

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA REDUCIR LA
CARGA BACTERIANA EN EL FLUJO VAGINAL DE VACAS
LECHERAS CON METRITIS CLÍNICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTA:

MARTHA CAROLINA CERVANTES MALAGÓN

ASESORES

DRA. LUCIA ELIANA RANGEL PORTA
MVZ. MARÍA ANTONIETA MOJICA SÁNCHEZ
MVZ. BRENDA ANAY CARRASCO CANO



FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatorias

Esta tesis la quiero dedicar a mis padres, que en todo momento me han apoyado, me han dado su comprensión y amor, no han dejado que me rinda y me han impulsado a seguir mis sueños y a conseguir mis metas.

En especial quiero dedicarla a mi tía Tere, aunque no haya podido ver cómo me convertía en una profesional, sé que me cuida donde quiera que este y espero se encuentre muy orgullosa de mi. Siempre pienso en ella y en el ejemplo que fuera para mí.

Quisiera agradecer a mis padres y hermanas, por el apoyo que me brindaron a lo largo de estos años y que sé, seguirán brindándome en el camino que me falta por recorrer.

A mis muy queridos profesores, mi asesora la Dra. Lucía Rangel, por el apoyo, la paciencia y la constancia en el tiempo de realización de esta tesis. A la Dra. Nina Bogdanchikova, por la confianza y todas las facilidades que me proporcionó para la elaboración de esta investigación.

A la MVZ Brenda, por recibirme desde mi servicio social, y apoyarme en este proyecto, además de brindarme su amistad e impulsarme a seguir aprendiendo, enseñarme e instruirme para volverme una excelente médico. Siempre le estaré agradecida porque parte de lo que soy hoy en día, es gracias a ella.

A Don Adrián por recibirme en el rancho y confiar en mí siempre, gracias por todas sus enseñanzas arcaicas.

A los MVZ Antonio y Egan, que aunque fue poco tiempo el que estuve con ellos, me dejaron una gran enseñanza. Los aprecio mucho.

Al amor de mi vida, hecho amiga; Brianda, por aguantarme tanto tiempo, nunca dejaré de estar agradecida con la vida por ponerte en mi camino, compito eres lo mejor. ILY.

Jocelyn, por ser una luz en mi vida, y por enseñarme tanto, gracias por ser fuerte por ambas. Te amo.

Fernanda, eres un gran ejemplo, Monx, no sé qué habría sido de mí sin ti en estos años. Te amo.

A Fátima y Dalia, por estar conmigo siempre, siendo inseparables, las fiestas, las risas, las horas de estudio y nuestras crisis por no poder con una materia. Las amo mucho. Gracias por estar siempre.

Mariana, por ayudarme siempre con las materias, darme hospedaje en tu casa y siempre recibirme con los brazos abiertos, escucharme y darme buenos consejos.

Beto y Jaz, por hacerme participe de un proyecto como lo fue He for She, por los cafés, las pláticas en la cafetería, las risas y la grandiosa amistad que tenemos.

Pamela, por dejarme ser tu copiloto, por cuidarme en las prácticas, por las risas, la compañía, por compartir el gusto por los bovinos, por tu amistad y apoyo incondicional. Te quiero mucho amiwi.

Fer Flores, gracias porque desde el primer momento fuiste increíble conmigo, por llevarme café al cuarto, por tus consejos, por tu amistad y por todo lo que has hecho por mí, te agradezco infinito por todo. He aprendido demasiado de ti. Te adoro.

Mitz, siempre me escuchaste, me aconsejaste y me impulsaste a cumplir mis sueños. Gracias por preocuparte y por siempre estar para mí. Te adoro muchísimo.

Amaranta, compartimos muchas cosas, mi amor, tu sabes a que me refiero. Gracias por tu amistad, te adoro.

Maurely y Leslie, aunque fue ya después de la facultad que nos volvimos amigas, saben que las quiero demasiado, que pasamos (desde lejos) momentos bien feos y bonitos, pero ahí han estado y me han brindado palabras bien bonitas.

Anita, por ser mi mejor co-worker. Crees mas en mi, que yo misma. Gracias por soplarme las respuestas y ser mi sensei en la repro bovina.

Yod, que aunque fue en el último escalón de esta investigación, me diste el empujoncito que necesitaba. Te amo, burri.

Resumen	1
Introducción	3
Material y métodos	6
Resultados	11
Discusión	17
Conclusión	25
Referencias	26

Resumen

CERVANTES MALAGÓN MARTHA CAROLINA. Uso de nanopartículas de plata para reducir la carga bacteriana en el flujo vaginal de vacas lecheras con metritis clínica (bajo la dirección de: Dra Lucia Eliana Rangel Porta, MVZ María Antonieta Mojica Sánchez y MVZ Brenda Anay Carrasco Cano)

La metritis clínica post parto presenta una gran incidencia en los establos lecheros, creando una grave problemática por sus efectos en los parámetros reproductivos, que así mismo impactan en la producción láctea, además de una pérdida económica considerable por el desecho de la leche de animales tratados con antibióticos. Este estudio presenta una alternativa al tratamiento convencional de este padecimiento, la cual es el uso de nanopartículas de plata (Argovit), estas poseen actividad antimicrobiana afectando a bacterias Gram positivas y negativas.

Se realizaron dos series de cultivos bacterianos en agar sangre, a partir de contenido uterino de vacas con metritis clínica puerperal. En el primero se determinó la dilución de muestra a emplear en los siguientes ensayos, seleccionándose la dilución 1/1000. El segundo cultivo se realizó para elegir el tipo de Argovit que se empleó en el estudio *in vivo*, seleccionándose el Argovit 1, de 5 que se probaron. La elección del Argovit se confirmó, mediante la realización de un antibiograma.

Una vez elegido el tipo de Argovit se conformaron tres grupos de 10 vacas, para probar 3 diferentes tratamientos: Grupo 1: Argovit 1 intrauterino, Grupo 2: Argovit 1 intrauterino + Shotapen® parenteral y Grupo 3: tratamiento convencional con base en Emicina® intrauterina + Shotapen® parenteral, mostrando una efectividad del 70%, 50% y 100% respectivamente. Esta efectividad se midió a través de la inhibición del crecimiento de UFC en agar sangre, estableciendo como límite 32 UFC para realizar el alta del animal.

El tratamiento convencional fue el mas exitoso, ya que el 100% de los animales se recuperó favorablemente ($p < 0.05$), y 70% de los animales lograron la resolución de la enfermedad con solo 2 aplicaciones del tratamiento. Mientras

que en los grupos tratados con Argovit 1 y Argovit 1 + Shotapen®, la recuperación fue menor, con 7 y 5 de 10 animales respectivamente, entre estos grupos no hubo una diferencia significativa ($p > 0.05$). Del grupo tratado con Argovit 1, 60% de los animales requirió más de dos aplicaciones del tratamiento, mientras que del grupo Argovit + Shotapen®, de los animales recuperados únicamente un animal requirió más de 2 aplicaciones.

La identificación de los microorganismos implicados se hizo a través de la tinción de Gram, donde se observó presencia de bacterias Gram positivas en la muestra de metritis, a diferencia de la muestra de moco recolectada de una vaca en celo, en la que se apreciaron colonias de bacterias Gram negativas.

Los resultados del presente trabajo, indican que los antibióticos de uso convencional fueron más efectivos que el tratamiento propuesto con Argovit 1.

Es necesario realizar otros estudios, en los que se prueben diferentes dosis de Argovit, para buscar una mayor respuesta en la resolución de la metritis.

Introducción

El sistema intensivo de producción lechera se caracteriza por poseer ganado especializado que en general permanece estabulado, con una excelente alimentación a base de forrajes de corte y alimentos balanceados [Villamar y Cazares, 2005].

El ciclo de producción comprende varias etapas que van desde el momento en el que el animal pare, hasta que vuelve a quedar gestante, teniendo como reto, para ello, el día 100 postparto. Debe considerarse que en los siguientes 30 a 45 días después del parto tiene lugar el puerperio, que es el tiempo en el que sucede la involución uterina y reinicia la actividad ovárica, después del cual la vaca podrá gestarse [Hernández, 2012].

