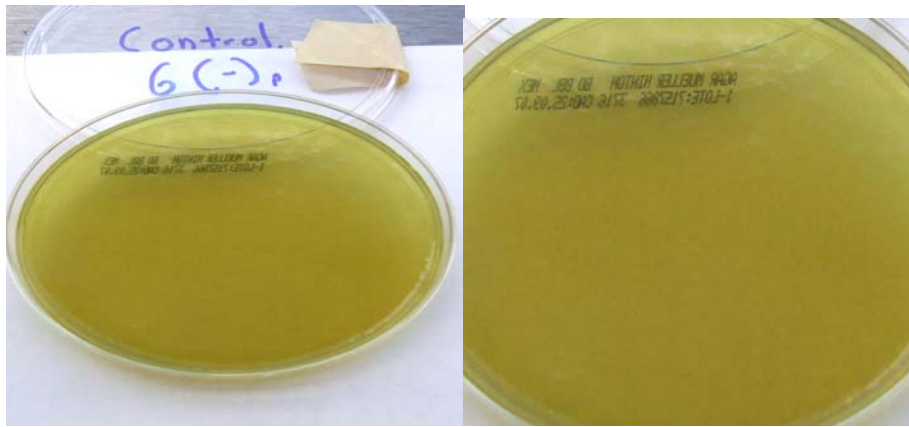
CON FLASH



CROSS-LINKING RB +UV 24 hrs

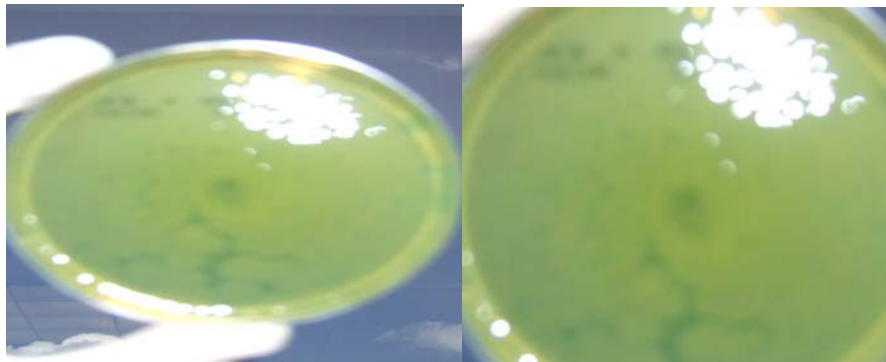
Figura 17 Cultivo con CROSS-LINKING RB+ UV Gram - a las 24 hrs. En donde justo en la zona de tratamiento vemos la inhibición del crecimiento bacteriano . Fotografía tomada para este protocolo

G- 72 HRS



CONTROL G(-) 72 HRS

Figura 18 Cultivo Control Gram - a las 72 hrs. En donde vemos crecimiento en toda la caja . Fotografía tomada para este protocolo



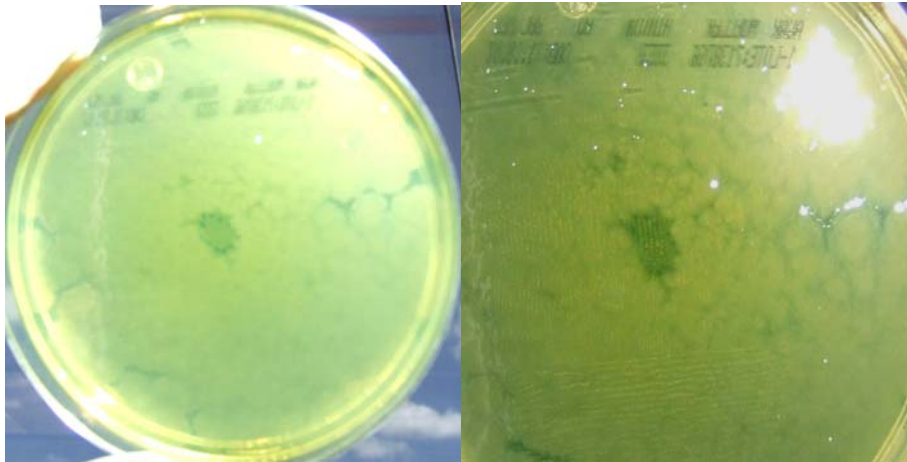
RB 72 HRS DISMINUIDO PERO HAY CRECIMIENTO BACTERIANO

Figura 19 Cultivo en el que aplico RB 72 hrs disminuido pero hay crecimiento bacteriano.
Fotografía tomada para este protocolo



