



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE EXTRACTOS PLAQUETARIOS SOBRE BACTERIAS  
MULTIRRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS AISLADAS DE PIEL SANA DE  
DONADORES ASINTOMÁTICOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**Neri Johana Cruz Bolaños**

**CIUDAD DE MÉXICO 2018**





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.

## **JURADO**

### **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: Montiel Aguirre Jesús Fernando**

**VOCAL: Profesor: Mina Cetina Aleida**

**SECRETARIO: Profesor: Cruces Martínez Ana Lilia**

**1er. SUPLENTE: Profesor: Juárez Arroyo Elsi Ideli**

**2° SUPLENTE: Profesor: Ortega Muñoz Raquel**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ASESOR DEL TEMA: Montiel Aguirre Jesús Fernando**

**SUPERVISOR TÉCNICO: Ortega Muñoz Raquel**

**SUSTENTANTE: CRUZ BOLAÑOS NERI JOHANA**

# Índice

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes.....	18
Justificación.....	24
Hipótesis y objetivos.....	25
Materiales y métodos.....	26
Resultados.....	32
Análisis de resultados.....	50
Conclusión.....	54
Bibliografía.....	55

# Resumen

Desde la década de los 70's del siglo pasado, se observó que el suero de conejo contiene sustancias bactericidas que actúan sobre ciertas bacterias Gram-positivas. Estudios posteriores sugirieron que las plaquetas eran la fuente celular de esta actividad antibacteriana. Desde estos primeros estudios, numerosos investigadores han intentado aislar moléculas antimicrobianas plaquetarias. Ya para 1977 se describe un pequeño péptido antibacteriano a partir de plaquetas de conejo que fue liberado de los gránulos de plaquetas como resultado de la agregación plaquetaria inducida por trombina. En los 80's se informó de un péptido bactericida aislado a partir de suero de conejo sano. En esa misma década el extracto plaquetario se usó como adhesivo de fibrina, el cual aparece en el ámbito de la investigación en respuesta a la necesidad de mejorar los agentes hemostáticos y los adhesivos quirúrgicos, sobre todo en aquellos órganos en los que resulta muy difícil controlar el sangrado como hígado, riñones, cerebro, etc.

Con base a estos antecedentes, en este trabajo se planeó investigar el posible efecto antimicrobiano de extractos plaquetarios humanos sobre bacterias multirresistentes a antibióticos. Dichas bacterias serán aisladas de la superficie de piel sana de jóvenes voluntarios asintomáticos. Nuestra hipótesis es la de que dichos extractos plaquetarios tendrán un efecto sobre bacterias multirresistentes a antibióticos inhibiendo su crecimiento.

Para saber si la hipótesis es correcta, se hicieron los siguientes experimentos: se tomaron las muestras de piel de individuos asintomáticos y se sembraron en medios para que las bacterias se multiplicaran y activaran su metabolismo, luego se purificaron en medios sólidos, posteriormente se aplicaron antibiogramas a todas las cepas y se escogieron las 5 cepas con alta resistencia a antibióticos. A estas se les aplicaba el extracto de proteínas de plaquetas y se observó que afectaba el crecimiento de manera bacteriostática. Se pensó que el efecto bacteriostático era por las proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en el extracto plaquetario por lo que se realizó una electroforesis para saber si ocurría lo que se sospechaba. Los resultados mostraron que posiblemente las proteínas responsables del efecto bacteriostático son unas proteínas de bajo peso molecular llamadas kinocidinas, pertenecientes al sistema inmune innato.

## **Introducción**

### **Composición de la sangre**

La sangre circula por todos los tejidos, transporta nutrientes y también productos de eliminación.

Un ser humano adulto promedio llega a contener entre 5 y 6 litros de sangre y casi la mitad de ese volumen está ocupado por tres tipos de células sanguíneas: eritrocitos (glóbulos rojos), cargados de hemoglobina y especializados en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono; en una cantidad mucho menor, leucocitos (glóbulos blancos) de diferentes tipos, esenciales para el sistema inmunitario que defiende al organismo contra infecciones; y plaquetas, que participan en la coagulación sanguínea para evitar la pérdida de sangre en las lesiones. La parte líquida es el plasma sanguíneo, que contiene un 90% de agua y un 10% de solutos (Lehninger, 1992).

Una vez que se centrifuga, la sangre puede separarse en plasma sanguíneo y células. Un 10% del plasma sanguíneo son solutos, de los que a su vez, un 10% son sales inorgánicas, un 20% moléculas orgánicas pequeñas y un 70% proteínas plasmáticas. En la sangre las células se encuentran aproximadamente en las siguientes proporciones: eritrocitos en un 90%, leucocitos en un 7% y las plaquetas en un 3%.

### **Plasma**

La porción líquida de la sangre, el plasma, es una solución que contiene gran cantidad de iones, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas que se encuentran en tránsito en diversas partes del cuerpo o ayudan al transporte de otras sustancias. El volumen normal del plasma es aproximadamente el 5% del peso corporal o cerca de 3.5 litros en un varón de 70 kilogramos. Cuando el plasma se pone en reposo, este coagula, a menos que se ponga en contacto con algún anticoagulante. Si se extrae sangre del organismo dejándose coagular y el coagulo que se forma se retira, el líquido restante es suero.

La composición química del plasma es muy compleja ya que en el plasma pueden existir las siguientes especies: lipoproteínas, nutrientes, metabolitos, productos de desecho,

iones inorgánicos y hormonas. Más de un 70% de los sólidos del plasma son proteínas plasmáticas. Las principales proteínas plasmáticas incluyen inmunoglobulinas (anticuerpos circulantes), seroalbúmina, apolipoproteínas implicadas en el transporte de lípidos (como VLDL, LDL, HDL), transferrina (transporta hierro), y proteínas para la coagulación sanguínea como el fibrinógeno (este en pequeñas fracciones) y la protrombina así como albúmina y globulina. Las fracciones proteínicas se pueden separar y caracterizar por su velocidad relativa de sedimentación en la ultracentrifugación o por su velocidad de migración en un campo eléctrico; a esta técnica se le conoce como electroforesis (Ganong, 1993).

## **Plaquetas**

Las plaquetas son cuerpos granulosos de 2 a 4 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro. Hay aproximadamente 300,000 por microlitro ( $\mu\text{L}$ ) de sangre circulante y en condiciones normales su vida media es de casi 4 días. Los megacariocitos (células gigantes de la médula ósea) forman plaquetas al desprenderse de fragmentillos de citoplasma y expulsarlos hacia la circulación. La producción de plaquetas está regulada por los factores estimulantes de colonia que controlan la producción de megacariocitos. Entre el 60 y 75% de las plaquetas expulsadas por la médula ósea se encuentra en la sangre circulante mientras que el resto se encuentra en el bazo.

Las plaquetas, además de su función de hemostasia, contienen varios factores de crecimiento que han sido sintetizados por el megacariocito, recogiendo además durante su recorrido sanguíneo proteínas plasmáticas que almacenan en su interior. Estos factores de crecimiento son liberados en las zonas donde hay daño tisular, al romperse las plaquetas y liberar su contenido al exterior (Santonja, F. & Pastor, A., 2009).

Las plaquetas cuentan con un anillo de micro túbulos alrededor de su periferia que contiene actina y miosina. Cuentan también con glucógeno, lisosomas y dos tipos de gránulos: gránulos densos, que contienen las sustancias no proteínicas que se secretan como la reacción a la activación plaquetaria, entre ellas serotonina y ADP y otros nucleótidos de adenina, y gránulos  $\alpha$ , que contienen proteínas secretadas distintas a las hidrolasas de los lisosomas. (Ganong, 1993)

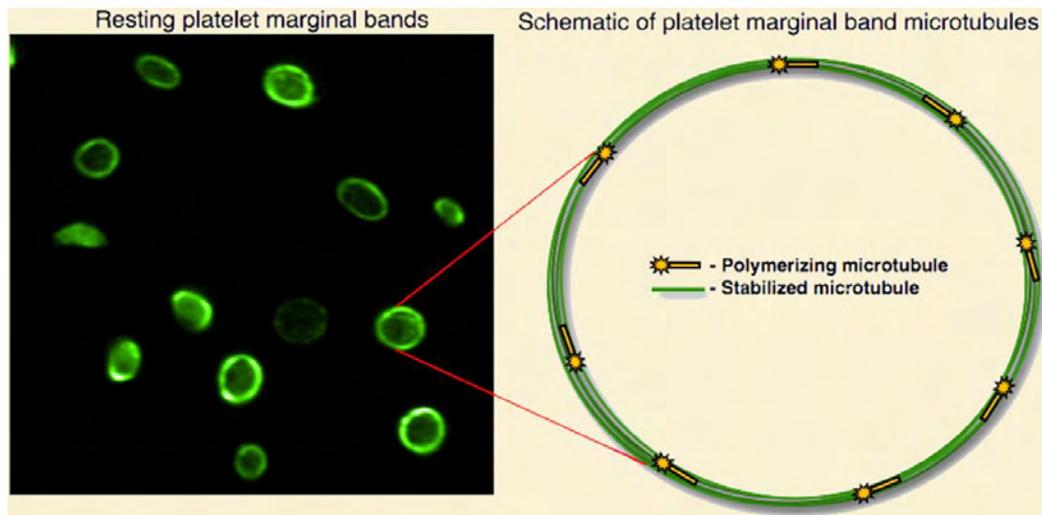


Figura 1. Bandas plaquetarias.

En esta figura se puede observar al anillo de un micro túbulo en la periferia de la plaqueta. ( Ravid, 2008)

<https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137786>

Las plaquetas tienen una membrana invaginada ampliamente con un sistema de conductillos. Cuando se activan de manera adecuada se acumulan en el sitio de lesión (agregación plaquetaria), cambian de forma, emiten pseudópodos y secretan el contenido de sus gránulos a través de los conductillos (liberación plaquetaria). Todo ello sucede *in vivo* durante el proceso de cicatrización.

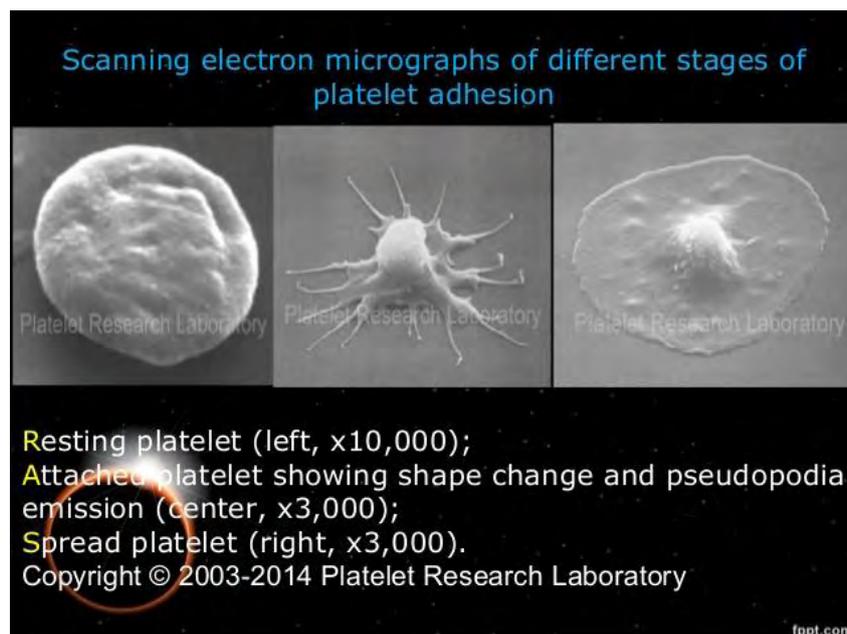


Figura 2. Estados de adhesión plaquetaria.

Se presentan los diferentes estados de adhesión plaquetaria. Las tres formas son muy diferentes a pesar de que todas provienen de plaquetas.

Las fibras de colágeno, ADP y trombina son factores que activan a las plaquetas *in vivo*. La agregación también es fomentada por el factor de activación plaquetaria, una citosina secretada por neutrófilos y monocitos así como por plaquetas. Este compuesto es un éter fosfolipídico, 1-alkil-2-acetilgliceril-3-fosforilcolina. Cuando se lesionan las paredes de los vasos sanguíneos, los receptores que hay sobre la superficie de las plaquetas entran en interacción con el colágeno expuesto y se adhieren al sitio de lesión. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de moléculas adhesivas que unen a las células entre sí. La reacción activa la fosfolipasa C y el diacilglicerol que se forma estimula a las plaquetas para que expulsen el contenido de sus gránulos. (Ganong, 1993). De manera análoga sucede con el  $\text{CaCl}_2$ , el cual activa a las plaquetas *in vitro*, permitiendo que éstas expulsen su contenido.