Durante el puerperio las vacas pueden presentar anomalías que afectan la involución uterina, como son la retención placentaria, la metritis, la endometritis y la piometra, las cuales afectan el ciclo de producción [Smith, 2010]. En sistemas intensivos, por la alta demanda de leche y los manejos de los hatos, las hembras se vuelven susceptibles a presentar este tipo de patologías.

Las infecciones uterinas (metritis y endometritis) impactan directamente a la producción láctea, ya que alargan el periodo del parto a la concepción y aumentan el porcentaje de desechos; mientras que disminuyen el porcentaje de concepción al primer servicio, la tasa de vacas inseminadas y la producción (300 kg menos que las vacas no afectadas) [Hernández, 2012]. Este tipo de infecciones producen grandes pérdidas económicas para los hatos lecheros, principalmente por la pérdida de peso y la disminución de la producción láctea, así como por la eliminación de animales y por la compra de reemplazos [Divers, 2008].

Los factores predisponentes para las infecciones uterinas pueden incluir partos distócicos, hipocalcemia, retención de membranas fetales, partos prematuros, hígado graso, deficiencia de vitamina E y selenio, además de malas condiciones durante el parto [Andrews, 2004].

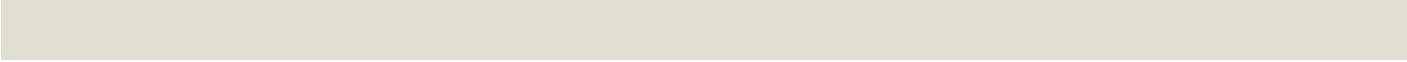
Se denomina metritis al proceso inflamatorio que involucra las tres capas del útero -mucosa, muscular y serosa-; el cual se caracteriza por presentarse en los primeros 21 días posparto, ocasionar retraso en la involución uterina y presencia de secreciones purulentas [Hernández, 2012].

Por otro lado, la endometritis se refiere a la inflamación únicamente de la mucosa uterina [Hernández, 2012]. La etiología de esta enfermedad puede ser variable donde *Trueperella pyogenes*, *E. coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, son los agentes más comúnmente aislados [Scott, 2011].

Los tratamientos más comunes se realizan con antibióticos, ya sea por vía parenteral, por infusiones intrauterinas o combinando ambas vías. La oxitetraciclina y las cefalosporinas son algunos de los más usados por su amplio espectro, además de por su alta efectividad en las condiciones en las que se presenta el útero posparto, como son la presencia de pus y la baja tensión de oxígeno en el medio. Aunado a esto, presentan pocos residuos en leche, lo cual es uno de los puntos más importantes. Por vía parenteral se recomienda el uso de antimicrobianos, si es que el individuo presenta signología de enfermedad sistémica, como fiebre; en cuyo caso los antibióticos más recomendados son la penicilina y el ceftiofur [Andrews, 2004].

Además, existe la posibilidad de dar tratamientos hormonales, con $\text{PGF}_{2\alpha}$, la cual al ser administrada induce el retorno al estro. Esta acción estimula la tonicidad del útero y la evacuación de los fluidos presentes en éste [Divers, 2008]. Aunque se menciona que el uso de oxitocina muestra mejores resultados *in vitro* al aumentar las contracciones uterinas [Heppelmann *et al.*, 2015].

A pesar de las alternativas de tratamiento que existen la recuperación de los animales afectados no es homogénea y algunas vacas incrementan sus días abiertos afectando la producción. Es por ello que existe la necesidad de buscar alternativas de tratamiento a las infecciones uterinas de las vacas en el periodo del puerperio, con la finalidad de lograr una pronta involución uterina, así como mejores desempeños productivo y reproductivo.



Las nanopartículas de plata (AgNPs) poseen actividad antimicrobiana contra organismos Gram negativos y positivos [Zhang *et al.*, 2016]. Uno de los mecanismos de acción se evaluó analizando la inhibición de crecimiento y el efecto de las AgNPs sobre la señal de replicación de las bacterias, este último mediante el estudio del perfil de la fosfotirosina bacteriana. Se demostró que hubo un decremento en la fosforilación de la tirosina, lo cual se refleja en la inhibición de ciertas enzimas que tienen repercusión en el crecimiento bacteriano [Siddhartha *et al.*, 2007]. En otro estudio, se analizaron colonias bacterianas tratadas con AgNPs mediante microscopía electrónica, y se demostró que existe una formación de “canales” en la pared celular bacteriana, lo que conduce a la muerte de ellas [Sondi y Branka, 2004].

De acuerdo con lo expuesto, es de gran relevancia presentar una alternativa de tratamiento para las infecciones uterinas, debido a las pérdidas que se generan a partir de ellas. Idóneamente hay que buscar tratamientos que puedan evitar la resistencia que pudiera ocasionar el uso indiscriminado de antibióticos para tratar el padecimiento, con el fin de mejorar las tasas de fertilidad y concepción.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar la efectividad de las AgNPs en forma intrauterina para disminuir la carga bacteriana en las secreciones uterinas de vacas lecheras con metritis puerperal clínica.

Material y Métodos

- HATO LECHERO

El estudio se realizó en el rancho Unión de productores Calamanda, Querétaro; una producción lechera intensiva con alrededor de 600 vacas en línea de ordeño.

- PREVIO

Antes de realizar el trabajo clínico, se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares en el laboratorio, con la única finalidad de elegir la nanopartícula que se emplearía en la valoración clínica.

Se tuvieron 5 tipos de Argovit (AgNPs 1, 2, 3, 4, 5), todos a base de nanopartículas de plata con diferentes características fisicoquímicas que no conocemos, dichas características son del conocimiento exclusivo del equipo de trabajo que las desarrolla y que se encuentra bajo la dirección de la Dra. Nina Bogdanchikova. Cada vial contenía 15 ml y disponíamos de 2 viales de cada uno (30 ml), los cuales se consideran como las soluciones madres, a partir de las cuales se realizaron diluciones a una concentración del 5% en agua inyectable. Se eligió esta concentración de trabajo, ya que es la que resultó efectiva en el tratamiento de mastitis en vacas [Shkil, 2016]. Para su uso, las soluciones se dejaron reposar por al menos durante 24 hrs, con la finalidad de que las AgNPs puedan estabilizarse, además, se mantuvieron aisladas de la luz y en refrigeración.

ENSAYO NO. 1: DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN DE MUESTRA PARA EL TRABAJO *IN VITRO*

Con el objetivo de realizar un conteo preciso de las unidades formadoras de colonias en el fluido vaginal, se realizó una serie de diluciones a partir de una muestra de secreción de una vaca con metritis clínica.

En un tubo de ensaye, se depositó 1 ml de contenido uterino, más 1 ml de agua inyectable, se homogeneizó y se incubó por 20 min a 37°C.

Después de transcurrida la incubación, se hicieron 3 diluciones decuples de la muestra. Para ello se colocaron 3 tubos con 900 µl de agua inyectable, a los que se les agregó 100 µl del tubo anterior. De cada uno de estos tubos se sembraron por triplicado, 100 µl en agar sangre, cultivándolos a 37°C durante 24 hrs, para posteriormente contar las unidades formadoras de colonias. Con esto se eligió la dilución de trabajo en la que el número de unidades formadoras de colonias de bacterias (UFC) resultaron contables y suficientes para poder evaluar el efecto del tratamiento.

ENSAYO NO. 2: ELECCIÓN DE LA NANOPARTÍCULA EFECTIVA *IN VITRO*

Se tomaron 10 ml del contenido uterino de una vaca con metritis clínica, se homogeneizó y a partir de ellos se tomaron las muestras para probar cuál de las 5 nanopartículas tiene un mejor efecto para reducir las unidades formadoras de colonia en el cultivo.