UV 72

Figura 20 Cultivo en el que aplico UV 72 hrs Vemos el crecimiento bacteriano en toda la caja
Fotografía tomada para este protocolo



CROSS-LINKING RB + UV 72 HRS

Figura 21 Cultivo en el que aplico CROSS-LINKING RB + UV 72 HRS Podemos ver la inhibición del crecimiento en la zona de tx. Fotografía tomada para este protocolo

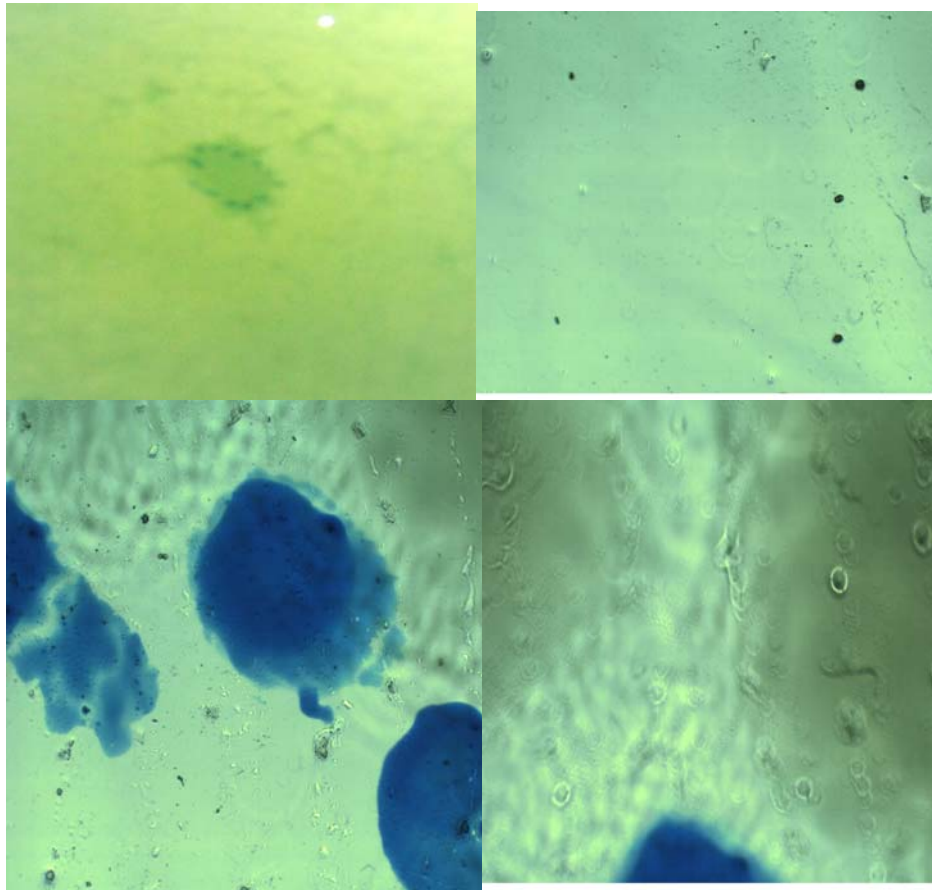


Figura 22 en la imagen de cuadrante superior izquierdo vemos marcada de manera tenue la zona del tx. Bajo microscopio poder 4 ;por dentro de la marca (punto azul) que delimita la zona de tratamiento no hay evidencia de crecimiento bacteriano como lo muestra la imagen a su derecha con objetivo de 4 X en la inferior izquierda vemos la zona de transición por dentro es decir inferior sin crecimiento y por fuera inmediatamente con el crecimiento bacteriano.

DISCUSIÓN

La reciente incorporación de la luz ultravioleta aunado al uso de fotosensibilizadores para aumentar los enlaces cruzados de colagena (crosslinking) con el fin de aumentar la resitencia corenal , constituye la primera aproximación a un tratamiento molecular de una patología estructural .