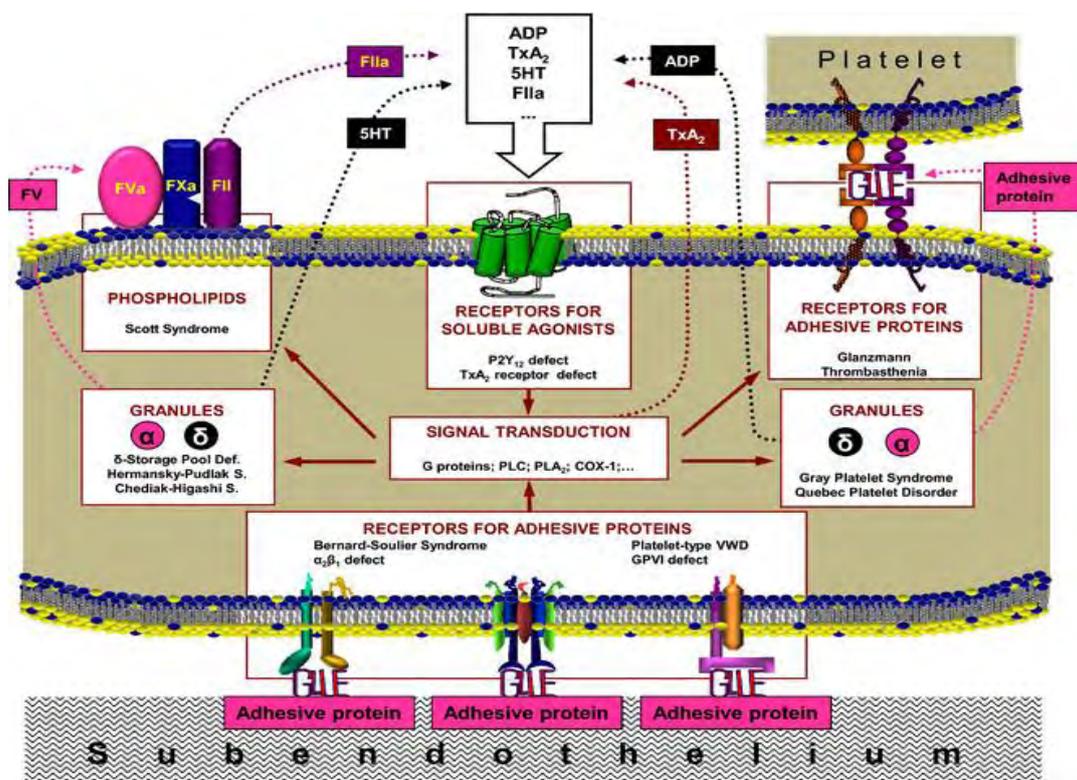


Figura 3. Esquema de reacción de adhesión plaquetaria (Dovlatova, N. 2015)

Este esquema muestra la activación de una plaqueta, para tener poder de adhesión en tejido dañado.

### ¿Qué es el Plasma rico en factores plaquetarios (PRP)?

Debido al gran interés que se tiene por el plasma rico en plaquetas (PRP) por su facilidad

para mejorar la respuesta de curación de los tejidos lesionados, se han desarrollado y comercializado diferentes métodos creados para concentrar a las plaquetas del plasma.

Aunque todas las técnicas se han clasificado con el nombre de plasma rico en plaquetas, este nombre tal vez no es el más adecuado ya que la composición exacta del concentrado de plaquetas puede variar. Por ejemplo, algunos concentrados de plaquetas tienen leucocitos, otros activan la cascada de coagulación con trombina o con cloruro de calcio, dando como resultado grandes variantes en eficacia. También la variación en el volumen inicial de sangre influye mucho en la concentración de plaquetas. Consecuentemente, cambia de gran manera la concentración de los factores de crecimiento y así es como los productos de PRP pueden ser muy diferentes entre sí. (Gobbi, G., & Vitale M., 2012).

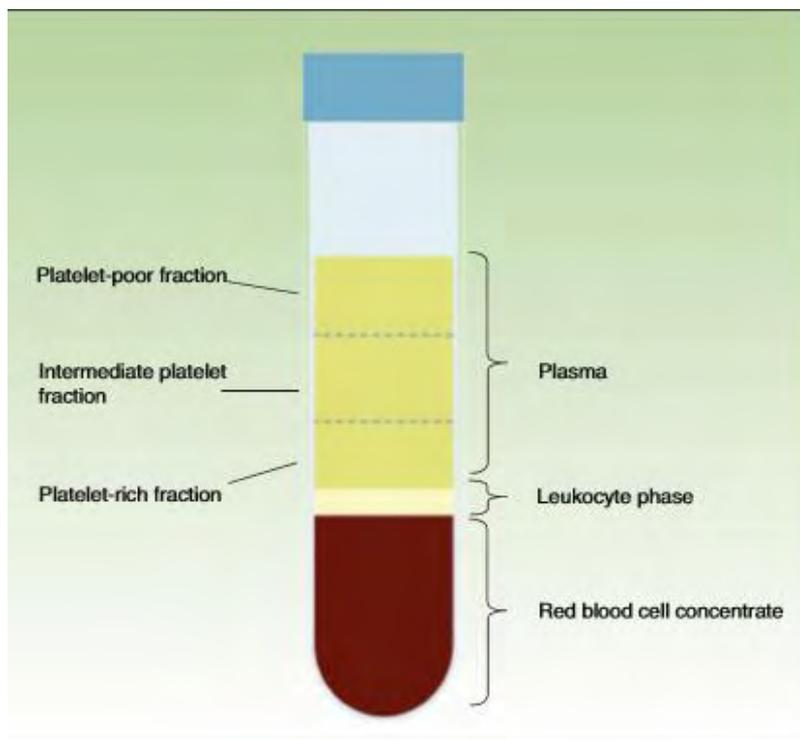


Figura 4. Esquema de tubo con muestra sanguínea centrifugada.

Esta ilustración muestra en forma de esquema las diferentes fracciones del suero en cuanto a concentración de plaquetas.

EL PLASMA RICO EN FACTORES PLAQUETARIOS es un nombre utilizado para un volumen de plasma que contiene una concentración de plaquetas mayor de 300-350.000 plaquetas/ $\mu$ L (que es la concentración aproximada de plaquetas en sangre circulante),

pero que además no contiene leucocitos y no utiliza trombina bovina para coagular, pero existen diferentes técnicas que pueden incluir algunos otros componentes de la sangre en el plasma o trombina bovina para empezar la cadena de coagulación. Es por eso que es necesario delimitar el concepto de plasma rico en factores plaquetarios y entre los nombres propuestos para los diferentes tipos de plasma ricos en plaquetas están: plasma rico en factores plaquetarios (PRP), plasma rico en factores plaquetarios con alta concentración de leucocitos (L-PRP), fibrina pura rica en plaquetas y leucocitos-fibrina rico en plaquetas. Se ha comprobado que para que se produzca la máxima eficacia tiene que haber una concentración plaquetaria mayor de un millón de plaquetas por microlitro. (Santonja, F., & Pastor, A., 2009)

P- PRP	P- LRP	P- PRF	Leucocitos y plaquetas Ricos en fibrina (L-PRF)
Arthrex Inc. (Naples, FL, Preparación rica en factores Plasma autólogo Condicionado (ACP™) De crecimiento (PRGF) Instituto de Biotecnología (San Antonio, Alava España)	Tecnologías Harvest (Plymouth, MA, USA) Biológicos Biomet Smartprep®2 (Warsew, IN, USA) Magellan™ Sistema Medico Ateriocitos (Cleveland, OH, USA) Symphony™ II Depuy (Warsaw, IN, USA) Sistema de colección para Concentrar plaquetas (PCCS® II) 3/Innovaciones en implantes (Palm Beach Gardens, FL, USA) Angel® Sorian Group (Milan, Italia) Genesisi CS EmCyte (Fort Myers, FL, USA) Cell Save ® 5 Haemonetics (Braintree, MA, USA)	Fundación de Transplantes musculoesqueleticos (Edison, NJ, USA) Cascade® PRGF estructura Instituto de Biotecnología (San Antonio, Alava, España) FIBRINET® PRFM Empresas mèdicas cascada (Wayne, NJ, USA) Vivostat PRF® Vivostat A/S (Alleroed, Denmarck)	

Tabla 1. Nombres comerciales del PRP (plasma rico en plaquetas) (Steven, P., 2011).

En la tabla se presentan algunas formas comerciales del plasma rico en plaquetas.

Este plasma rico en factores plaquetarios contiene grandes cantidades de factores de crecimiento que son proteínas que desarrollan funciones esenciales en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos. Estas proteínas intervienen en la relación entre células y transmiten la información al interaccionar con los receptores celulares que están en la membrana celular. Son los encargados de desencadenar efectos biológicos como la migración celular, la proliferación y la diferenciación celular; procesos fundamentales para la reparación y regeneración de los tejidos. Estos factores de crecimiento se encuentran en el interior de las plaquetas y en otras partes del organismo.

Entre otras, encontramos las siguientes proteínas: PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; TGF beta: factor de crecimiento transformante beta; EGF: factor de crecimiento epidérmico. IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I. (Reyes, M., & Montero, & Cifuentes, & Zarzar, E., 2002)

En el plasma también se encuentra el factor tisular (TF) que es una proteína transmembranal: esta es la iniciadora de la cascada de coagulación. El TF se expresa constitutivamente en células peri vasculares y en células epiteliales aunque también se encuentra en la sangre, activando así a la cascada de coagulación. Es importante destacar que la expresión de TF se produce en grandes cantidades después de la exposición de monocitos a lipopolisacáridos bacterianos. El factor tisular se encuentra en forma de micro partículas que son pequeñas vesículas de tamaño variable (0,1-1 micras); estas se liberan de diferentes tipos celulares tras la apoptosis o la activación celular. (Lee R., & Barcel D., & William J., & Wang J., & Boles J., Manly D., & Key N., & Mackman N. 2012)

### **Mecanismo de acción antimicrobiana.**

Para que exista un mecanismo antimicrobiano entre las plaquetas y los patógenos hay dos caminos, ya sea por contacto directo o por la disminución de lugares en donde el microorganismo pueda adherirse y crecer; a este segundo camino se la llama indirecto.

Para que las plaquetas liberen su contenido se empieza con la agregación plaquetaria;

posteriormente, sigue la transición y la organización para llegar a la formación de microtúbulos, continuando con la degranulación de las plaquetas y por último la secreción de la matriz plaquetaria. Todo este proceso contribuye a la protección y defensa de los individuos. Dependiendo de las diversas bacterias, estos pasos fundamentales pueden diferir, lo que conduce a diversas formas de respuesta antimicrobiana. Esto podría influir de manera significativa en la defensa del huésped frente a la virulencia de patógenos diferentes.

Cuando las plaquetas se activan, estas liberan proteínas microbidas la mayoría de las cuales tienen una estructura homóloga con quimiocinas clásicas, por lo que se les llaman "kinocidinas", debido a su doble función como quimiocinas y efectores microbidas. Se sabe que en el PRP activado se encuentran: el factor plaquetario (PF), neutrófilos que activan proteínas (NAP), interleucinas (IL) reguladores de activación, células T y proteínas secretadas, pero también hay otros polipéptidos antimicrobianos contenidos en las plaquetas que parecen tener una estructura similar y la actividad microbicida. A medida que la posibilidad de desarrollar infecciones después de procedimientos invasivos o con el uso de dispositivos médicos aumenta, es un parámetro importante para el éxito en algunas cirugías (Mariani E, 2014).

Otra característica es que el uso del PRP permite el tratamiento de pacientes con sus propios factores de crecimiento y sus derivados, evitando así transmisión de infecciones y reacciones inmunológicas.

## **Anticoagulantes**

La tendencia de la sangre a coagularse es equilibrada en el organismo por reacciones limitantes que tienden a prevenir la coagulación dentro de los vasos sanguíneos y a desbaratar cualquier coágulo que llegue a formarse anormalmente. Estas reacciones incluyen la interacción entre el efecto agregador de plaquetas del tromboxano A<sub>2</sub> y el efecto antiagregador de la prostaciclina, que hacen que se formen los coágulos en el sitio cuando se lesiona un vaso, pero mantiene la luz del vaso libre de coágulos. (Ganong, 1993)

En el organismo, la heparina es un anticoagulante que se produce naturalmente. También un nivel plasmático de  $\text{Ca}^{2+}$  suficientemente bajo puede interferir con la coagulación de la sangre. Pero la coagulación puede limitarse *in vitro* si se retira  $\text{Ca}^{2+}$  de la sangre mediante la adición de sustancias, como oxalatos, que forman sales insolubles con  $\text{Ca}^{2+}$ , o bien agentes quelantes que fijan el  $\text{Ca}^{2+}$ . Los derivados de cumarina, como el dicumarol y la warfarina también son anticoagulantes eficaces. Inhiben la acción de la vitamina K y esta vitamina es cofactor necesario para la enzima que cataliza la conversión de residuo de ácido glutámico a residuos de ácido gamma carboxiglutámico. Seis de las proteínas implicadas en la coagulación requieren la conversión de varios residuos de ácido glutámico a residuos de ácido gammacarboxiglutámico antes de liberarse a la circulación y por tanto las seis son dependientes de vitamina K. (Ganong, 1993)



Figura 5. Muestra de sangre periférica.

### **Mecanismos de resistencia de las bacterias.**

Existen varias formas en las que un organismo puede mostrar resistencia a antibióticos. Por ejemplo, la resistencia intrínseca a un agente antimicrobiano por medio de un atributo inherente de la especie en particular; de hecho, todos los organismos poseen barreras naturales que impiden que un agente antimicrobiano alcance su diana. Podemos encontrar casos tales como son la resistencia natural de bacterias Gram-negativas a la vancomicina, ya que el medicamento no penetra la membrana externa de los microorganismos. Pero la resistencia también puede ser adquirida por medio de mecanismos de transferencia de material genético, disminución o aumento del flujo de salida de fármaco, neutralización del agente antimicrobiano por medio de enzimas,

alteración de la diana de manera que interfiera con el agente, y la eliminación de la diana del todo por la creación de nuevas rutas metabólicas (Betina, 2006).

Las bacterias pueden utilizar uno o varios mecanismos contra diferentes fármacos, y un simple cambio puede dar lugar a la resistencia a varias clases de fármacos diferentes, ya que las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tienen características estructurales diferentes. Tales diferencias determinan los mecanismos de resistencia primaria. Las dianas de la mayoría de los agentes antimicrobianos se encuentran ya sea en la pared celular, en el espacio entre la membrana y el citoplasma, o bien dentro del citoplasma.

Se sabe que uno de los métodos de adquisición de resistencia de las bacterias es por medio de dispersión o transferencia genética que está mediada por los plásmidos, transposones e integrones. (Oulette, 1987).

Los mecanismos de transferencia de material genético entre las bacterias son: la conjugación, la transducción y la transformación.

La conjugación es el proceso de transferencia genética que requiere contacto de célula a célula. Este mecanismo requiere de una bacteria donante conteniendo un plásmido conjugativo y una bacteria receptora que carece de él.

En la transducción el ADN se transfiere de una bacteria a otra por medio de un bacteriófago. En la transducción generalizada, un fragmento de ADN bacteriano, sea cromosómico o plasmídico, pasa a formar parte del ADN de la partícula viral madura en lugar del genoma original del virus. En la transducción especializada, el ADN de una región específica del cromosoma bacteriano se integra directamente en el genoma del virus. La transducción se ha encontrado en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas en arqueobacterias (Betina, 2006).