Se identificaron 7 tubos de la siguiente manera:

- Tubo #1 “Sin tratamiento”: 1 ml de contenido uterino más 1 ml de agua inyectable.
- Tubo #2 “Argovit 1”: 1 ml de la dilución de nanopartículas al 5% más 1 ml de contenido uterino.
- Tubo #3 “Argovit 2”: 1 ml de la dilución de nanopartículas al 5% más 1 ml de contenido uterino.
- Tubo #4 “Argovit 3”: 1 ml de la dilución de nanopartículas al 5% más 1 ml de contenido uterino.
- Tubo #5 “Argovit 4”: 1 ml de la dilución de nanopartículas al 5% más 1 ml de contenido uterino.
- Tubo #6 “Argovit 5”: 1 ml de la dilución de nanopartículas al 5% más 1 ml de contenido uterino.
- Tubo #7 “Tratamiento convencional”: 1 ml de contenido uterino más 1 ml de Emicina®”

Los tubos se dejaron incubar a 37°C por 30 min, para posteriormente realizar diluciones y sembrar en Agar sangre.

De cada tubo se realizaron diluciones decuples hasta llegar a la dilución elegida en el ensayo 1, a partir de la cual se sembraron 100 µl de cada tubo, por triplicado en cajas con agar sangre. Las cajas se cultivaron a 37°C por 24 hrs, y al finalizar el

tiempo se contaron las UFC. Los resultados se compararon contra las cajas sin tratamiento.

Adicionalmente, se tomaron muestras a partir del tubo 1, en tubos mediodo Stuart en donde fueron transportadas las muestras a la FMVZ para la identificación del agente involucrado.

Se realizó un antibiograma con los 5 tipos de nanopartículas en un medio Müller Hinton adicionado con sangre de bovino. Para lo anterior se utilizaron muestras de moco cervical de 2 vacas en estro, moco blanquecino de 2 vacas en puerperio normal y secreción uterina de 2 vacas con metritis. Se tomó el hisopo del medio de transporte para realizar una estría continua en el medio de cultivo. Se cortó papel filtro a manera de sensidiscos, y se llevaron a esterilizar en autoclave para su posterior utilización.

Cada tipo de Argovit se utilizó a una dilución del 5% para impregnar los sensidiscos con 2 µl de la dilución. Además, se utilizó Emicina® al 60% para impregnar con 2 µl el sensidisco del centro. Para finalizar el procedimiento se incubaron a 37°C por 24 hrs.

Además, con la finalidad de comparar el crecimiento de bacterias en diferentes diluciones y tratamientos, se realizaron cultivos en agar sangre por el método de Miles and Misra [Quinn, 2011] en el laboratorio del Departamento de Microbiología de la FMVZ, UNAM. Para ello se usaron muestras de contenido uterino (metritis) más Emicina® al 60%, como testigo negativo; muestras de metritis más agua inyectable, como testigo positivo; y muestras de metritis más Argovit 1 diluido al 5%, como grupo desafío.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis bacteriológico, se eligió el tipo de Argovit que causó la mayor reducción en el número de unidades formadoras de colonias, así como, el que haya tenido un mayor diámetro del halo de inhibición. Dicha nanopartícula se utilizó para el siguiente ensayo.

- VALORACIÓN CLÍNICA: EVALUACIÓN *IN VIVO*

Se formaron 3 grupos de 10 vacas con metritis clínica cada uno, las cuales se asignaron aleatoriamente a cada uno de los grupos, conforme se diagnosticaron en la clínica del establo. Se incluyeron únicamente animales de segundo y tercer parto.

La nanopartícula elegida fue el Argovit 1, que se diluyó en agua inyectable a una concentración del 5% y se dejó reposar por 24 hrs, cubierta de la luz y en refrigeración.

El grupo 3 (control) recibió un tratamiento convencional; es decir una infusión intrauterina con 30 ml de Emicina®, diluidos en 20 ml de suero salino fisiológico, más un tratamiento parenteral a base de Shotapen® (Penicilina G procaína, penicilina G benzatína, y dihidroestreptomicina), administrando 30 ml IM cada 24 hrs. El tratamiento se aplicó cada tercer día hasta que el moco se tornara blanquecino, y presentara menos de 32 UFC, dando como máximo 3 infusiones. El grupo 1 (Argovit) recibió una infusión intrauterina de 2.5 ml de nanopartículas de plata, diluidos en 47.5 ml de agua inyectable, que se aplicó cada tercer día, hasta que el moco se tornara blanquecino, con menos de 32 UFC, o se cubrieran máximo 3 infusiones. Por último, el grupo 2 (Argovit + tratamiento sistémico) recibió la infusión a base de nanopartículas, además del tratamiento parenteral de Shotapen®. Para cada animal se registró el número de tratamientos aplicados, y aquellas vacas que tras 3 infusiones no resolvieron la infección se anotaron como tratamiento no exitoso, y se incorporaron a otro tratamiento, que ya no formó parte del estudio.

Las muestras de contenido uterino se obtenían antes de aplicar cualquiera de los tratamientos. La revisión se realizaba cada tercer día, en esta, el útero se masajeaba por palpación transrectal, para evaluar el contenido y de ser necesario se continuaba con el tratamiento, de lo contrario el animal se daba de alta.

- Toma y análisis de muestras

Antes de cada tratamiento se evaluó el estado del aparato reproductor, por

palpación transrectal, y se tomaron muestras del exudado proveniente del útero, a través de una pipeta, para valorar cualitativa y cuantitativamente las secreciones.

La evaluación macroscópica (cualitativa) se realizó mediante la observación de la apariencia, el color y el olor del líquido extraído. Se tomó como referencia el siguiente sistema de puntuación, propuesto por Sheldon *et al.* (2005) (Figura 1):

- 0: moco claro o traslucido.
- 1: moco con restos de pus de color blanquecino
- 2: descarga uterina con $\leq 50\%$ de material mucopurulento
- 3: descarga uterina con $\geq 50\%$ de material purulento blanco o sanguinolento

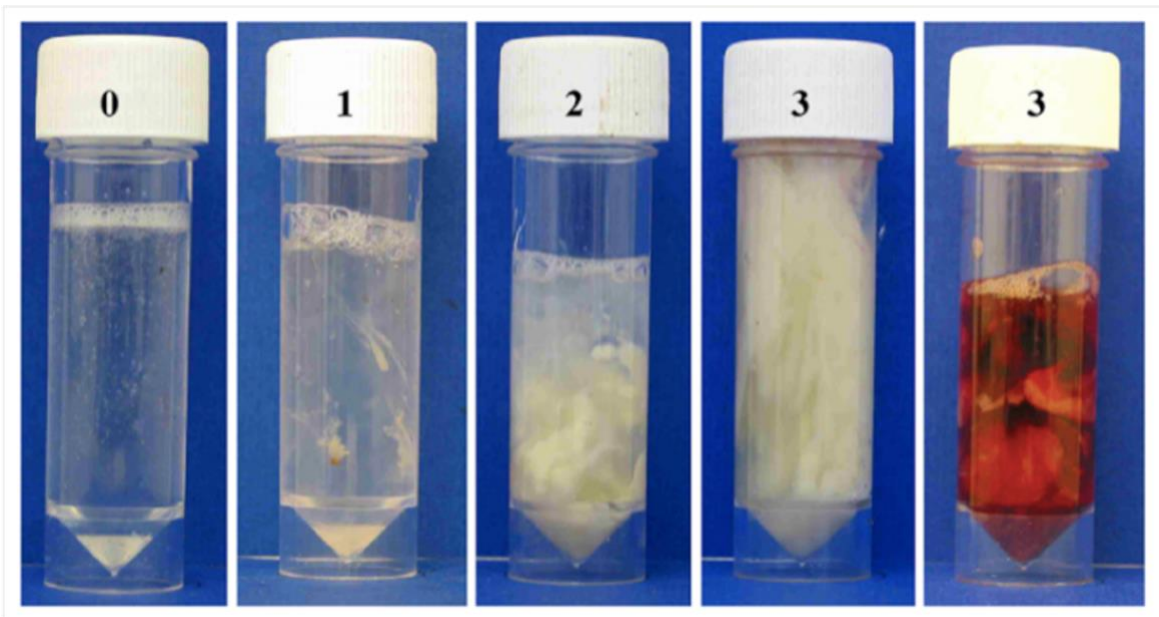


Figura 1: Puntuación de descarga uterina para Metrichick (Sheldon *et al* 2005).