Por este motivo la utilización de este dispositivo sera cada vez mas difundida en nuestro medio , sin embargo algunas cualidades de la luz ultravioleta , como lo es su potencial efecto esterilizador , nos atrae a explorar posibles nuevas aplicaciones en la terapeutica de procesos infecciosos. La cualidad esterilizadora de los rayos ultravioletas es bien conocida y utilizada en la industria y en la medicina en multiples areas , por lo que nos es de interes saber si bajo las

condiciones para las cuales se diseñó el equipo puede contener también propiedades esterilizantes .

Los rayos UVC que comprenden las longitudes de onda menores a 290 nm (200-290 nm) en este rango es eritematogena, mutagénica carcinogénica daña el DNA mediante la producción de rupturas de cadena y la oxidación de los ácidos nucleicos (24).

Los resultados del presente estudio expulsaron una inhibición del crecimiento en los cultivos tanto para gram positivos como para gram negativos en la zona de incidencia de la luz ultravioleta unicamente cuando se asocio al uso de riboflavina , siendo esto un dato de interes considerando que la luz ultravioleta por si sola no genero inhibición alguna asi como tampoco la riboflavina por si misma .

Este estudio proyecta una serie de posibilidades ulteriores para la utilización de fotosensibilizadores mas luz ultravioleta en el tratamiento de procesos infiltrativos infecciosos corneales siendo posiblemente este tejido el unico en el que tenga aplicación dada su transparencia .

CONCLUSIÓN

El Cross-linking (Riboflavina + UV) resulto eficaz en la esterilización in Vitro en cepas bacterianas Gram + y Gram -

BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
- 2) Iglewski BH (1996). Pseudomonas. In: Baron's Medical Microbiology (Barron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0-9631172-1-1.
- 3) King EO, Ward MK, Raney DE (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.". J Lab Clin Med 44 (2): 301-7. PMID 13184240.
- 4) Todar's Online Textbook of Bacteriology
- 5) Fine et al, JAMA 1996: 275: 134
- 6) Diekema DJ et al. Clin Infect Dis 1999;29:595
- 7) Prithiviraj B, Bais H, Weir T, Suresh B, Najarro E, Dayakar B, Schweizer H, Vivanco J (2005). "Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans.". Infect Immun 73 (9): 5319-28. PMID 16113247.
- 8) Rahme, L., E. Stevens, S. Wolfort, J. Shao, R. Tompkins, and F. M. Ausubel. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268:1899-1902
- 9) Rahme, L. G., M-W. Tan, L. Le, S. M. Wong, R. G. Tompkins, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel, 1997, Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13245-13250
- 10) Walker, T. S., H. P. Bais, E. Déziel, H. P. Schweizer, L. G. Rahme, R. Fall, and J. M. Vivanco. 2004. Pseudomonas aeruginosa-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol. 134:320-331
- 11) Mahajan-Miklos, S., M. W. Tan, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model. Cell 96:47-56
- 12) Martinez, C., E. Pons, G. Prats, and J. Leon. 2004. Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. Plant J. 37:209-217
- 13) D'Argenio, D. A., L. A. Gallagher, C. A. Berg, and C. Manoil. 2001. Drosophila as a model host for Pseudomonas aeruginosa infection. J. Bacteriol. 183:1466-1471
- 14) Miyata, S., M. Casey, D. W. Frank, F. M. Ausubel, and E. Drenkard.,2003, Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Infect. Immun. 71:2404-2413
- 15) Rahme, L. G., F. M. Ausubel, H. Cao, E. Drenkard, B. C. Goumnerov, G. W. Lau, S. Mahajan-Miklos, J. Plotnikova, M. W. Tan, J. Tsongalis, C. L. Walendziewicz, and R. G. Tompkins, 2000, Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8815-8821