La transformación es un proceso por el cual el ADN libre se incorpora a una bacteria receptora competente y se lleva cabo una recombinación genética. Cuando una bacteria es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada genéticamente, se dice que es competente. Solo algunas cepas son transformables de manera natural, sugiriendo que puede ser una característica heredable. La transformación natural ocurre tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas (Cameron, 1986).

Después de adquirir resistencia a los antibióticos por medio de cualquiera de estos mecanismos, se cree que la principal causa del fracaso terapéutico es el notable aumento en la frecuencia de la resistencia bacteriana debida principalmente al abuso y mal uso de los antimicrobianos y que esto puede deberse a tratamientos de antibióticos inadecuados, ya sea por suministro de dosis o intervalos inapropiados, o por tiempo insuficiente y también por incumplimiento del paciente a las indicaciones del profesional médico. El aumento de la resistencia se debe a la selección de genes de resistencia a antibióticos y a su diseminación en la población bacteriana.

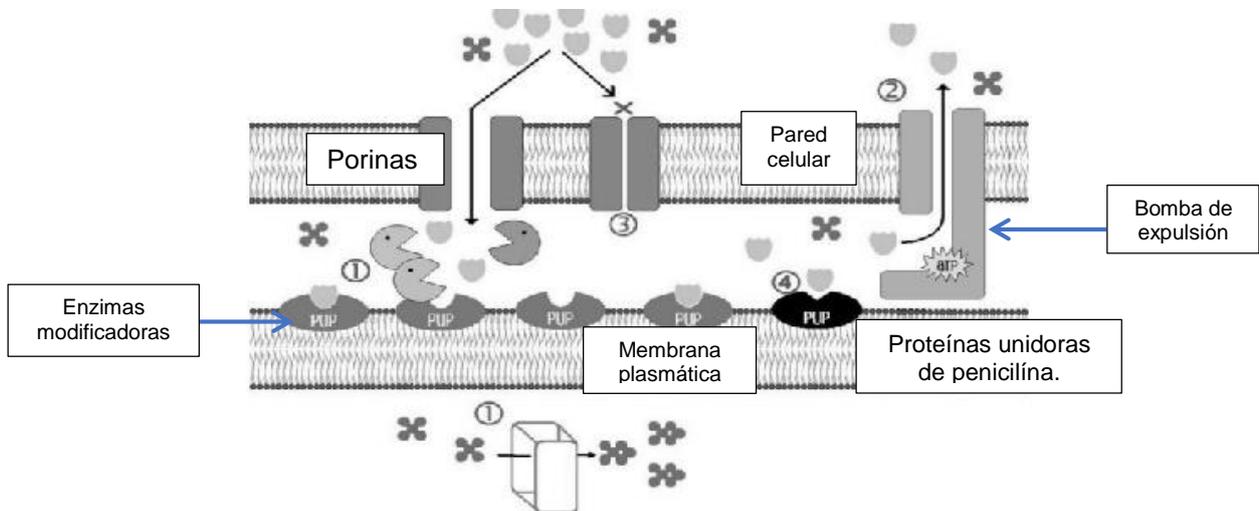
También se sabe que otra respuesta a la resistencia de las bacterias a los antibióticos es la sobre-expresión de las bombas de expulsión, ya que está comprobado que las bacterias pueden expulsar sustancias tóxicas para la células bacterianas. Las bombas de expulsión son los sistemas de transporte que sacan del interior de la célula al antibiótico evitando así que la afecte de alguna manera. Este mecanismo de resistencia se basa en que en la membrana hay proteínas que transportan moléculas con estructuras de una sola clase (específicas) o diferentes compuestos (multiespecíficas), siendo la expulsión un transporte activo secundario acoplado casi siempre a gradientes iónicos. (Patel, 2010)

Las bombas de expulsión juegan un papel muy importante en la resistencia a muchos agentes diferentes y parece ser que son el mecanismo predominante de la resistencia simultánea a varias clases de agentes antimicrobianos.

También existen otras enzimas que contrarrestan el efecto de los fármacos sobre las bacterias. Estas se encuentran tanto en la membrana citoplasmática como en el citosol y los mecanismos por medio de los cuales la concentración intracelular de fármaco se ve afectada pueden ser: disminución de la permeabilidad de la membrana externa, disminución de la absorción a través de la membrana citoplasmática y salida a través tanto de la membrana citoplasmática como de la membrana externa. Algunos ejemplos de ellas son las  $\beta$ -lactamasas y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos. (Patel, 2010)

La permeabilidad de la membrana externa de organismos Gram-negativos se atribuye a alteraciones en la membrana mediada por porinas. Este sistema de flujo es muy común entre los patógenos Gram-negativos.

También existe la resistencia mediada por una disminución de la absorción a través de la actividad metabólica en la membrana citoplasmática, pero en el caso de los aminoglucósidos este mecanismo parece ser menos importante. (Luke, 2011)



**Figura 6. Principales mecanismos de resistencia a antibióticos.** 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas unidas de penicilina, PUP. (Tafur, 2008)

## Conceptos

Aséptico:

Ausencia de microorganismos patógenos. Ausencia de materia séptica; estado libre de infección. Método de prevenir las infecciones mediante la destrucción o la evitación de los agentes infecciosos, en especial por medios físicos. También se denomina asepsis.

Bacteriostático:

Que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana; ésta se reanuda en cuanto se retira el agente causante de este efecto.

Bactericida:

Que posee la capacidad de matar a las bacterias, es decir, el microorganismo muerto no puede reproducirse aun cuando sea retirado del contacto con el agente. En algunos casos el agente puede causar lisis (ruptura celular) y en otros alterar irreversiblemente el metabolismo celular.

Estéril:

Exento de vida de cualquier tipo. Dicha esterilidad puede efectuarse por filtración, por tratamiento de microbicidas, o por contacto con calor. Dado que el criterio de muerte para los microorganismos es su incapacidad para reproducirse, el material estéril puede contener células microbianas metabólicamente inactivas (Brooks, 1996)

## Antecedentes

Desde la década de los 70's del siglo pasado, se observó que el suero de conejo contiene sustancias bactericidas que actúan sobre ciertas bacterias Gram-positivas. Estudios posteriores sugirieron que las plaquetas eran la fuente celular de esta actividad antibacteriana. Desde estos primeros estudios, numerosos investigadores han intentado aislar moléculas antimicrobianas plaquetarias. Ya para 1977 se describe un pequeño péptido antibacteriano a partir de plaquetas de conejo que fue liberado de los gránulos de dichas plaquetas como resultado de la agregación plaquetaria inducida por trombina (S. F., Carroll & R.J. Martínez, 1981). En los 80's se informó de un péptido bactericida aislado a partir de suero de conejo sano. También en los años 80 las plaquetas se usaron como adhesivo de fibrina, lo cual aparece en el ámbito de la investigación en respuesta a la necesidad de mejorar los agentes hemostáticos y los adhesivos quirúrgicos, sobre todo en aquellos órganos en los que resulta muy difícil controlar el sangrado como hígado, riñones, cerebro, etc. (Reyes, 2002)

El plasma rico en plaquetas (PRP) en forma de gel, fue utilizado para la colocación de injertos óseos en cirugía oral y maxilofacial originalmente propuesto por Marx en 1986. En los siguientes años, su uso fue en aumento por los excelentes resultados obtenidos, debido fundamentalmente a la capacidad que tiene de incrementar la regeneración ósea al ser utilizado junto con injertos de hueso autólogo y a que es relativamente fácil obtenerlo. Como se puede observar, el propósito inicial del uso del plasma rico en factores plaquetarios o PRP fue para la curación maxilofacial y plástica en cirugías en la década de 1990 (Mert 2015). Su uso en ortopedia se inició más tarde e incrementó en estudios clínicos donde el PRP fue utilizado en tendones, ligamentos, músculos, huesos y cartílagos.

Dentro de todas las aplicaciones clínicas a continuación se mencionarán las más utilizadas en la actualidad: reconstrucción de rebordes alveolares atróficos, elevación del seno maxilar, rellenando las cavidades quísticas post-quistectómicas, en exodoncias múltiples, para conservar la altura del reborde alveolar, en defectos óseos generados por

la desinclusión de caninos o terceros molares, en defectos óseos periapicales; después de una apicectomía, por ejemplo, regeneración ósea alrededor de implantes osteointegrados rellenando el defecto inmediatamente después de haber colocado los implantes, en reconstrucción de grandes defectos óseos después de una cirugía oncológica, etc. (Reyes, 2002)

Ya para el 2010 se conocen diferentes aplicaciones entre las que se encuentran: tratamiento para la artrosis, porque se halló que entre los beneficios del uso de PRP estaban la disminución de la rigidez articular hasta en un 41% y su efecto anabólico en el metabolismo del cartílago, deteniéndose la degradación del mismo y restituyendo el ambiente fisiológico en la articulación, inhibiendo la inflamación y así disminuyendo el dolor. (Mert 2015).

Es en el área de patologías tendinosas donde existe mucha evidencia científica, ya que se ha comprobado que el PRP induce la proliferación de los tenocitos y la síntesis de un potente factor angiogénico y un potente factor anti-fibrótico, promoviendo la angiogénesis y formación de células fibro-vasculares. En las roturas del tendón de Aquiles, sutura zonas adyacentes y por lo tanto se gana movimiento en el tobillo de manera más rápida.

En las patologías musculares, a pesar de que existió controversia respecto a su aplicación, se notó una disminución del tiempo de curación. Se aplica con la previa localización de la lesión con ecografía y eliminación del hematoma en la zona afectada.

Cirugía artroscópica, en el tratamiento de lesiones del cartílago articular, ya que favorece la regeneración de los tejidos y también se observó una recuperación más rápida de las lesiones, mejorando así el tratamiento.

Cirugía percutánea: se aplicó el PRP en las osteotomías, dando como resultado una recuperación más rápida y favoreciendo el proceso de formación del callo óseo.

Cirugía ortopédica: cuando hay falta de consolidación o cuando existe falta de unión de una fractura, cuando no hay cicatrización normal, o en cirugía protésica, permitiendo su rápida y adecuada osteointegración. (Gobbi, 2012)

Tratamiento emergente de BRONJ: por la eficacia de los bifosfonatos en el control de eventos relacionados con cáncer en esqueleto y fracturas en pacientes con osteoporosis y por su nivel relativamente bajo de toxicidad y eventos adversos, se usaron de manera generalizada los bifosfonatos. Sin embargo, a principios de 2001 se estableció una relación entre estos medicamentos y una nueva entidad de enfermedad caracterizada por necrosis de hueso que se aisló de mandíbula, a la cual se le llamó osteonecrosis relacionada con los bisfosfonatos de la mandíbula o del inglés Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ) (Ruggiero, 2009). Sólo se ha hecho un pequeño número de estudios de observación; se investigaron resultados positivos que parecen estar relacionados con factores de crecimiento, así como la secreción de citocinas que estimulan la curación. Los estudios están en busca de propiedades regenerativas en la combinación de MSC (células madre mesenquimales) con PRP. La investigación en la regeneración ósea se centra en el potencial de diferenciación osteoblástica. Modelos bien establecidos han sido publicados por su aparente gran eficacia. (Barba-Recreo, P., & Del Castillo Pardo, JL., & Georgiev-Ristov, T., & Ruiz, E., & Abarategi, A., & Burgueño, M., & García, M. 2015)

Necrosis de la piel posterior a una intervención quirúrgica: después de un minucioso desbridamiento y eliminación de la infección se aplicó el PRP en forma de coágulo, ayudando a la rápida cicatrización, siendo de gran utilidad en zonas poco irrigadas o con patologías asociadas a la diabetes.

Regeneración facial: puesto que se ha observado su efecto en regeneración tisular, se han hecho estudios comparando los resultados de la aplicación del PRP intradérmico con la aplicación de ácido hialurónico. Los resultados muestran que ambos son efectivos, pero son más satisfactorios y prolongados los resultados obtenidos con el PRP. Los pocos estudios que han evaluado el beneficio clínico del PRP sobre el envejecimiento de la piel utilizan reportes de resultados en gran medida subjetivos (por ejemplo, la satisfacción del paciente o bien el médico hace comparación de fotografías). El PRP también se utiliza en la cirugía plástica y dermatológica, en procesos que requieren el uso de curación acelerada, mejorar el sellado mediante la eliminación de espacio muerto, disminuir el sangrado y la necesidad de drenaje, reducir el edema y el dolor post-operatorio. (Conde, E., & Fernández, ME., & Suárez, R., 2015)

Tratamiento en quemaduras: Las quemaduras profundas de segundo grado (DSDb) involucran a todas las capas de la epidermis, incluidas las láminas basales. En general, DSDb se cura con amplias áreas de cicatrización. Se estudió de manera monitoreada la curación de DSDb mediante biopsias secuenciales después del tratamiento con PRP y se evaluó mediante un microscopio electrónico de barrido. Se realizó un experimento sometiendo a cuatro caballos en dos grupos, G1 y G2, y los grupos recibieron 1 y 2 tratamientos de PRP, respectivamente. Los grupos de control se trataron con solución salina. Las DSDb se hicieron mediante la imposición de hierro caliente después de la disección de la epidermis y se realizó una biopsia 5, 15, 25 y 40 días después del tratamiento con PRP, y las recolecciones de hisopos se realizaron 30 días después del tratamiento con PRP. En el día 25, el grupo G1 mostró una mayor cantidad de fibrillas en comparación con el grupo control tratado con solución salina, y la organización de G2 fue similar a la del tejido no lesionado. En el día 40, G1 se asemejaba a tejido intacto y G2 mostraba tejido denso. Todos los grupos tenían contaminación bacteriana pero no infección. PRP aceleró la reparación, indujo fibrosis y probablemente proporcionó actividad antibacteriana en caballos con DSDb. Mediante la microscopía electrónica de barrido se observó el aumento de la velocidad de reparación de la matriz extracelular. Además, se cree que el efecto antibacteriano del gel de PRP en las heridas de los caballos ayudó a una mejor cicatrización ya que se prevenía la contaminación. (Maciel, F., & De Rossi, R., & J.C. Módolo, T., & C., R. 2012)

La Agencia Española de Medicamentos y Productos para la salud (AEMPS) emitió un informe en mayo de 2013 y creó un marco para la utilización de PRP en España con las obligaciones de los fabricantes y la información que los pacientes tratados con PRP deben recibir. Tal documento reconoce al PRP como un producto farmacéutico. (Conde, E., & Fernández, ME., & Suárez, R., 2015)

En la actualidad el plasma rico en plaquetas (PRP) se promueve como un producto derivado de la sangre autóloga que puede ser aplicado exógenamente a los distintos tejidos, donde libera altas concentraciones de factores de crecimiento derivados de las plaquetas que mejoran la cicatrización de heridas, curación del hueso y curación de tendones. Además, se sabe que el PRP posee propiedades antimicrobianas que pueden contribuir a la prevención de infecciones.