La información se registró para determinar el progreso de los tratamientos y el momento de alta de los animales.

Las muestras se transportaban al laboratorio en tubos estériles, para su aislamiento en agar sangre [Quinn P, 2004]. Para la siembra se realizó una dilución del moco, de acuerdo con lo descrito en el ensayo 1, con la finalidad de obtener la concentración seleccionada en el mismo. Se sembraron 100 μ l por estría continua,

utilizando un asa microbiológica previamente esterilizada. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 a 48 hrs en atmósfera de aerobiosis. Después de lo cual se describió la morfología de las colonias desarrolladas y el número de unidades formadoras de colonias. A partir de estas colonias se realizaron frotis fijos, para teñirlos con tinción Gram [UNAM, 2003].

Para el cultivo bacteriológico en el laboratorio del Departamento de Microbiología, las muestras obtenidas se colocaron en un medio de transporte Stuart, se identificaron, y se refrigeraron entre 2 y 6°C. El transporte se realizó en un periodo menor a 24 hrs [Quinn P, 2004].

- Análisis de resultados

Los resultados se analizaron por la prueba de análisis de varianza para mediciones repetidas con el programa GenStat.

El diseño experimental constó de tres tratamientos diferentes, cada uno por 10 animales por grupo. En el que se consideró como variables dependientes: conteo de UFC finales y días en tratamiento, variables independientes: Identificación del animal y grupo al que pertenecieron. La medición repetida fue el conteo de UFC.

Resultados

Ensayo No. 1

Se seleccionó a la vaca número 2740, en la que se realizó el manejo postparto de rutina (una inyección de calcio, vitaminas ADyE, selenio, flumetazona, y prostaglandina).

Transcurridas 24 horas, se sacó a segunda revisión para detectar si presentaba retención placentaria o no, lo cual fue positivo, se prosiguió a administrarle maleato de ergonovina y Parfosal®, como manejo rutinario del establo. Se dejaron pasar

dos días para darle tiempo a la vaca de desechar por completo las membranas placentarias. Al día siguiente la vaca se diagnosticó con metritis clínica, ya que presentaba alto contenido uterino de loquios, con apariencia sanguinolenta y olor fétido. Se tomó una muestra de contenido uterino por medio de una pipeta para depositarlo en un contenedor estéril. Se incubó por 20 min a 37°C, y se realizaron diluciones decuples en tubos estériles. De cada dilución se sembraron 100 µl en agar sangre por triplicado, por 24 hrs a 37°C. Al transcurrir el tiempo, se observaron los nueve cultivos, comparando las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, donde el mejor resultado se obtuvo en la dilución 1/1000 (Figura 2) del contenido uterino.

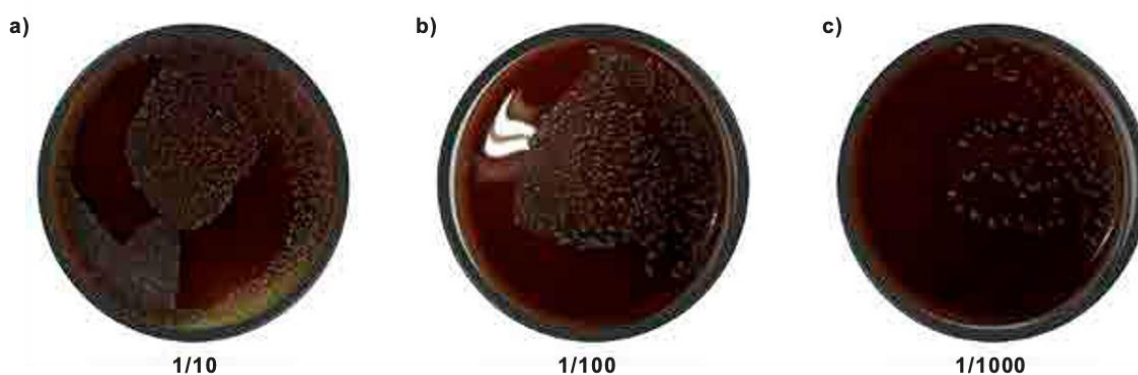


Figura 2. Siembras de moco uterino con metritis en agar sangre, para establecer la dilución óptima para llevar a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). (a) Dilución 1/10, con UFC incontables; (b) Dilución 1/100, con 250 UFC; (c) Dilución 1/1000, con 110 UFC.

A partir de este ensayo se eligió la dilución de 1/1000, por presentar mejores resultados para el conteo de UFC.

Ensayo No. 2

Una vez obtenidos los resultados del primer ensayo, se continuó con la evaluación *in vitro* de las nanopartículas. Se enfrentó el tratamiento convencional, a los 5 tipos de nanopartículas evaluando así cual tenía mejor efectividad a nivel *in vitro* para su utilización en el ensayo *in vivo*. Esto se realizó por 2 métodos, una siembra de 10 µl de la muestra de metritis (Figura 3) para el conteo de UFC (Cuadro 1) y un antibiograma, con muestras de metritis, moco cervical de una vaca en celo, y moco de una vaca limpiando (Cuadro 2); ambos en agar sangre.

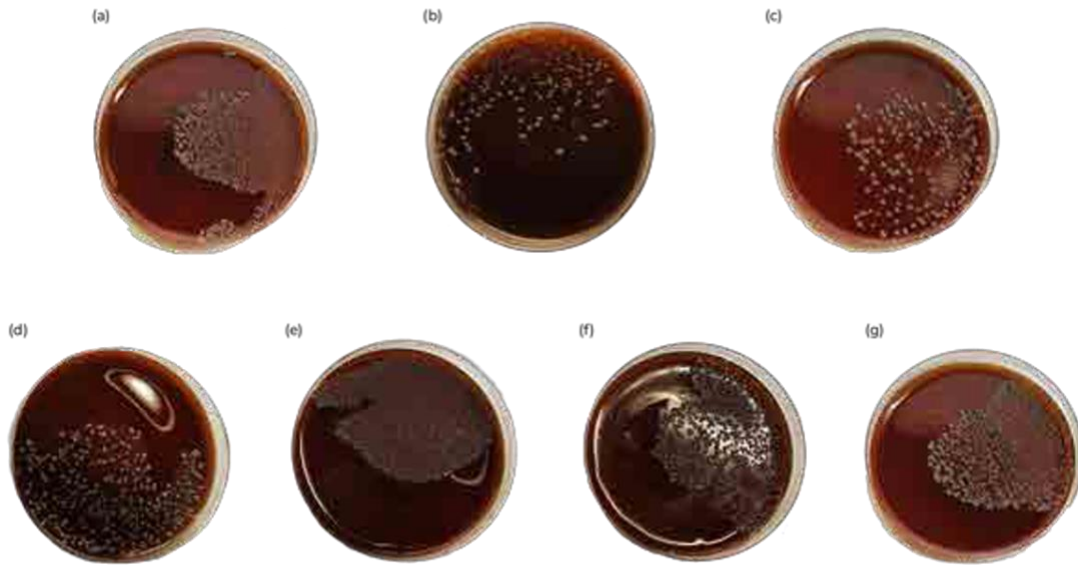


Figura 3. Muestra de metritis enfrentada a los 5 tipos de nanopartículas y Emicina®. Donde: (a) control, sin tratamiento; (b) tratamiento convencional, Emicina®; (c) Argovit 1 (d) Argovit 2 (e) Argovit 3 (f) Argovit 4 (g) Argovit 5.

En la evaluación *in vitro* de los diferentes tratamientos para seleccionar el Argovit idóneo, a pesar de la dilución de la muestra, hubo 4 muestras que tuvieron un número de UFC tan grande que fue imposible realizar el conteo. En el resto de las muestras si fue posible llevar a cabo el conteo. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

SIN TX	EMICINA	ARGOVIT				
		1	2	3	4	5
Incontables	93 UFC	95 UFC	200 UFC	Incontables	Incontables	Incontables

Cuadro 1. Conteo de UFC en moco uterino con metritis, sembrado en agar sangre, a una dilución de 1/1000, con o sin los diferentes tipos de Argovit.