- 16) Weinstein M, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 9:582-602.
- 17) Von Eiff C, Proctor RA, Peters G. Coagulase-negative staphylococci: pathogens have major role in nosocomial infections. *Postgrad Med* 2001; 110: 63-76.
- 18) Acher G. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. Churchill Livingstone 2000, 2092 .
- 19) Del Alamo L, Cereda RF, Tosin I, Miranda EA, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:185-91.
- 20) Pathak. Sunscreens: Progress and perspectives on photoprotection of human skin against UVB and UVA radiation. *J Dermatol* 1996; 23:783-800.
- 21) Ribera Pibernat, Paradelo García C. El sol y la piel: fotoprotección y filtros solares. *Med Integral* 1997; 30(2): 64-71.
- 22) Gilchrist BA; Tang A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *Journal of Dermatol Sci* 1996; 11(1): 41-50.
- 23) Amron DM, Moy RL. Stratospheric ozone depletion and its relationship to skin cancer. *J Dermatol Surg Oncol* 1991; 17:370-372.
- 24) Wenczl E, Pool S, Timmerman AJ, Vanderschans GP, Roza L, Schothorst AA. Physiological doses of ultraviolet irradiation induce DNA strand breaks in cultured human melanocytes, as detected by means of an immunochemical assay. *Photochem Photobiol* 1997;66:826-30.
- 25) Fung YC. Biomechanics: The mechanical properties of living tissues. New York: Springer-Verlag; 1981; 221.
- 26) Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136: 263-286.
- 27) Maurice DM. An aplanation tonometer of new principle. *Br J Ophthalmol* 1951; 35: 178-182.
- 28) Mow CC. A theoretical model of the cornea for use in studies of tonometry. *Bull Math Biophys* 1968; 30: 437-453.
- 29) Foster CS, Yamamoto GK. Ocular rigidity in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 1978; 86: 802-806.
- 30) Andreassen TT, Simonsen AH, Oxlund H. Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1980; 31: 435-441.
- 31) Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 1998; 42: 297-319.

- 32) Pinheiro MN Jr, Bryant MR, Tayyanipour R, Nassaralla BA, Wee WR, McDonnell PJ. Corneal integrity after refractive surgery. Effects of radial keratotomy and mini-radial keratotomy. *Ophthalmology* 1995; 102: 297-301.
- 33) Comaish IF, Lawless MA. Progressive post-LASIK keratectasia: biomechanical instability of chronic disease process? *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 2206-2213.
- 34) Wang JQ, Zeng YJ, Li XY. Influence of some operational variables on the radial keratotomy operation. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 651-653.
- 35) Yasuda A, Yamaguchi T, Ohkoshi K. Changes in corneal curvature in accommodation. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1297-1301.
- 36) Meek KM, Blamires T, Elliott GF, Gyi TJ, Nave C. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr Eye Res* 1987; 6: 841-846.
- 37) Pepose JS, Ubels JL. La Cornea. In: Hart WM. *Adler Fisiología del Ojo*. IX ed. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994; 35-40.
- 38) Shin TJ, Vito RP, Johnson LW, McCarey BE. The distribution of strain in the human cornea. *J Biomech* 1997; 30: 497-503.
- 39) Jayasuriya AC, Ghosh S, Schneinbeim JI, Lubkin V, Bennett G, Kramer P. Study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. *Biosens Bioelectron* 2003; 18: 381-387.
- 40) Boote C, Dennis S, Newton RH, Puri H, Meek KM. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2941-2948.
- 41) Muller LJ, Pels E, Vrensen GF. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 437-443.
- 42) Siganos D, Ferrara P, Chatzinikolas K, Bessis N, Papastergiou G. Ferrara intrastromal corneal rings for the correction of keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 1947-1951.
- 43) Colin J, Velou S. Current surgical options for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 379-386.
- 44) McDonal MB, Hersh PS, Manche EE, Maloney RK, Davidorf J, Sabry M, et al. Conductive keratoplasty for the correction of low to moderate hyperopia: U.S. clinical trial 1-year results on 355 eyes. *Ophthalmology* 2002; 109: 1978-1989.
- 45) Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P. Collagen fibrils in the human corneal stroma: structure and aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 644-648.
- 46) Spoerl E, Huhle M, Seiler T. Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res* 1998; 66: 97-103.
- 47) Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1780-1785.

48) Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Ribflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2003; 135: 620-627.

49) Wollensak G, Wilsch M, Spoerl E, Seiler T. Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea* 2004; 23: 503-507.