En 1928 se descubrió a la penicilina de forma accidental por Alexander Fleming y en 1940 Florey y Chain la usaron en tratamientos en seres humanos. En esos años en los que se comenzó a utilizar a la penicilina como antibiótico, ya el 10% de los aislamientos de *Staphylococcus aureus*, eran resistentes al antibiótico; a los seis años los aislamientos resistentes representaban el 60% y actualmente más del 90%.(Betina, 2006)

Se puede decir que las bacterias son multirresistentes a antibióticos si estas son resistentes a tres o más familias de antibióticos, a los que por lo general son habitualmente sensibles. Se sabe que las bacterias se hacen multirresistentes a antibióticos por llevar un tratamiento de manera inadecuada o bien por iniciar la terapia con antibióticos tardíamente. Estas consideraciones son válidas para la gran mayoría de cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos, teniendo impacto negativo en áreas como la salud y la economía. (Zaragoza, R., & Ramírez, P., & López-Pueyo, MJ. 2010)

La utilización a gran escala de antibióticos en el medio hospitalario y en la comunidad genera la selección de bacterias que resisten a varios antibióticos; estas bacterias son conocidas como bacterias multirresistentes. Este fenómeno demuestra la importancia de descubrir y conocer nuevas alternativas para atacar a las bacterias con medios distintos a los antibióticos (Betina, 2006). Una de las estrategias más prometedoras que se ha explorado es el uso de péptidos antimicrobianos, ya que entre las cualidades importantes de estos péptidos se encuentra que son cortos, hidrofóbicos o anfipáticos y en la mayoría de los casos tienen una carga neta positiva. Estos péptidos se pueden encontrar en el cuerpo humano y forman parte de la inmunidad innata. (Zaragoza, R., & Ramírez, P., & López-Pueyo, MJ. 2010)

Aparentemente, este tipo de péptidos puede neutralizar una gran variedad de microorganismos tanto Gram-positivos como Gram-negativos. Esto parece llevarse a cabo perturbando la estabilidad de la envoltura celular ya que los microorganismos contienen en la membrana ácido lipoteicoico o lipopolisacáridos. Existe evidencia de que las plaquetas tienen funciones antimicrobianas (Bielecki, T.M., & Gazdzik, T.S. 2007) por lo que los péptidos que se encuentran en las plaquetas son candidatos adecuados para investigarse como agentes antimicrobianos; algunas de sus características fisicoquímicas tales como una estructura secundaria con carga neta positiva y naturaleza anfipática podrían afectar de manera notable la sobrevivencia de la bacterias. (Nuri, R., & Shprung,

T., & Shai, Y., 2015)

Como se ha mencionado con anterioridad, en las plaquetas se encuentra una gran variedad de proteínas, ya que se han estudiado hasta 800 proteínas diferentes con propiedades antibacterianas y fungicidas, factores de coagulación y glicoproteínas de membrana. Además, en los gránulos densos de las plaquetas también se almacenan adenosin difosfato (ADP) y adenosin trifosfato (ATP), que intervienen en la homeostasis del organismo. (Fortier, L., & Hackett, C., & Cole, B. 2011)

Formulaciones del plasma rico en plaquetas: modalidades de obtención.

Algo muy importante al usar el PRP es que por su versatilidad se podría decir que existen tres formulaciones diferentes con potencial terapéutico. Estas dependen de la coagulación y el grado de activación de las muestras. Estas formulaciones pueden ser utilizadas para diversos propósitos terapéuticos:

1. Como andamiaje. La malla de fibrina es una estructura tridimensional, esto es, como un andamio, y se puede utilizar en diversas aplicaciones tales como el tratamiento de úlceras, cierre de una herida, etc. permitiendo la proliferación celular, ya que contiene factores necesarios para el crecimiento y la migración de las células. Esta formulación puede ser combinada con ciertos materiales. (Citterio, 2016)

2. También se puede obtener en forma líquida y activarse en el momento de uso. Se utiliza parenteralmente para las articulaciones que han pasado por cirugía; en tratamiento de trastornos de piel, la regeneración de la piel y activación superficial de implantes mediante la producción de una capa activa en la superficie. (Citterio, 2016)

3. De la misma manera, se encontró que el suero plasmático contiene alta concentración de plaquetas que se puede utilizar como colirio para tratar patologías como el síndrome del ojo seco (*keratoconjunctivitis sicca*) y otros defectos de la córnea. Al final del proceso de la coagulación, la malla de fibrina se retrae. Es en esta etapa en que la membrana de fibrina se puede manipular con pinzas o similares instrumentos para obtener una membrana elástica, densa y suturable. Es una excelente herramienta para sellar heridas después de una extracción dental y para promover la regeneración del tejido. (Citterio, 2016).

## **Justificación**

Existe una profunda preocupación entre los expertos mundiales de la salud por el avance y propagación de bacterias multirresistentes a antibióticos que, cuando producen cuadros infecciosos en humanos, frecuentemente no es posible darles un tratamiento efectivo con lo que el número de muertes por procesos infecciosos va en aumento aún en los países desarrollados. Derivado de ello, existe el temor de que dentro de algunos años la sociedad haya regresado a una etapa similar a la de pre-antibióticos por lo que la búsqueda de nuevos compuestos antibacterianos se está tornando en una actividad urgente y prioritaria.

Por lo expuesto en los antecedentes, resulta claro que los extractos plaquetarios parecen poseer actividad antimicrobiana que en ciertas circunstancias podría ser utilizada para el tratamiento de infecciones que no responden a los antibióticos usuales. En ese sentido, es que un trabajo de esta naturaleza se encuentra plenamente justificado.

## **Hipótesis**

Existen dentro de las plaquetas humanas péptidos que pueden tener un efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias multi-resistentes a antibióticos y que podrían llegar a ser utilizados en algunos procesos infecciosos recalcitrantes a tratamientos tradicionales con antibióticos.

## **Objetivos:**

Objetivo general:

1. Observar el efecto de péptidos extraídos de plaquetas humanas sobre bacterias multirresistentes a antibióticos obtenidas de la superficie de la piel de voluntarios asintomáticos.

Objetivos particulares:

1. Determinar si alguno de los péptidos liberados por las plaquetas humanas tiene efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias multirresistentes a antibióticos.
2. Estudiar a péptidos liberados por plaquetas humanas en geles de poliacrilamida.
3. De acuerdo a la literatura, tratar de determinar si alguno de los péptidos observados en los geles de poliacrilamida podría ser el responsable del efecto antibacteriano.

## **Materiales y métodos.**

### **Aislamiento de cepas bacterianas puras**

Se recibieron 70 muestras tomadas de individuos asintomáticos adolescentes, de zonas representativas de la piel, es decir, de una zona seca, de una zona grasa y de una zona húmeda. Posteriormente, estas muestras se pusieron en medios adecuados para su transporte hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se sembraron en medio caldo Luria, durante 24 horas para estimular su proliferación. Cuando pasaron las 24 horas después de la siembra, se tomaron 200 microlitros del medio y se hizo una resiembra en 3 mL de medio luria, repitiendo este procedimiento dos veces más. Las muestras fueron almacenadas durante 3 meses a baja temperatura por lo que, para reactivar su metabolismo, fueron nuevamente resembradas secuencialmente como se mencionó líneas arriba.

Cada muestra se resembró en medio manitol sal agar (MSA) y McConkey, hasta obtener aislamiento de colonias puras.

### **Realización de antibiogramas**

Se tomó una colonia pura de cada muestra, asegurando su pureza con una tinción al Gram y su visualización al microscopio.

A cada muestra pura se le realizó un antibiograma, en el cual se probaron 12 antibióticos (ampicilina, cefalotina, cefotaxima, ciprofloxacino, clindamicina, dicloxacilina, eritromicina, gentamicina, penicilina, tetracilina, sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina). Se eligieron estos antibióticos porque son representativos de las familias de cada generación de antibióticos.

Para hacer esto se hizo una resiembra masiva de 0.5 de concentración en escala MacFarland en medio Hinton Muller, poniendo dentro al antibiograma y dejando incubar por 24 horas a 37 °C.

Luego se observó si las cepas eran sensibles o resistentes a los diferentes antibióticos, dependiendo de si presentaban halo de inhibición o no. Si lo presentaban, este tenía que ser mayor a 1.5 cm de diámetro para que la cepa se tomara como sensible al antibiótico; si el halo no presentaba esta característica o era inexistente, entonces la cepa se consideraba resistente al antibiótico.

Cabe mencionar que después de analizar los resultados obtenidos de los antibiogramas, sólo se escogieron las 5 cepas que tenían resistencia a mayor cantidad antibióticos analizados, se consideran más resistentes porque presentaron mayor cantidad de halos de más de 1.5 cm.

Se realizaron pruebas bioquímicas después de observar la tinción de Gram (catalasa, coagulasa, glicerol, melibiosa, arabinosa, tetrazolium a pH 6.0, tolerancia al telurito de potasio al 0,04%) para la identificación de las cepas elegidas para trabajar.

### **Obtención de sangre periférica**

Se obtuvo sangre venosa por medio de una punción en brazo, en una de las venas situadas en la fosa cubital, desinfectando la zona con una torunda con alcohol, pasándola por la zona de interés con movimiento circular de adentro hacia afuera una sola vez, se hizo un torniquete en la parte media del antebrazo, luego se extrajo sangre con una jeringa de 5 mL, en zona aséptica. Inmediatamente se depositó la sangre en un tubo estéril de 13X100, en el cual anteriormente se habían puesto 500µL de citrato de sodio, el cual funciona como anticoagulante. Las muestras se obtuvieron de tres donadores diferentes. No se realizó conteo de plaquetas ni análisis de otro tipo a la sangre donada, que para los fines de este experimento no era necesario.

### **Obtención de plasma rico en factores plaquetarios.**

El tubo con la sangre y anticoagulante se centrifugó a 600 rpm (40 RCF) durante 10 minutos. Posteriormente se separó el suero con una micropipeta de 200 µL, con precaución de nunca tocar células rojas ni blancas, evitando así que se revolvieran con el suero separado por medio de la centrifugación. El suero separado se puso en un tubo de 13X100, para su posterior uso, todo esto en zona aséptica.

El suero extraído debe de usarse en un tiempo máximo de 3 horas después de haberse obtenido. (Santonja, 2009)

### **Ruptura plaquetaria y efecto antimicrobiano de péptidos.**

En una zona estéril, se tomó un tubo de 13X100 y se depositaron: 250  $\mu\text{L}$  de medio caldo Luria, 50 $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{CaCl}_2$  (cloruro de calcio) cuya concentración fue al 50%, más 250  $\mu\text{L}$  de suero y 250  $\mu\text{L}$  de medio caldo Hinton Mueller, inoculado con bacterias multirresistentes a antibióticos en una concentración de  $1 \times 10^6 \text{UFC/mL}$  de células por cada tubo. Para comparar los resultados, a la par se hizo un control con las mismas cantidades de todos los reactivos excepto el suero que tenía las plaquetas y así observar el crecimiento sin el efecto plaquetario. Después se midió el crecimiento bacteriano con un fotómetro (Densimat) y se registró cada resultado. Esto se realizó durante las primeras 8 horas, cada 2 horas.

### **Protocolo de Lowry TCA (Peterson, 1997)**

A la muestra y a la curva patrón (5 a 40  $\mu\text{g}$  de albúmina de suero bovino, BSA) se le agregó 1.0 mL de agua destilada, luego se agregaron 0.1 mL de desoxicolato de sodio (DOC) al 0.15%, recordando guardar el stock en el refrigerador. Posteriormente, se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente, agitando en vortex cada 5 minutos; se agregaron 100 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 72% y se dejó incubar durante 10 minutos a 4° C. Luego se centrifugó a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 $\mu\text{L}$  de agua destilada más 2.5  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sodio (NaOH) 2N. Se agregaron 0.8 mL de la mezcla A:B Lowry (A 50:1 B), se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación fueron agregados 0.5 mL de reactivo de Folin (1:1) con agua, se volvió a incubar 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 660 nm o 750 nm.

### **Preparación de los geles para SDS-PAGE (Laemmli, 1970)**

Las cantidades que se detallan a continuación funcionan para el sistema de mini geles de Bio-Rad (Mini-Protean II). Estas pueden adaptarse para otras cámaras de diversa

capacidad, conservando las proporciones.

Para la preparación de gel separador o inferior (5 mL grosor =0,75 nm), mezclar los siguientes reactivos, según el porcentaje de gel deseado, en tubo de 50mL:

Componente	Concentración final						unidad
	20%	15%	12%	10%	7,5%	5%	
Agua desionizada	367	1167	1683	2000	2367	2783	μL
Amortiguador separador	1250	1250	1250	1250	1250	1250	μL
SDS	50	50	50	50	50	50	μL
Acrilamida/bis acrilamida	3333	2500	2000	1667	1250	833	μL

Tabla 2. Porcentajes para preparar el gel para SDS-PAGE.