Durante la elaboración de los antibiogramas hubo 3 muestras que no tuvieron desarrollo bacteriano suficiente para su interpretación, las 2 de los animales en celo, y una de metritis. Al realizar la medición de los halos de inhibición en los antibiogramas restantes, la Emicina® tuvo el mayor diámetro, y se observaron diferencias significativas entre los Argovits (Cuadro 2, Figura 4).

ID	EMICINA	ARGOVIT				
		1	2	3	4	5
CI		*				
C2		*				
L1	46	11	11	14	11	11
L2	44	15	16	16	13	15
M1	*	13	7	10	8	10
M2	33	12	11	10	12	10

Cuadro 2. Resultados del antibiograma. Medición en mm del halo de inhibición. Donde: * = Crecimiento bacteriano insuficiente para realizar el antibiograma, C = muestra de vaca en celo, L = muestra de vaca limpiando, M = muestra de vaca con metritis.

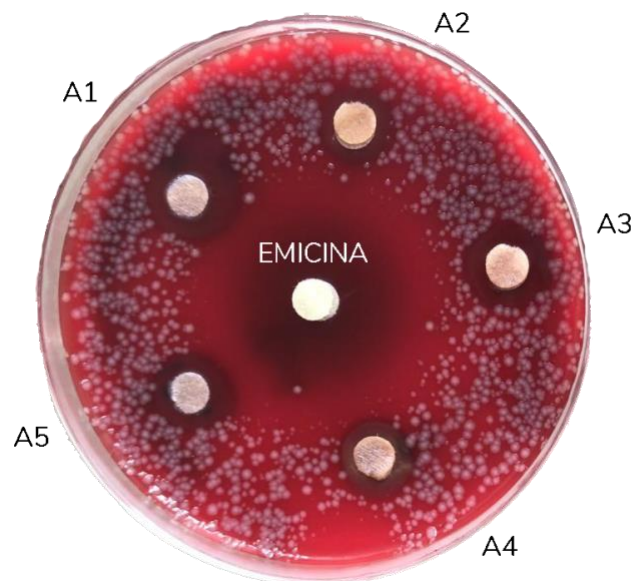


Figura 4. Ejemplo del antibiograma de una muestra de moco uterino, proveniente de una vaca con metritis clínica. Donde A1 = Argovit 1, A2 = Argovit 2, A3 = Argovit 3, A4 = Argovit 4, A5 = Argovit 5.

Con base en los resultados de las 2 pruebas anteriores, se eligió al Argovit 1, para realizar la prueba *in vivo*.

Ensayo No. 3

Los resultados de las UFC en el moco uterino, así como el número de tratamientos aplicados para cada animal se pueden observar en los cuadros 3 a 5.

Cuadro 3. Estimación de la contaminación bacteriana en vacas Holstein con metritis clínica post parto, mediante conteo de UFC, tratadas con Emicina® intrauterina +

ID DEL ANIMAL	DÍAS EN TX	SIN TX	PRIMERA APLICACIÓN	SEGUNDA APLICACIÓN	TERCERA APLICACIÓN	RESOLVIÓ
2259	5	>500 UFC	111 UFC	18 UFC	-	✓
3233	5	>500 UFC	128 UFC	10 UFC	-	✓
2929	7	>500 UFC	85 UFC	38 UFC	6 UFC	✓
2943	5	82 UFC	6 UFC	4 UFC	-	✓
1391	3	367 UFC	67 UFC	30 UFC	-	✓
2963	3	54 UFC	34 UFC	17 UFC	-	✓
10	5	>500 UFC	68 UFC	7 UFC	-	✓
2609	5	231 UFC	63 UFC	32 UFC	8 UFC	✓
2625	5	>500 UFC	90 UFC	5 UFC	-	✓
2846	4	346 UFC	270 UFC	103 UFC	20 UFC	✓

Cuadro 4. Estimación de la contaminación bacteriana en vacas Holstein con metritis clínica post parto mediante conteo de UFC, tratadas con Argovit 1.

ID DEL ANIMAL	DÍAS EN TX	SIN TX	PRIMERA APLICACIÓN	SEGUNDA APLICACIÓN	TERCERA APLICACIÓN	RESOLVIÓ
3255	5	>500 UFC	5 UFC	4 UFC	-	✓
3233	7	>500 UFC	139 UFC	54 UFC	4 UFC	✓
2899	7	88 UFC	40 UFC	37 UFC	36 UFC	✓
2547	3	217 UFC	3 UFC	-	-	✓
2527	3	236 UFC	7 UFC	-	-	✓
2958	7	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	-
2626	5	>500 UFC	132 UFC	23 UFC	-	✓
3077	5	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	-
1940	7	>500 UFC	138 UFC	50 UFC	15 UFC	✓
2586	7	>500 UFC	288 UFC	307 UFC	300 UFC	-

Cuadro 5. Estimación de la contaminación bacteriana en vacas Holstein con metritis clínica post parto mediante conteo de UFC, tratadas con Argovit 1 y Shotapen®

ID DEL ANIMAL	DÍAS EN TX	SIN TX	PRIMERA APLICACIÓN	SEGUNDA APLICACIÓN	TERCERA APLICACIÓN	RESOLVIÓ
2516	5	>500 UFC	65 UFC	23 UFC	-	✓
2336	7	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	-
2780	7	>500 UFC	200 UFC	280 UFC	245 UFC	-
1994	3	200 UFC	20 UFC	-	-	✓
2447	7	80 UFC	130 UFC	200 UFC	208 UFC	-
2205	4	>500 UFC	>500 UFC	130 UFC	4 UFC	✓
2655	7	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	>500 UFC	-
3400	5	400 UFC	200 UFC	20 UFC	-	✓
3066	5	410 UFC	38 UFC	24 UFC	-	✓
2530	7	>500 UFC	>500 UFC	100 UFC	88 UFC	-

En la comparación del número de animales que resolvieron la infección por grupo, se encontró una diferencia significativa en favor del tratamiento con Emicina® ($p < 0.05$), en el que el 100% de los animales tratados resolvió la infección, mientras que en los grupos de Argovit y de Argovit + Shotapen® solamente resolvieron 7 y 5 de 10 animales, respectivamente. Entre estos grupos no existió diferencia ($p > 0.05$).

En el grupo de Emicina®, solamente 3 animales requirieron de 3 tratamientos (30%), lo cual ocurrió en 60% de los animales de los grupos de Argovit y de Argovit + tratamiento convencional.

Clasificación del agente

La morfología de las colonias de la muestra de metritis, se describió como blanquecinas, mucoides, y con bordes regulares algunas produciendo colonias β -hemolíticas. Se realizó un aislamiento secundario porque se observaron diferentes tipos de crecimiento en una placa de agar sangre, pero al revisar las diferentes colonias, dentro del mismo plato de cultivo, se encontró que todas eran del mismo tipo.

Al observar las tinciones en el microscopio de la muestra de moco de una vaca en celo, se observaron bacilos Gram (-) y de la muestra de una vaca con metritis bacilos Gram (+), ambos agrupados en racimos (Figura 6).

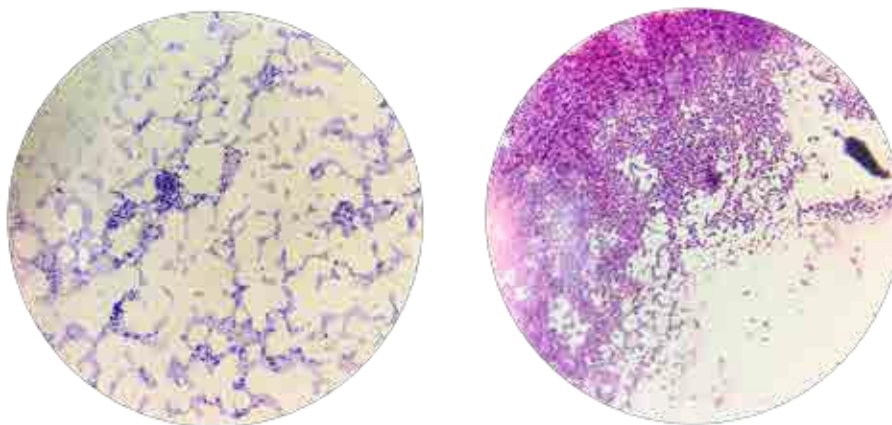


Figura 6. Vista al microscopio de una colonia formada a partir de muestra de una vaca en celo (derecha), apreciando bacterias Gram (-) y de metritis (izquierda) donde se aprecian bacterias Gram (+).

Discusión

En el presente trabajo se evaluó el uso de AgNPs para el tratamiento de metritis puerperal en vacas, un padecimiento que es frecuente en los establos lecheros. Las nanopartículas lograron la resolución de la infección en el 70% de los animales del grupo tratado exclusivamente con las nanopartículas, porcentaje significativamente menor al obtenido con el tratamiento convencional de Emicina (100%).

Existen diversos tipos de tratamiento siendo los más utilizados los antibióticos por vía intrauterina. Entre ellos se encuentra la Oxitetraciclina por su amplio espectro de acción en contra de los organismos involucrados en este tipo de infecciones [Azawi, 2008], además, porque permanece relativamente más tiempo en el útero por su lenta absorción hacia el torrente sanguíneo [Purohit, 2015]. El uso de penicilina por vía sistémica también está indicado en el tratamiento de metritis clínica, en conjunto con oxitetraciclina intrauterina [Smith *et al.*, 2009]. Esto explica los resultados obtenidos en el grupo control de nuestro trabajo (100% de recuperación). Sin embargo, el uso de antibióticos genera resistencia por parte de los microorganismos, disminuyendo su eficiencia [FAO, 2005], lo que ha obligado a la rotación de antibióticos y a la generación de tratamientos cada vez más fuertes. A pesar de que podrán generarse nuevos antibióticos eficaces contra organismos resistentes, debe considerarse que es posible que los microorganismos sigan generando esta capacidad de resistir a una velocidad variable.

Un estudio *in vitro* mostró que las nanopartículas de plata fueron eficaces contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*; bacterias que resultaron resistentes a una amplia variedad de antibióticos, entre ellos los β -lactámicos y las tetraciclinas [Yu-Guo Yuan *et al.*, 2017]. En nuestro trabajo, al realizar los cultivos bacteriológicos de muestras de metritis (ensayo 1), se observó una reducción importante en el número de unidades formadoras de colonias en la muestras adicionadas con Argovit 1 y Emicina®, al compararlas con la muestra sin tratamiento (Cuadro 1), esto sugiere que las

bacterias involucradas en la infección de metritis son igualmente responsivas a las nanopartículas y al antibiótico del tratamiento convencional. Sin embargo, se observó que la inhibición de crecimiento para el Argovit 1 fue menor que la de la Emicina® (Cuadro 2, Figura 4). Las diferencias podrían deberse a que las nanopartículas no difunden adecuadamente en el agar, y su difusión disminuye a mayor concentración del agar (Comunicación personal de la Dra Nina Bogdanchikova del Centro de nanociencias y Nanotecnología-UNAM, datos no publicados). De hecho, las nanopartículas tienen un diametro de núcleo de 35 nm, que en conjunto con la envoltura de polímero suman un diametro hidrodinámico de 100 nm. Por lo tanto, al estar en un medio sólido como es el agar, las nanopartículas quedan “atrapadas” entre el polímero hidrofílico del mismo disminuyendo su difusión. En el ensayo 1 (cultivo bacteriológico) y en el antibiograma se utilizaron agares con diferentes concentraciones, por un lado, se empleó agar sangre de BD® (para el cultivo bacteriológico) que contiene 1.3% de agar, y por el otro, para el antibiograma, el gel se elaboró en el laboratorio de microbiología de la FMVZ con una concentración de 1.5% de agar, por lo que las nanopartículas debieron difundir mejor en el cultivo bacteriológico, en el que el Argovit 1 y la Emicina® tuvieron resultados similares, a diferencia de lo que se encontró en el antibiograma, en el que las nanopartículas no debieron difundir correctamente.

Por otro lado, a pesar de que en este trabajo no se realizaron estudios sobre la resistencia bacteriana a los fármacos utilizados (Oxitetraciclina y Penicilina), se ha demostrado que *Trueperella pyogenes*, una de las principales bacterias involucradas en la metritis clínica (aislada del útero de vacas post-parto), ha llegado a generar dicha resistencia, con reportes de 86.1% de los cultivos resistentes a penicilina y 50% a oxitetraciclina [Santos, 2010]. Además, diferentes cepas de *E. coli* y *F. necrophorum*, otras de las bacterias más comúnmente aisladas en padecimientos uterinos, mostraron resistencia a la oxitetraciclina, esta última con una amplia variación en los valores de concentraciones mínimas inhibitorias [Sheldon, 2004]. Más aún, un estudio reciente realizado en Rusia, demostró que las AgNPs incluso logran potencializar el efecto antimicrobiano de ciertos antibióticos

en cultivos de *S. aureus*, realizados a partir de muestras de leche de vacas con mastitis. Además, reportaron que la completa recuperación se obtuvo dos días antes con el uso de AgNPs que con el uso de Lactobay® (antibiótico intramamario) [Nefedova *et al*, 2022].

Un punto que debe estudiarse con respecto al uso de las AgNPs es la resistencia que los microorganismos puedan generar a ellas, ya que si bien se menciona como una ventaja de las AgNPs la no generación de resistencia, no se encontró un trabajo que explícitamente lo demuestre. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que ciertas bacterias comienzan a generar resistencia, al desarrollar mecanismos como la agregación, la precipitación y la presencia de proteínas de superficie bacteriana como la flagelina en *E. coli*, por los cuales evitan ser afectadas por las nanopartículas [Panacek A. *Et al*, 2018]. Otros autores han sugerido que la resistencia de las bacterias Gram (-) se debe a la diferencia de carga que poseen [Mandal *et al*, 2016]. También se han reportado casos de persistencia bacteriana; debido a la exposición de bacterias a dosis inferiores a las requeridas de las AgNPs [Orozco M, *et al*, 2019]. Diversos trabajos han mencionado que un importante mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos es que estas los expulsan, mediante un sistema denominado bombas efflux, incluso Orozco y colaboradores han sugerido que por esta vía las bacterias también pueden expulsar a las AgNPs, sin embargo, el estudio de Nefedova y colaboradores [2022] sugieren que a pesar de este mecanismo las AgNPs son eficientes aún en presencia de este mecanismo, incrementando el efecto antimicrobiano en un 3% en contraste con el uso de un antibiótico solo.

Según la FAO el uso de antibióticos en medicina veterinaria genera una situación desfavorable para la salud pública, ya que en América su uso es indiscriminado porque muchas veces son de venta libre, e incluso se llegan a utilizar como promotores de crecimiento en el ganado [FAO, 2005]. Dentro de los riesgos generados por los residuos de antibióticos, en los productos de origen animal, se encuentran reacciones de hipersensibilidad, efectos carcinogénicos y teratogénicos [Beyene T, 2006], y uno de los más importantes, la resistencia bacteriana, que se

traduce en tratamientos veterinarios inefectivos y la transferencia de estos microorganismos resistentes.

Se ha sugerido que las nanopartículas de plata no producen residuos, ni toxicidad en los animales [Laboratorio de Espectroscopía UNAM, 2018], que es otra gran preocupación al momento de elegir tratamientos alternativos a los ya establecidos. En el presente trabajo no se evaluaron residuos ni toxicidad, por lo que es algo que se requiere investigar.

La distribución de las AgNPs en el organismo depende de diferentes variables, tales como el tamaño de estas, la vía y tiempo de administración, la concentración, incluso el sexo del paciente, entre otras. En un estudio realizado en ratas se detectó la presencia de nanopartículas en hígado, bazo y riñones, lo cual se atribuyó a que son los órganos que sirven para la depuración del organismo, y se encontró que la principal vía de eliminación son las heces. [Triana, 2014]. Sin embargo, en el Laboratorio de Espectroscopía de la UNAM se llegó a la conclusión de que la concentración de nanopartículas de plata en muestras (heces, riñón, intestino delgado, corazón, hígado, pulmón, rumen, ganglios y tejido adiposo) de vacas sujetas a un tratamiento para mastitis, con aplicaciones intramamaria e intramuscular, a las 24 y 48 horas postaplicación, está por debajo del límite de detección. Lo anterior sugiere que no existe eliminación por otras vías, como la leche. De comprobarse lo anterior, las nanopartículas podrían representar una opción de tratamiento para vacas lecheras, lo que implica una reducción en las pérdidas económicas que ocasiona el tratamiento convencional, por el tiempo de retiro de los antibióticos [USDA, 2011].