1. Se preparó el molde para el gel y se hizo una marca a 1-1,5cm debajo del nivel del peine de muestras. Se retiró el peine.
2. Posteriormente se agregó: 15μL de persulfato de amonio, agua desionizada, amortiguador del gel superior, SDS, acrilamida/bisacrilamida y por último el TEMED. Inmediatamente, la mezcla se agregó al molde y con una piseta con agua destilada se llenó el espacio que sobró del molde para gel hasta el borde, se esperó a que polimerizara el gel, entre 15 a 30 min.
3. Una vez que se esperaron 15 minutos adicionales, se notó la división interfase entre el agua y el gel. Luego se decantó el agua destilada.
4. Se prosiguió a mezclar los componentes en un tubo de plástico, para la parte

superior del gel (gel concentrador):

Componentes	Cantidad
Agua desionizada	1,5mL
Amortiguador superior	630 $\mu$ L
SDS	33 $\mu$ L
Acrilamida/bisacrilamida	330 $\mu$ L
Persulfato de amonio	10 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L

Tabla 3. Componentes del gel concentrador.

- Una vez agregados los catalizadores, se mezcló y vertió de inmediato en el molde, poniendo el peine rápidamente de manera horizontal, sin atrapar burbujas, dejando polimerizar entre 15 a 30 minutos.
- Se retiró el peine con mucho cuidado, luego se lavó cada pozo con agua destilada, quitando burbujas y residuos inconvenientes.
- Las muestras se depositaron en un trozo pequeño de papel encerado, con ayuda de una micropipeta de 50 $\mu$ L y fueron depositados 40  $\mu$ L de plasma rico en factores plaquetarios más 10  $\mu$ L de amortiguador.
- Se cargaron las muestras en los pozos del gel de poliacrilamida, recordando cargar también uno de los pozos con el marcador de peso molecular.
- Luego se llenó la cámara con el amortiguador de cámara.
- Se colocó el gel en la cámara y se corrió a 180 volts, teniendo atención de que las muestras corrieran todo el gel y con precaución de que no salieran de él.
- Posteriormente se sacó el gel y se sumergió en fijador durante 15 minutos, en un

recipiente tapado (evitando los vapores tóxicos del metanol), con agitación suave.

12. Para teñir el gel con azul de Coomassie R-250, el gel fue sumergido en un recipiente con 50 mL de azul de Coomassie (2.5 g de Coomassie Blue, 50% metanol, 10 % ácido acético, 45% agua), en microondas durante un minuto, evitando que ebuliera el líquido.

13. Fue quitado el exceso de colorante depositando el gel en solución desteñidora (200 mL de metanol, 150 mL de ácido acético, 650 mL de agua) durante 1 hora con agitación constante suave.

14. Se registraron los resultados tomando una fotografía.

## Resultados

### Bacterias multi-resistentes a antibióticos

A continuación se presentan los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación. En esta primera parte se pueden observar tablas en las que se ordenan las cepas con los antibióticos a los cuales se expusieron en los sensidiscos. “R” significa que la cepa fue resistente al antibiótico y “S” que fue sensible al antibiótico con un hola igual o mayor a 1.5 cm.

Antibiótico \ Cepa	Cepa															
	14CA	10ACK	13AA	15BC	7B3	18BA	17B1	15CA	14A	12A	12BC	12CCK	4BC	10A	4ACK	
Ampicilina	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	
Cefalotina	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	
Cefotaxima	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	
Ciprofloxacino	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	
Clindamicina	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	
Dicloxacilina	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	
Eritromicina	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	
Gentamicina	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	
Penicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	
Tetraciclina	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	
Sulfametoxazol/ Trimetroprim	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	
Vancomiina	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	

Tabla 4A. Resultados de la aplicación de sensidiscos. R= resistentes S= sensibles

Cepa Antibiótico	7ACK	3CC	7A	5CC	16A	9ACK	6CCK2	6CCK1	9CA	17CCK	2A2	15BC	16CA	6 <sup>a</sup>	16CC
Ampicilina	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S
Cefalotina	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S
Cefotaxima	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R
Ciprofloxacino	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S
Dicloxacilina	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R
Eritromicina	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S
Gentamicina	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Penicilina	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
Tetraciclina	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S
Sulfametoxazol/ trimetoprim	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
Vancomicina	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R

Tabla 4B. Resultados de la aplicación de sensidiscos. R= resistentes S= sensibles

Cepa / Antibiótico	2AA	16Cck	14BA	17Cck	9BA	5B	8BC	7B1	18BCC	16CC	12CA	15BC	16CCK4	17A	14C
Ampicilina	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
Cefalotina	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S
Cefotaxima	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R
Clindamicina	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
Dicloxacilina	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
Eritromicina	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S
Gentamicina	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
Penicilina	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R
Tetraciclina	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Sulfametoxazol/ trimetroprim	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S

Tabla 4C. Resultados de la aplicación de sensibilizadores. R= resistentes S= sensibles

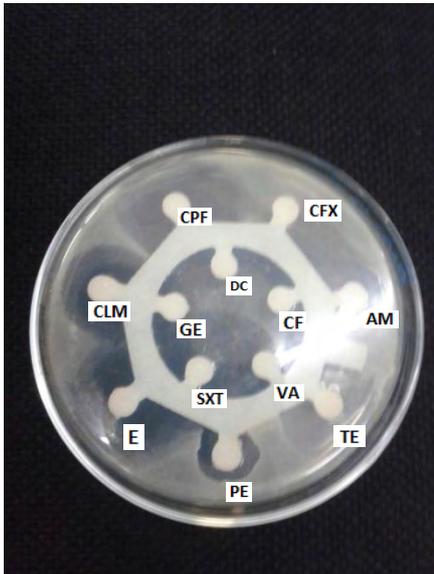
Cepa Antibiótico	10CCK2	14BA	5AK	14AA	8BC	11BCK	16AA	9BC	18BCK	16CCA	4CCK	5CA2	4CA	3BC	6CCK1
Ampicilina	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
Cefalotina	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S
Cefotaxima	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
Ciprofloxacino	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S
Clindamicina	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
Dicloxaxilina	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Gentamicina	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Penicilina	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S
Tetraciclina	S	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
Sulfamtoazol/ Trimetroprim	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S
Vancomicina	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S

Tabla 4D. Resultados de la aplicación de sensibilizadores. R= resistentes S= sensibles

Cepa \ Antibiótico	17C	12AA	4ACK	16CC	4CCK	11CA	17B2	10CCK1	11A	1C
Ampicilina	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S
Cefalotina	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
Cefotaxima	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Ciprofloxacino	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Clindamicina	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R
Dicloxacilina	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
Eritromicina	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
Gentamicina	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
Penicilina	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S
Tetraciclina	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R
Sulfametoxazol/ Trimetroprim	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R
Vancomicina	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S

Tabla 4E. Resultados de la aplicación de sensidiscos. R= resistentes S= sensibles

A continuación se presenta un antibiograma (muestra1C), en el cual se puede observar resistencia a algunos antibióticos (crecimiento) y sensibilidad a otros (halo de inhibición).



Antibiótico	Símbolo/ Concentración
Ampicilina	AM /10µg
Cefalotina	CF/30µg
Cefotaxima	CFX/30µg
Ciprofloxacino	CPF/5µg
Clindamicina	CLM/2µg
Dicloxacilina	DC/1µg
Eritromicina	E/15µg
Gentamicina	GE/10µg
Penicilina	PE/1IU
Tetraciclina	TE/30µg
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	SXT/ 1,25 + 23,75 µg
Vancomicina	VA/30µg

Figura 7. Antibiograma de la muestra 1C.

En la presente figura se muestra el antibiograma de una muestra. Se puede observar que esta cepa es sensible a 4 antibióticos de los 12 presentes en los discos. Cabe mencionar que es una muestra de cocos Gram + (crecimiento en MSA). Se nota clara resistencia a eritromicina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina y clindamicina, sensibilidad intermedia a penicilina (halo menor a 1.5 de diámetro) y ciprofloxacino (existe halo, pero con leve crecimiento encima).

De las 70 cepas analizadas solo se eligieron 5, las cuales se escogieron por su alto número de resistencia a los antibióticos analizados y su rápido crecimiento. Se cambió el nombre para que al re-etiquetar los tubos de experimentación el trámite fuera más rápido y ágil. Los nuevos nombres quedaron como se muestra en la siguiente tabla 5.

Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
16CC	11BCK	16A	4ACK	17A
Bacilos Gram +	Bacilos Gram -	Cocos Gram +	Cocos Gram +	Cocos Gram +
Catalasa -	Catalasa-	Catalasa-	Catalasa-	Catalasa-
Coagulasa -	Coagulasa +	Coagulasa -	Coagulasa -	Coagulasa -
_____	_____	Glicerol +	Glicerol -	Glicerol -
_____	_____	Melibiosa -	Melibiosa -	Melibiosa +
_____	_____	Arabinosa -	Arabinosa +	Arabinosa +
_____	_____	Tetrazolium a pH 6,0 +	Tetrazolium a pH 6,0 +	Tetrazolium a pH 6,0 -
_____	_____	Tolerancia al Telurito de potasio al 0,04% +	Tolerancia al Telurito de potasio al 0,04% -	Tolerancia al Telurito de potasio al 0,04% -
_____	_____	E. faecalis	E. ssp	E. faecium

Tabla 5. Cambio de nombre de las cepas, tinción de Gram, pruebas bioquímicas.

A las cepas seleccionadas se les realizaron pruebas de Tinción de Gram y bioquímicas que se muestran en la tabla 5. Para la cepa 1 y 2 no se pudieron realizar las pruebas bioquímicas por cuestiones de tiempo y presupuesto.

Como ya se mencionó, para estos resultados se tomaba como un cepa resistente “R” a las cepas que presentaban un halo bien definido (sin crecimiento) de inhibición igual o mayor a 1.5 cm y si presentaba un halo menor a 1.5 cm entonces se tomaba como una cepa sensible “S”; si había un halo pero este presentaba algo de crecimiento, entonces también se leía como una cepa sensible al antibiótico.

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 5
Ampicilina	R	R	R	R	R
Cefalotina	R	R	R	R	R
Cefotaxima	R	R	R	R	R
Ciprofloxacina	S	R	R	R	R
Clindamicina	S	R	R	R	R
Dicloxacilina	R	R	S	R	R
Eritromicina	R	S	R	R	R
Gentamicina	R	S	R	R	R
Penicilina	R	R	R	R	R
Tetraciclina	R	S	R	R	R
Sulfa/Trimetr	R	R	R	R	S
Vancomicina	R	S	R	R	R

Tabla 6. Resultados de los antibiogramas aplicados a las cepas elegidas para trabajar.

## Extracto Plaquetario

En la figura 8 se muestra un tubo con sangre centrifugada 5 mL; en la parte inferior del tubo se puede observar el paquete celular sedimentado, en tanto que en la parte superior está el suero, la tercera parte más cercana al paquete celular es la parte que se utilizaba para extraer a las plaquetas y a sus proteínas. Cabe mencionar que esta muestra presenta algo de hemólisis.



Figura 8. Muestra de sangre centrifugada a 600 rpm (40 RCF).

En el tubo se puede observar un tubo con sangre humana centrifugada. En la parte inferior se observan las células sanguíneas sedimentadas por la fuerza centrífuga; el suero se muestra dividido por líneas imaginarias para saber que parte es la que se utilizó para los experimentos. Por medio de la fórmula (R.C.F. = relative centrifugal force, gravities)  $R.C.F.=0.000118 \times r \times N^2$ , donde  $r$ =radio desde el centro de rotación a parte inferior del tubo (cm), y  $N$ = velocidad de rotación (revoluciones por minuto).

Después de obtener el suero (plaquetas) de la parte más cercana al paquete celular, dicha fracción se activaba (se rompían las plaquetas con cloruro de calcio) y se ponía en contacto con las 5 cepas escogidas en concentración  $1 \times 10^6 UFC/mL$  medida con fotómetro, por su resistencia a antibióticos y se medía el crecimiento celular cada 2 horas, durante 8 horas, para el blanco se agregaban todo en la misma cantidad excepto el extracto plaquetario. El tiempo cero es el momento en el cual se ponía en contacto el extracto plaquetario con cada cepa, el tiempo 1 las siguientes dos horas que habían pasado, el tiempo 2 las siguientes 4 horas y así sucesivamente hasta completar las 8 horas de la medición. Los resultados del crecimiento bacteriano se presentan en las siguientes tablas.

En las siguientes 3 tablas se muestran los resultados de medir el crecimiento bacteriano cada 2 horas en las cinco cepas. La medición se da en unidades MacFarland.

Cepas	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Cepa 1	1.9 McF	2.2 McF	2.3 McF	1.9 McF	1.9 McF
Cepa 2	1.8 McF	1.8 McF	2.0 McF	1.9 McF	1.9 McF
Cepa 3	1.9 McF	1.8 McF	2.3 McF	2.2 McF	2.1 McF
Cepa 4	2.2 McF	2.3 McF	2.3 McF	2.1 McF	2.5 McF
Cepa 5	2.0 McF	2.0 McF	1.9 McF	1.9 McF	2.0 McF
Control	2.5 McF	2.5 McF	3.8 McF	3.9 McF	3.3 McF

Tabla 7.1 Resultados de crecimiento bacteriano con el lisado de las plaquetas.

Cepas	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Cepa 1	1.9 McF	1.5 McF	1.6 McF	1.6 McF	1.7 McF
Cepa 2	2.4 McF	2.2 McF	2.2 McF	2.1 McF	2.2 McF
Cepa 3	1.5 McF	1.1 McF	1.7 McF	1.1 McF	1.2 McF
Cepa 4	2.3 McF	2.0 McF	2.0 McF	2.2 McF	2.3 McF
Cepa 5	2.4 McF	2.2 McF	2.2 McF	2.0 McF	2.4 McF
Control	1.9 McF	1.9 McF	1.8 McF	1.8 McF	2.0 McF

Tabla 7.2. Resultados de crecimiento bacteriano con el lisado de las plaquetas, segunda repetición.