Debido al incremento en el uso de las AgNPs en diferentes industrias, resulta de relevancia estudiar los efectos que tienen en el medio ambiente. No existe evidencia que demuestre que los residuos generados después de un tratamiento en animales generen daño en el medio ambiente. Sin embargo, se ha observado *in vitro*, que presentan acción en células eucariotas y procariotas, perjudiciales para los cloroplastos de plantas y algas, lo que se ha especulado que podría tener un efecto directo en el ecosistema por la contaminación del suelo y agua que se da en los

procesos de uso, producción y eliminación de las AgNPs [Anjali Dash *et al.*, 2012].

Existe información contradictoria sobre el efecto de combinar nanopartículas de plata y antibióticos. Específicamente para el caso de los β -lactámicos, grupo al que pertenece el antibiótico empleado por vía sistémica en nuestro estudio (penicilina G), Li y colaboradores [2005] demostraron que la amoxicilina tenía un efecto sinérgico cuando se evaluó *in vitro* sobre cultivos de *E. coli*. Una de las causas probables es que debido a la composición de la amoxicilina (grupos hidroxilo y amino) se crean enlaces por medio de quelación para formar “grupos antimicrobianos”, lo resultando en la sinergia entre ambas sustancias. Otra explicación podría ser la capacidad de las AgNPs de “acercar” a la amoxicilina a la membrana celular, por ser hidrofóbica. Sin embargo, en otro estudio realizado en cultivos bacterianos se encontró que la combinación de nanopartículas y ampicilina no genera ninguna interacción; es decir, ni sinergia ni antagonismo [Vázquez Roberto, 2017]. Nuestro trabajo concuerda con esta última observación, ya que en el grupo de estudio que obtuvo el tratamiento de nanopartículas más el antibiótico parenteral no se mostró diferencia significativa con el grupo tratado exclusivamente con las nanopartículas.

Los iones de plata muestran efectos antimicrobianos eficientes al actuar directamente en heridas contaminadas y como antiséptico en quemaduras [Lansdown, 2002]. En nuestro estudio, se vió una reducción en los microorganismos de las secreciones uterinas, cuando se aplicó el tratamiento con nanopartículas en infusiones intrauterinas (60% de resolución de la metritis cuando se aplicaron solas), lo que sugiere que en el ambiente intrauterino son capaces de generar el efecto antimicrobiano que los caracteriza. Sin embargo, el hecho de que el tratamiento con las nanopartículas tuviera un menor porcentaje de recuperación que la antibioterapia convencional sugiere que es necesario evaluar la dosis de las nanopartículas, a fin de obtener un mayor número de resoluciones de la infección *in vivo*.

Es probable que la baja respuesta obtenida en ambos grupos tratados con nanopartículas se deba a una baja concentración de las mismas, ya que la eficiencia de las nanopartículas suele depender de la dosis administrada [Shkil, 2018]. Así, un

estudio realizado en la región sur de China, que trabajó con muestras de leche de cabra con mastitis *in vitro*, en las que se encontró *P. aeruginosa* y *S. aureus*, demostró que se manifestaba una completa inhibición a mayor concentración de las nanopartículas [Yu-Guo Yuan *et al.*, 2017]. Sin embargo, debe considerarse que los estudios *in vivo* e *in vitro* pueden mostrar diferencias significativas, por ejemplo, en un experimento realizado sobre mastitis subclínica bovina de acuerdo al test de Tuckey, concluyeron que la mayor concentración de nano-plata (7 ppm) estudiada, inhibía el crecimiento de *E. coli in vitro*, en un 92.1%; pero esa misma concentración *in vivo* tuvo un porcentaje de efectividad de apenas un 7.7% [Valdivieso, 2010]. Para nuestro trabajo se tomó como referencia la concentración empleada del 5% en vacas con mastitis *in vivo* por Shkil [2018], la cual tal vez haya sido insuficiente para generar la inhibición total en nuestro trabajo, al aplicarse intrauterinamente.

Dado que este fue un primer estudio, se sugiere elevar la dosis empleada de nanopartículas, ya que la del presente trabajo podría haber sido insuficiente. Como se menciona en un par de investigaciones *in vitro*, donde se utilizaron cepas de *E. coli*, al aumentar la concentración de AgNPs es mayor la inhibición del crecimiento bacteriano. Así, Sondi y Branka [2004] demostraron una inhibición bacteriana del 70% a una concentración de $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, en comparación con una inhibición del 100% a una concentración de $50\text{-}60 \mu\text{g cm}^{-3}$. Similarmente, Siddhartha y colaboradores [2007] demostraron un 60% de inhibición al usar $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AgNPs, y se alcanzó una completa inhibición al usar $25 \mu\text{g ml}^{-1}$. También es necesario realizar valoraciones de toxicidad y eliminación en leche, así como evaluar el desempeño de parámetros reproductivos postratamiento, tales como días abiertos y tasa de concepción a primer y segundo servicio, entre otros. De obtenerse mejores resultados podría considerarse la sustitución del uso de antimicrobianos, con la posibilidad de comercializar la leche de los animales en tratamiento, pues aún no existe evidencia de que las nanopartículas se eliminen por leche. Esto último sería benéfico para los establos lecheros del país, por la gran pérdida económica que representa el desecho de la leche de animales tratados con antibióticos, y así

también se disminuirían las incidencias de resistencia bacteriana, que se presentan más frecuentemente en estos días y que afectan a seres humanos y animales por igual.

Otra propiedad muy importante de las nanopartículas de plata es la antiinflamatoria, ya que causan la apoptosis de neutrófilos, la reducción de citoquinas proinflamatorias y una reducción en las metaloproteinasas de la matriz extracelular, culpables de inducir inflamación. Estas reacciones fueron observadas en un estudio realizado en piel de cerdo, donde fue inducida una dermatitis por contacto siendo tratados usando plata nanocristalina. Los autores observaron que después de 48 horas del tratamiento, disminuyeron las células inflamatorias, y la regeneración de la epidermis. Aunado a esto, se demostró que hubo un incremento en la apoptosis de células inflamatorias en la dermis, sin afectar los queratinocitos [Nadworny *et al.*, 2008]. Además, las nanopartículas de plata inhiben la actividad del interferón gamma y del factor de necrosis tumoral, ambos involucrados en la inflamación [Prabhu & Eldho, 2012]. Es necesario evaluar el efecto antiinflamatorio en estas circunstancias, ya que se habla de un animal post-parto; con un tejido uterino inflamado, en un ambiente séptico. Esto no fue objeto de estudio en el presente trabajo.

A pesar de haberse obtenido una recuperación menor que la obtenida con el tratamiento a base de antibióticos, puede considerarse que se logró la resolución en un buen número de animales, lo cual puede significar una ganancia si se considera que la leche de estos animales tratados no requiere un tiempo de retiro, o la necesidad de desecharla. Aunque en el presente trabajo no se incluyó un grupo sin tratamiento, debido a que se trabajó en una unidad de producción pecuaria privada, estudios encontrados en la literatura han reportado que las vacas sin tratamiento tardan 14 días en recuperarse por sí solas, con porcentajes de recuperación es del 55.3%, comparado con un 74.3% en el caso de vacas con tratamiento (McLaughlin *et al.* 2012). En nuestro estudio el porcentaje vacas recuperadas con el tratamiento de Argovit fue de 70% en un tiempo promedio de 5

días, por lo que podemos asumir que la resolución de los animales del presente trabajo se debe a los tratamientos probados.