Cepas	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Cepa 1	1.0 McF	1.2 McF	1.6 McF	1.6 McF	1.7 McF
Cepa 2	2.7 McF	3.0 McF	3.0 McF	3.3 McF	3.3 McF
Cepa 3	1.5 McF	1.6 McF	1.7 McF	1.7 McF	1.9 McF
Cepa 4	3.8 McF	3.8 McF	3.9 McF	3.8 McF	4.0 McF
Cepa 5	2.0 McF	1.4 McF	1.6 McF	2.0 McF	4.1 McF
Control	2.5 McF	2.5 McF	3.8 McF	3.3 McF	3.3 McF

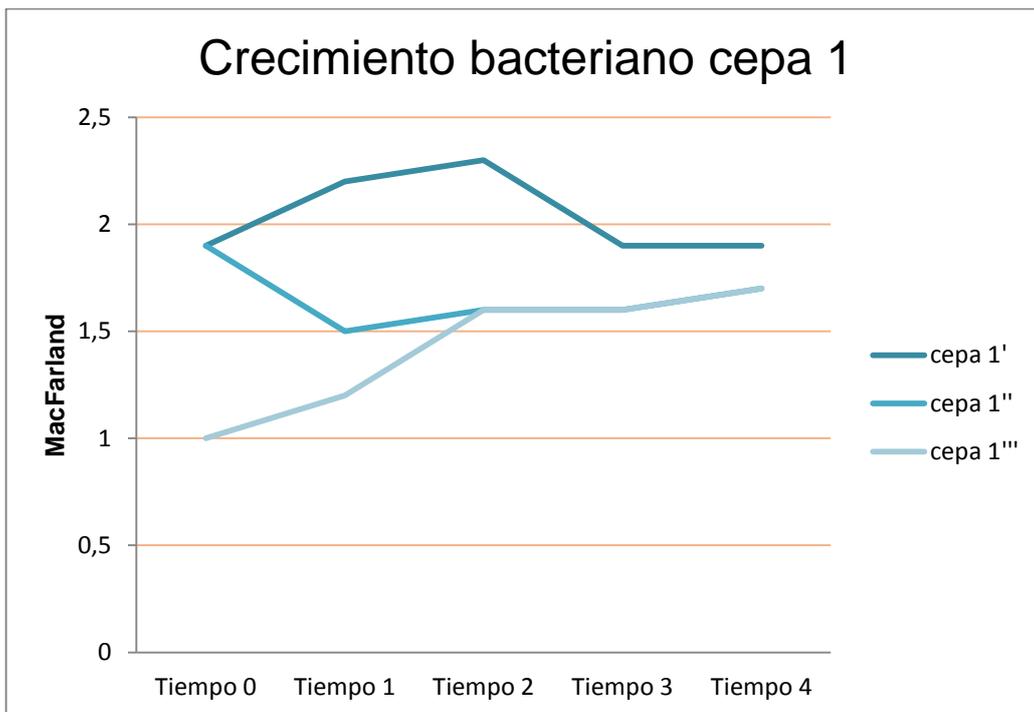
Tabla 7.3 Resultados de crecimiento bacteriano con el lisado de las plaquetas, tercera repetición.

### **Comportamiento del crecimiento bacteriano en las repeticiones del experimento.**

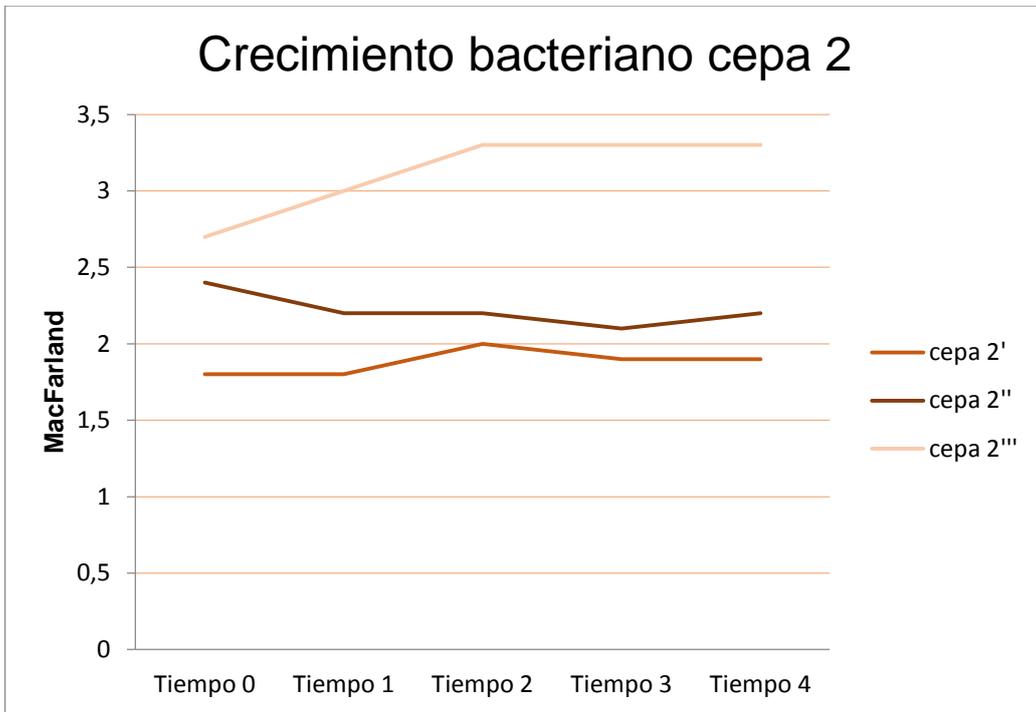
En las siguientes gráficas se muestra el crecimiento bacteriano en las 3 repeticiones del experimento, en las cuales se tomó la concentración de células bacterianas cada 2 horas,

durante las primeras 8 horas después de la resiembra. Se puede observar que las concentraciones celulares cambian muy poco o incluso disminuyen en algunos casos.

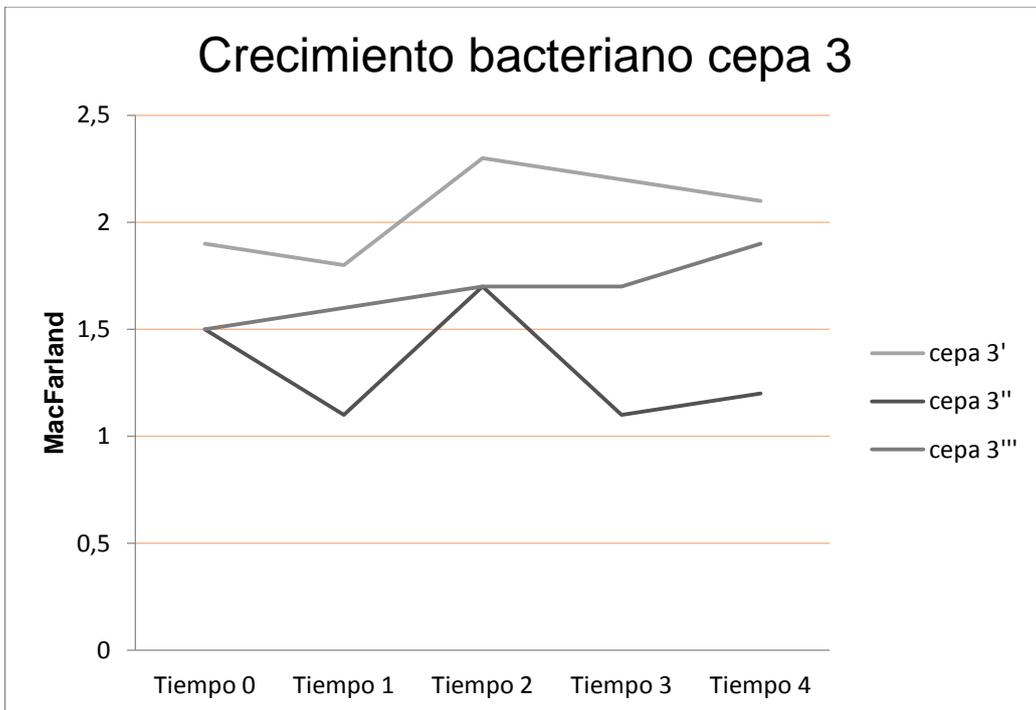
Como se mencionó líneas arriba, lo que se presenta en la gráfica como “Tiempo 0”, es la primera medición de la concentración celular inmediatamente después de la resiembra, el “Tiempo 1” es la medición de la concentración celular a las 2 horas después de la resiembra, el “Tiempo 3” es la medición a las 6 horas y el “Tiempo 4”, es la medición de la concentración a las 8 horas de crecimiento bacteriano.



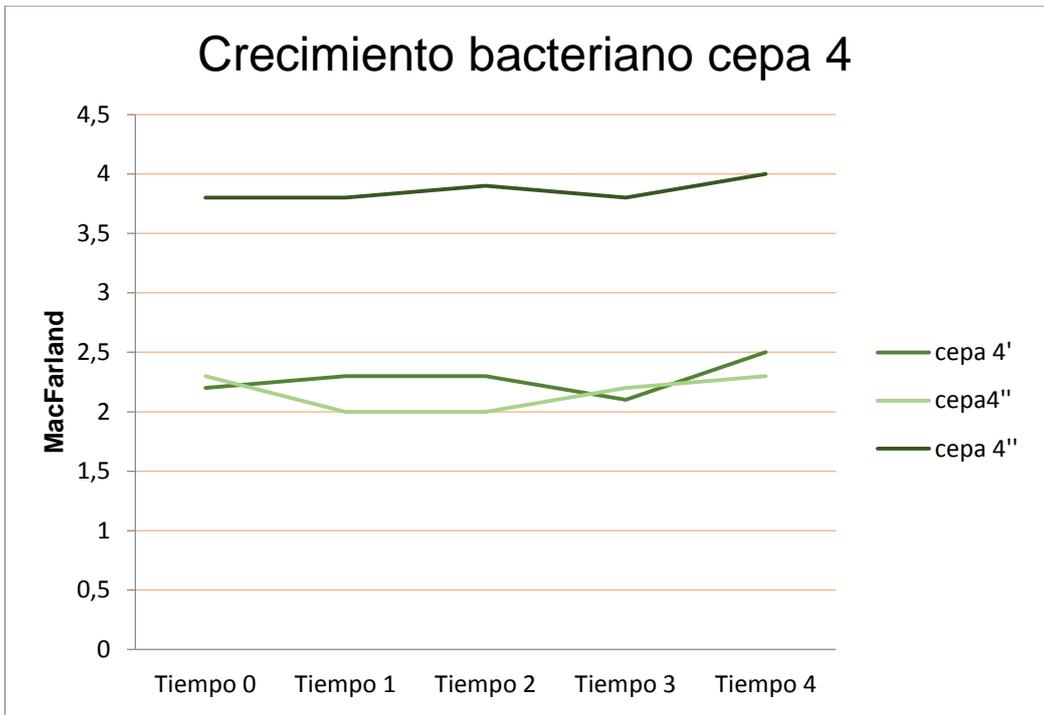
Gráfica 1. Crecimiento bacteriano de cepa 1 durante el experimento.



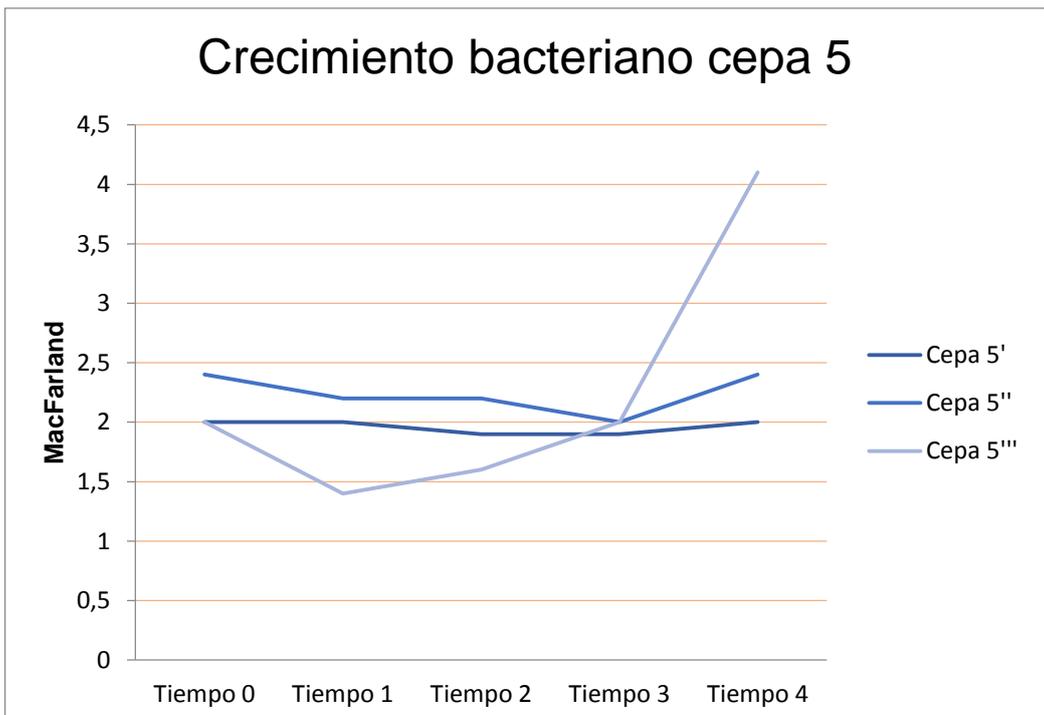
Gráfica 2. Crecimiento bacteriano de cepa 2 durante el experimento.