En un estudio realizado en el estado de Illinois, sobre la metritis clínica y sus efectos económicos en la producción láctea [Lima, 2019], se determinó que el costo total del tratamiento -usando ampicilina o ceftiofur- para esta patología, es de aproximadamente 377 USD cuando la leche se desecha, y 337 USD cuando se alimentaba a los becerros con esa leche (tomando en cuenta un costo de la leche de 0.44 USD/kg, y de alimentación de 0.26 USD/kg). En el caso de las nanopartículas; que son traídas desde Rusia, en promedio el litro de AgNPs tiene un costo de 300 USD, si tomamos en cuenta que se realizaran 3 aplicaciones por tratamiento, de 2.5ml cada una, el costo del tratamiento total por el medicamento es de 2.25 USD por vaca, que en pesos mexicanos equivale aproximadamente a \$50.00, lo que representa un costo significativamente menor.

Conclusión

Este fue un primer ensayo para evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en el tratamiento de infecciones uterinas en vacas, los resultados son alentadores, dado que las nanopartículas de plata, en el estudio *in vitro* causaron una reducción en el número de UFC, se sugiere una potencial función de eliminar los microorganismos presentes en la secreción uterina de vacas con metritis clínica. Adicionalmente, en el estudio *in vivo*, a pesar de haberse obtenido mejores resultados con el tratamiento convencional se logró la resolución exitosa de 7 de 10 animales tratados.

El tratamiento convencional sigue siendo más efectivo, ya que el 100% de los animales tuvo una resolución favorable, esto habría que contrastarlo con el costo del tratamiento que es más elevado que el del grupo de nanopartículas de plata, así también podría disminuirse el impacto económico que se presenta en los establos

por este padecimiento.

El uso de las nanopartículas de plata en combinación con otros antibióticos se ha descrito en otras investigaciones [Vázquez, 2017], sin embargo, en esta investigación no mostró beneficios en el tratamiento de la enfermedad.

Además, se sugiere ampliar los estudios de efectos de sinergia o antagonismo, entre las nanopartículas y los antimicrobianos.

Los resultados de este estudio sugieren que el uso de AgNPs requiere aún más investigación pero podrían ser un tratamiento que potencialmente podría usarse. Previo a su recomendación se hará necesario investigar que las nanopartículas no tienen efectos tóxicos sobre el embrión, su implantación y su desarrollo.

Referencias

1. Andrews A., Blowey R., Boyd H., Eddy R. Bovine Medicine, Diseases and Husbandry of Cattle. Segunda edición. Reino Unido: Blackwell Science. 2004.
2. Anjali D., Singh A. P., Chaudhary B. R., Sunil K. S., Debabrata D. Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae. Nano-Micro Lett. 2012;4(3): 158-165.
3. Hernández C.J. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros. México. 2012.
4. Guadarrama R. Efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata versus clorhexidina sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. [Tesis de maestría]. México: Universidad Autónoma del Estado de México. 2013.
5. Divers T., Peek S. Rebhun's Diseases of Dairy Cattle. Segunda edición. China: Saunders Elsevier. 2008.
6. Sánchez L., González C., Castañeda S. R., Pulido V. A., Guáqueta M. H., Aranda S. M., Rueda V. M. Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar) Revista MVZ Córdoba 2011;16(3): 2711-2720.
7. Kholoud M., Abou E., Ala'a E., Al-Warthan A., Ammar R.A.A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arabian Journal of Chemistry. 2010;3: 135-140.
8. Scott P., Penny C., Macrae A., Cattle Medicine. Londres (Inglaterra): Manson Publishing, 2011.
9. Siddhartha S., Tanmay B., Arnab R., Gajendra S., Ramachandrarao R., Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology 2007;18(22): 103-225.
10. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. Journal of Colloid and Interface Science 2004;275: 177-182.
11. Clerc P., Cordero F., Saldivia C., Vásquez L.A., García M.L. Abscesos faciales producidos por *Actinomyces pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) en un toro senepol. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. 2004;45(1): 1-8.

12. Villamar A., Enrique O., Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación General de Ganadería SAGARPA. México 2005.
13. Smith B. Medicina Interna de grandes animales. Cuarta edición. Barcelona: Elsevier España. 2010.
14. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología veterinarias. México (DF): UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Microbiología e Inmunología, 2003.
15. Quinn P.J., Markey B. K., Leonard F.C., FitzPatrick E.S., Fanning S., Harigan P.J. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Publishing, 2004.
16. Shkil N.A., Burmistrov V., Shkil N.N., Yushkov Y.G. Use of argovit product with silver content in veterinary. International Research Journal [Internet]. 2018. [citado 8 octubre 2020];4(46):68-70. Disponible en: <https://research-journal.org/en/vet-en/use-of-argovit-product-with-silver-content-in-veterinary/>
17. Azawi O. Postpartum uterine infection in cattle. Animal Reproduction Science. 2008;105: 187-208.
18. Purohit G., Ruhil S., Khicher V. Postpartum endometritis in dairy cows: current status of diagnosis, therapy and prevention. Theriogenology Insight. 2015;5(1): 1-23.
19. Smith B., Donovan G., Risco C., Little R., Young C., Stanker L.H., Elliott J. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. J Dairy Sci. 2009;81(6): 1555-62.
20. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consume [Internet]. FAO. 2004. [Consultado 15 Mayo 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y5468s/y5468s00.htm>
21. Lansdown A. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. Journal of wound care. 2002;11(4): 125-130.
22. Yuan Y., Peng Q., Gurunathan S. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. Int. J. Mol. Sci. 2017;18, 569. 1-22
23. Santos T., Caixeta L., Machado V., Rauf A. K., Gilbert R.O., Bicalho R.C. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in Arcanobacterium pyogenes isolated from the uterus of postpartum dairy cows. Veterinary Microbiology. 2010;145: 84-89.

24. Sheldon I., Bushnell M., Montgomery J., Rycroft A. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet Rec.* 2004;155(13): 383-7.
25. Beyene T. Veterinary drug residues in food animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J Veterinar Sci Technol.* 2016;7: 1.
26. Verástegui J. Determinación del perfil farmacocinético de la plata después de la administración de nanopartículas de plata en dos modelos animales [Doctor en Ciencias]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2014.
27. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Módulo 23: Uso de antibióticos en animales. Programa nacional de acreditación veterinaria. [Interne] Iowa. USDA. [Consultado 17 Septiembre 2020]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/369711739/NVAP-Mod23-Antibiotics-in-Animals-pdf>
28. Li P., Li J., Wu C., Wu Q., Li J. Synergistic antibacterial effects of β -Lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *IOP Publishing Ltd.* 2005;15: 1912-1917.
29. Vázquez M. Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos. [Doctor en Ciencias]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada; 2017.
30. Valdivieso G. Estudio de la actividad antimicrobiana de nano plata sobre mastitis subclínica bovina en la unidad productiva Tunshi. [Licenciada Bioquímica Farmacéutica]. Escuela superior politécnica de Chimborazo. 2010.
31. Prabhu S., Eldho K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects. *INL Journal.* 2012;2: 32.
32. Lima F., Vieira-Neto A., Snodgrass J., De Vries A., Santos J. Economic comparison of systemic antimicrobial therapies for metritis in dairy cows. *Journal of Dairy Sciencie.* 2019;102(8): 7345-58.
33. Heppelmann M., Krach K., Krueger L., Benz P., Herzog K., Piechotta M., Hoedemaker M., Bollwein H. The effect of metritis and subclinical hypocalcemia on uterine involution in dairy cows evaluated by sonomicrometry. *J Reprod Dev.* 2015;61(6): 565–569.
34. Nadworny P.L., Wang J.F., Tredget E., Burrell R.E. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine: NBM* 2008;4: 241-251.

35. Nefedova E. *et al.* AgNPs Targeting the drug resistance problem of *Staphylococcus aureus*: Susceptibility to antibiotics and efflux effect. *Pharmaceutics* 2022. 14, 763.
36. Orozco-Salas M. *et al.* Mechanisms of resistance to silver nanoparticles in endodontic bacteria: A literature review. *Journal of nanomaterials* 2019; 2019, 11.
37. Panáček A. *et al.* Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature nanotechnology* 2018; 13. 65-71.