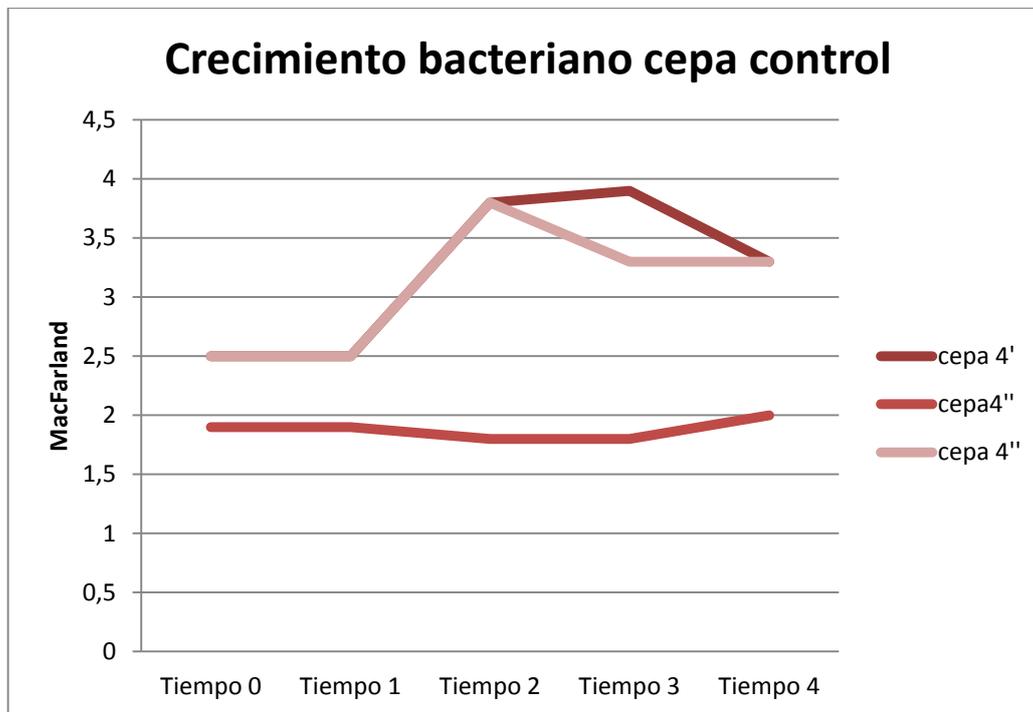
Gráfica 3. Crecimiento bacteriano de cepa 3 durante el experimento.



Gráfica 4. Crecimiento bacteriano de cepa 4 durante el experimento.



Gráfica 5. Crecimiento bacteriano de cepa 5 durante el experimento.



Gráfica 6. Crecimiento bacteriano de cepa control durante el experimento.

## Análisis electroforético de proteínas

### Geles de Poliacrilamida

Se tomó la decisión de hacer un gel de poliacrilamida para intentar conocer el peso molecular de las proteínas que podrían estar afectando el crecimiento bacteriano. A continuación se presentan dichos geles. En el primer gel realizado se observó que la concentración de proteínas era demasiado alta y que si bien podían distinguirse bandas muy poco intensas de bajo peso molecular, no era posible distinguir ninguna banda aislada de mayor masa molecular. Fue así que se hicieron varias diluciones, hasta encontrar la concentración adecuada para poder visualizar bandas definidas en el gel en dicho rango de masa.

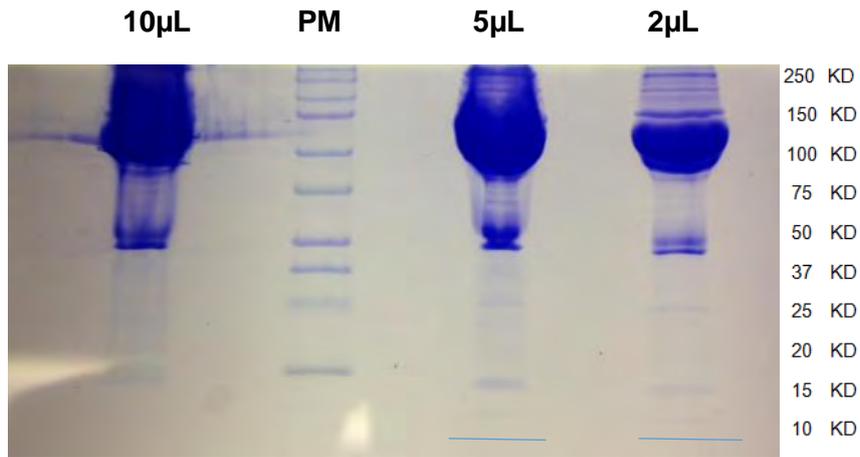
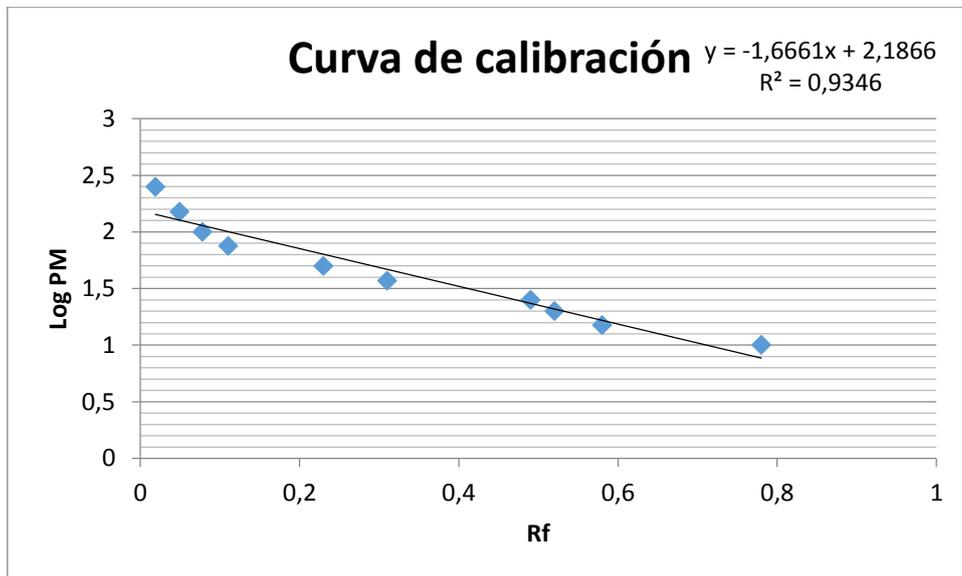


Figura 9. Muestras de proteínas extraídas de lisado plaquetario a diferentes concentraciones. En esta figura se puede observar que no es posible apreciar bandas bien definidas de alto peso molecular en ninguno de los carriles, a pesar de que la cantidad que se cargaba en cada carril iba disminuyendo. Con estos resultados no se podían calcular los pesos de las proteínas de alto peso molecular pero sí de las de bajo peso molecular. En el carril 2 se puede observar el marcador de peso molecular (PM), en el carril 1, la muestra de lisado plaquetario a 10µL, en el carril 3 la muestra cargada fueron 5µL y en el carril 4 la muestra cargada fueron 2µL. Cabe mencionar que se puede ver una banda tenue por debajo del marcador de peso molecular de 10 KD.



Gráfica 6. Cálculo de pesos moleculares de proteínas extraídas de paquete plaquetario.

Fórmula para calcular los pesos moleculares:

$$y = -1.6661x + 2.1866$$

Pesos moleculares obtenidos por medio de la ecuación de la gráfica:

Peso Molecular de muestras KDa:
6.3
14
23.44
33.88

#### Dilución de proteínas plaquetarias 1 a 10.

Como se pudo observar en la figura anterior, al ser la concentración de proteína demasiado alta fue necesario hacer varias diluciones hasta encontrar la concentración adecuada y ver bandas bien definidas en el gel de poliacrilamida.

La siguiente figura muestra que después de las diluciones a concentración 1:20, fue posible observar bandas correspondientes a péptidos de alto peso molecular bien definidas.

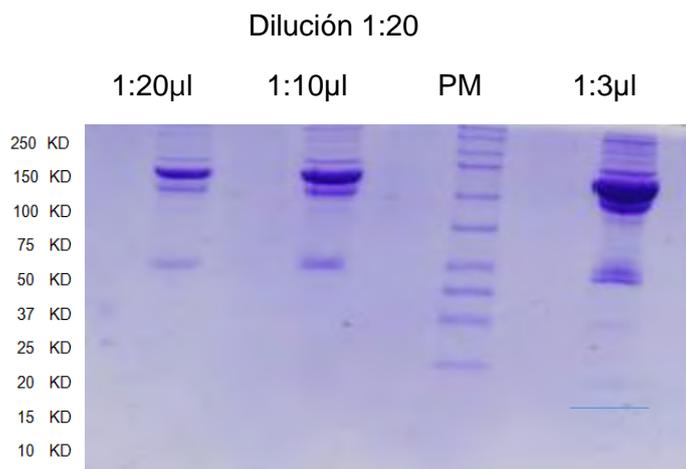
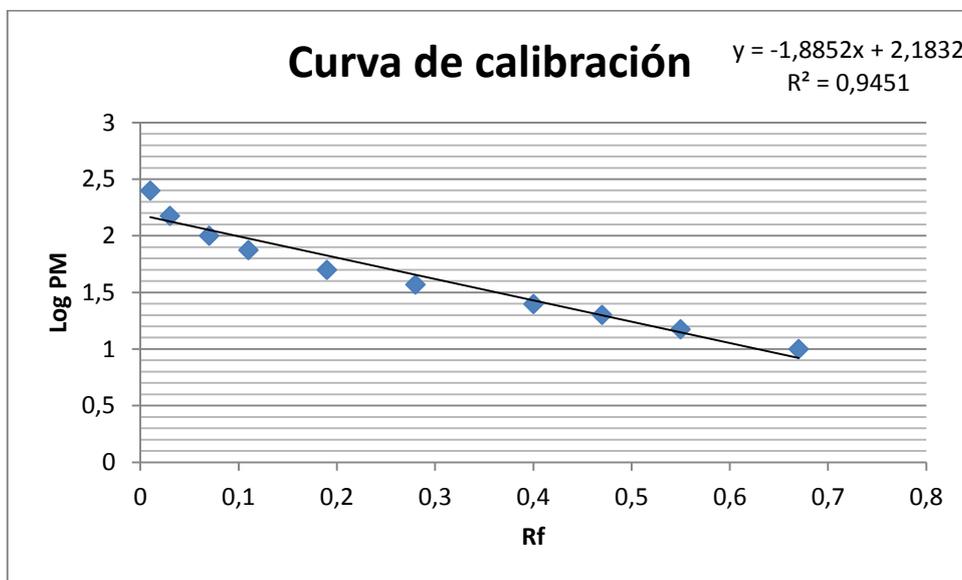


Figura 10. Muestras de proteínas extraídas de paquetes plaquetarios. En el carril 3 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 1, la muestra cargada a una dilución de 1:20µl en el carril 2 la muestra cargada diluida 1:10µl y en el carril 4 la muestra cargada diluida 1:3µl. Se puede observar que en este carril las bandas casi no se definen, es interesante que en este carril hay una banda muy tenue con bajo peso molecular (menor a 10 KDa, subrayada en azul).



Gráfica 7. Cálculo de pesos moleculares de proteínas extraídas de paquete plaquetario.

Fórmula para calcular los pesos moleculares:

$$y = -1.8852x + 2.1832$$

Pesos moleculares obtenidos por medio de la ecuación de la gráfica:

Peso Molecular de muestras KDa:
6.3
13.8
19.95
25.11
57.54
77.44
93.32

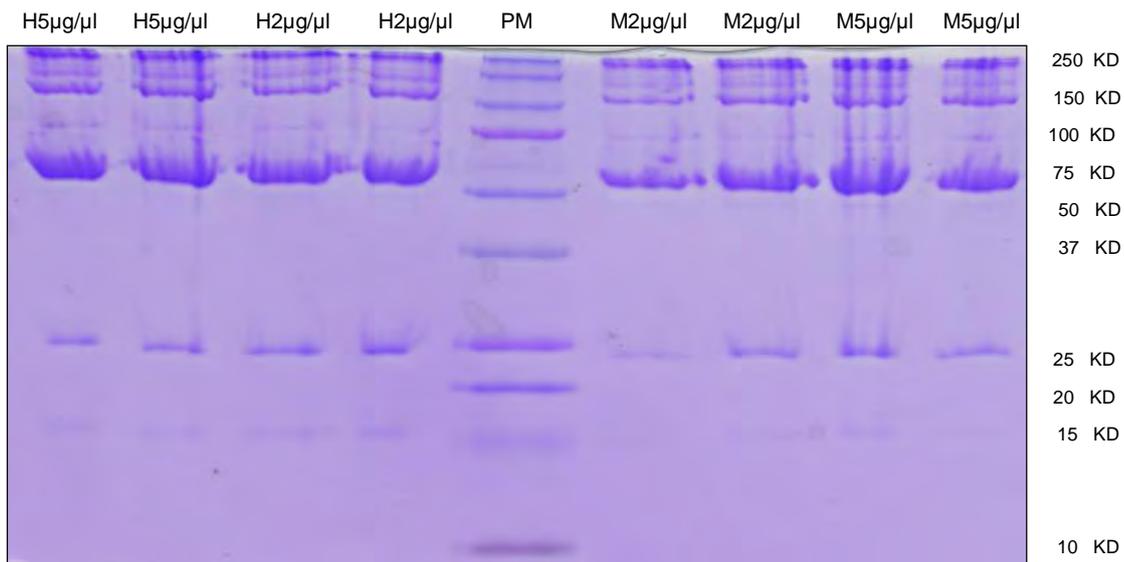
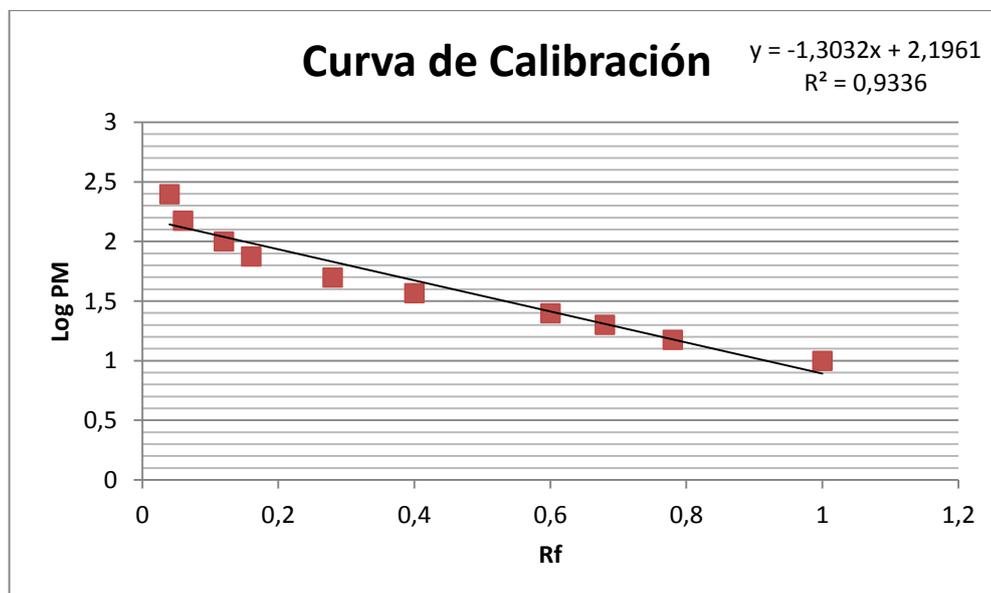


Figura 11. Muestras de lisado de paquetes plaquetarios extraídos de plasma sanguíneo a diferentes concentraciones. En este gel se corrieron muestras de proteínas de plaquetas, provenientes de muestras de hombre y de mujer, para observar si se presentaba alguna diferencia en el efecto que tenía sobre el crecimiento bacteriano. Las primeras 4 muestras son de hombre, 2 en cantidad de 5 microlitros y las siguientes 2 en 2 microlitros, luego el marcador de peso molecular. Las siguientes muestras son de mujer, 2 carriles con 5 microlitros y 2 con 2microlitros. La muestra de varón, fue obtenida de un voluntario sano de 20 años de edad, y la muestra de la mujer fue tomada de una persona asintomática también de 20 años de edad.

Después de que se llevaron a cabo los geles, se hizo una curva de calibración para poder calcular los pesos moleculares de las proteínas de manera más precisa, por medio de la fórmula obtenida para Y.



Gráfica 7. Cálculo de pesos moleculares de proteínas extraídas de paquete plaquetario.

### Peso molecular de las proteínas

Por medio de la fórmula obtenida a través de la pendiente de la gráfica se estimó el peso molecular de las proteínas obtenidas en las muestras:

$$Y = -1.3032x + 2.1961$$

Dando como resultado los pesos moleculares de la tabla, de mayor a menor peso molecular:

Peso Molecular de muestras en KD:
131.1
118.8
73.8
28.12

Así se obtuvieron los pesos moleculares de las proteínas plaquetarias de alto peso molecular.

## Análisis de resultados

La primera parte experimental empieza con la obtención y purificación de las cepas bacterianas multi-resistentes a antibióticos. Esta parte se llevó a cabo porque es necesario trabajar con cepas puras para no obtener falsos positivos o falsos negativos por presentar más de un tipo de microorganismo en una muestra.

Para llevar a cabo lo anterior, fue necesario reactivar las muestras que se habían proporcionado para esta investigación, ya que después de su recolección, se habían dejado almacenadas por algunos meses. Para ello se sembraron en caldo Luria (Luria Bertani) ya que en este medio se promueve la propagación y mantenimiento de diferentes bacterias. El caldo Luria está constituido por: 10 gramos de tripsona, 5 gramos de extracto de levadura y 10 gramos de cloruro de sodio. La peptona de caseína y el extracto de levadura proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de muchos microorganismos y el cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico. Con el fin de permitir a las bacterias multiplicarse y activar su metabolismo celular; se resembraron por lo menos tres veces en caja para entonces proseguir con la purificación de las muestras.

Cada muestra se sembró de primera instancia en medio sólido MSA (Manitol sal agar) ya que el medio agar sal manitol es una fórmula diseñada por Chapman para la diferenciación de estafilococos positivos a la coagulasa (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) de los estafilococos negativos a la coagulasa (Chapman, 1945). Este agar se utiliza para el aislamiento de estafilococos a partir de muestras clínicas (Bannerman, 2003), de cosméticos (Hitchin, 1995) y de pruebas de límite microbiano. El agar sal manitol contiene peptonas y extractos de carne bovina, que suministran los nutrientes esenciales. Una concentración de cloruro sódico de 7,5% tiene como resultado una inhibición parcial o completa de los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos. También se sembraron las muestras en medio McConkey el cual fue desarrollado por McConkey y publicado en 1900 y 1905 (McConkey, 1900) (McConkey 1905). Esta fórmula fue diseñada sabiendo que las sales biliares precipitan por acción de ácidos y determinados microorganismos entéricos fermentan a la lactosa, mientras que

otros no presentan dicha capacidad. Luego, este medio fue modificado varias veces. El agar McConkey es sólo ligeramente selectivo, dado que la concentración de sales biliares que inhiben a los microorganismos Gram positivos es baja en comparación con otros medios en placa entéricos. Se recomienda el uso de este medio en muestras clínicas con posible flora microbiana mixta, tal como aquellas procedentes de la orina, del sistema respiratorio, de heridas y otras, porque permite la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otras bacterias Gram negativas en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa (Baron, 1994) (Farmer, 2003). El agar McConkey también se utiliza en el examen microbiológico de alimentos. La resiembra se realizó por medio de la técnica de estría cuadrante radial, para obtener colonias aisladas. Si no se lograban obtener colonias aisladas en estos medios sólidos, entonces se tomaba una muestra de tal medio con una asa y se resembraba nuevamente en MSA (manitol sal agar) y McConkey. Este procedimiento se repetía hasta que se obtenían colonias puras y si a pesar de llevar a cabo este procedimiento varias veces no se obtenía crecimiento o alguna colonia pura, entonces se procedía a desechar tal muestra.

En las primeras tablas desde la 4A hasta la 4E, se muestran los resultados de cada antibiograma que se obtuvo de cada cepa. Se puede observar que la mayoría de las muestras son resistentes al menos a dos antibióticos. Esto es debido a las diferentes formas que tienen las bacterias de adquirir multirresistencia a antibióticos, dándoles la capacidad de sobrevivir a la concentración de antibiótico que se encuentra en cada antibiograma.

De todas las cepas analizadas solo se eligieron 5 cepas puras. Estas se escogieron fundamentalmente por su resistencia a varios de los antibióticos analizados; se cambió el nombre para que al re-etiquetar los tubos de experimentación el trámite fuera más rápido y ágil. Los nuevos nombres quedaron como se muestra en la tabla 5.

Después de tener las 5 cepas que resisten a más cantidad de antibióticos, se obtuvo sangre periférica de donadores asintomáticos para centrifugarla y así tomar los péptidos que tuvieron efecto sobre el crecimiento bacteriano. De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que el crecimiento bacteriano era afectado de tal manera que se mantenía relativamente sin cambios por al menos las primeras 8 horas después de la resiembra, concluyendo que el efecto de los péptidos es posiblemente bacteriostático, en comparación con el crecimiento en la cepa control cuyo crecimiento siempre iba de

manera general en aumento. Se piensa que esto sucede por la combinación de proteínas que se encuentra en el paquete plaquetario por lo que se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida para intentar saber qué proteínas podrían ser las que están actuando sobre el crecimiento bacteriano.

Para tener una idea más clara de qué proteínas son la que tenían efecto bacteriostático, se realizó un gel de acrilamida para conocer el peso molecular de tales proteínas, pero inicialmente se encontró que la concentración de la proteína era demasiado alta, por lo cual no se distinguían en los carriles bandas bien definidas. Se tomó entonces la decisión de diluir la muestra de proteína, hasta encontrar una concentración adecuada para que en el gel se observaran bandas bien definidas y así poder calcular el peso molecular de las proteínas.

Los péptidos grandes más evidentes tuvieron pesos moleculares de 131.1 KD, 118.87 KD, 73.8 KD, 28.12 KD.

Tang en el 2002 analizó la identificación de siete péptidos antimicrobianos liberados de plaquetas humanas activadas con trombina: factores plaquetarios 4 (PF-4 de 7,766.2 Da), RANTES (7,850.5 Da), péptido activador del tejido conectivo 3 (CTAP-3 de 9,287.8 Da), proteína básicas de las plaquetas (10,260.6 Da) y timosina  $\beta$ -4 (4,962.2Da), todos estos péptidos fueron purificados a partir de extractos de plaquetas y su actividad antimicrobiana fue comprobada *in vitro*. (Tang et al., 2002)

Los estudios realizados por Yount en 2004 definieron la estructura de PMP-1 o platelet microbicid proteins que se traduce del inglés como proteínas microbicidas de plaquetas y examinó su relación estructura-actividad. La secuenciación de aminoácidos y la espectroscopia de masas demostraron que las distintas variantes de polimorfismo N-terminal de PMP-1 aisladas de plaquetas no estimuladas o estimuladas con trombina, se originaron a partir de un único pro-péptido de PMP-1. El PMP-1 se traduce como un precursor de 106 aminoácidos y se procesa para producir variantes de 73 residuos (8,053 KDa) y 72 residuos (7,951 KDa). Yount también examinó a la familia de proteínas de plaquetas de mamíferos PF4 (factores plaquetarios 4) y la base de la relación filogenética entre mamíferos, encontrando una secuencia de estructura tridimensional congruente, que comparte la mayor similitud con PMP-1 humano. (Yount et al., 2004)

Wiesner en el 2010 explica que en el organismo humano existen péptidos antimicrobianos, entre los que se encuentran: las kinocidinas incluyendo trombicidina-1 y trombicidina-2. Estas se ubican en los gránulos- $\alpha$ , son quimiocinas con propiedades antimicrobianas que se encuentran en plaquetas, aunque también pueden existir en otras partes del organismo. (Wiesner et al., 2010)

Yeaman en 2006 encontró que algunos pesos moleculares de kinocidinas eran: 8167 Da, 4019 Da, 4166 Da, 1634 Da, 1712 Da, 1662 Da, 1525 Da, 1706 da y 1756 Da. Basado en esto, se puede observar que los péptidos de bajo peso molecular observados en este trabajo muestran valores similares, por lo que podríamos suponer que las proteínas con efecto bacteriostático pertenecen a la familia de las kinocidinas, que son de pesos moleculares pequeños. (Yeaman et al., 2006)

## **Conclusión**

Se observó el efecto bacteriostático de los péptidos extraídos de plaquetas humanas sobre bacterias multirresistentes a antibióticos aisladas de piel, como se pudo observar en la parte de resultados, el crecimiento bacteriano se detenía al menos por 8 horas después de poner en contacto el extracto plaquetario con el cultivo celular.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se cree que los péptidos que causan el efecto estudiado son los que presentan los pesos moleculares de 6.3 y 14 KDa ya que en la literatura se encontró que los péptidos como la kinocidinas tienen efecto bacteriostático y sus pesos moleculares oscilan entre 4.0 a 9.2 KDa (Tang, 2012) (Yeaman, 2006). Estas son proteínas de bajo peso molecular pertenecientes al sistema inmune innato y podrían ser las responsables del efecto mencionado.

También podría ser que el mayor efecto contra las bacterias fuera con el conjunto de dichos péptidos más que con cada uno por separado pero para comprobar tal hipótesis se requeriría de más trabajo experimental.

## Bibliografía:

- 1) Andia, I., & Sánchez, M., & Maffulli, N. (2012). Basic science: Molecular and biological aspects of platelet-rich plasma therapies. *Operative techniques in orthopaedics*. **22** pp 3-9
- 2) Anitua, E., & Prado, R., & Sánchez, M., & Orive, Gorka. (2012) Platelet-rich plasma: Preparation and formulation. . *Operative techniques in orthopaedics*. **22** pp25-32
- 3) Bannerman, T.L. et. al.(2003). Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC, **8** pp 384-404.
- 4) Barba-Recreo, P., & Del Castillo Pardo, JL., & Georgiev-Ristov, T., & Ruiz, E., & Abarrategi, A., & Burgueño, M., & García, M. (2015). Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *Journal cranio-maxillo-facial surgery*. **43** pp 1161-1168
- 5) Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*. Novena edición. Louis USA.1994
- 6) Betina, O. (2006). *La resistencia y sus mecanismos de dispersión*. *Revista de la Facultad de Odontología UBA*. **21** pp 13-19
- 7) Bielecki, T.M., & Gazdzik, T.S. (2007). *Antibacterial effect of autologus platelet gel enriched with growth factors and other active substances*. *The journal of bone and joint surgery*. **89** pp 417-420
- 8) Brooks Geo. F. *Microbiología médica* .Décima edición. Editorial Manual Moderno.México D.F. 1996.
- 9) Cameron, F. H., & Groot, O. DJ, & Ackerman, R.M. (1986). *Nucleics Acids Research*. Nucleotide sequence of the AAD(2") aminoglycoside adenylyltransferase determinant aadB. Evolutionary relationship of this region with those surrounding aadA in R538-1 and dhfrII in R388. **14** pp 8625-8635

- 10) Chapman, G.H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bacteriol.* 50 pp 201-203.
- 11) Citterio, L., & Franzyk, H., & Palarasah, Y., & Andersen, TE., & Mateiu, RV., & Gram, L. (2016). Improved in vitro evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptiomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria. *Research in microbiology.* **167** pp 72-82
- 12) Conde, E., & Fernández, ME., & Suárez, R. (2015). Platelet rich plasma: Applications in dermatology. *Actas dermo-sifiográficas.* **106** pp 104-111
- 13) Dhillon, M. S., & Karna, S.K., & Dhatt, S.S., & Behera, P., & Bhatia, A. (2015). Can platelet rich plasma stimulate human ACL growth in culture? A preliminary experience. *Muscle, ligaments and tendons journal.* **5** pp 156-161
- 14) Donaldson, D. M. and J. G: Tew (1977) Beta-lysin of platelet origin. *Bacteriol.* **41** pp 501-513
- 15) Dovlatova, N. (2015). Current status and future prospects for platelet function testing in the diagnosis of inherited bleeding disorders. *British Journal of Haematology.* **170** pp 150–161
- 16) Downes, F.P., & K. Ito. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* 4th edition. Washington, D.C. USA. 2001
- 17) Murray, P. R., & Baron, E. J., & Jorgensen J.H., Pfaller, M. A., & Tenover, R. H. *Enterobacteriaceae: introduction and identification. Manual of clinical microbiology,* 8th ed. Washington, D.C. 2003.
- 18) Fiorelli, E., & Lanti, A., & Ferraro, A.S., & Del Prospoto, G., & Basso, I., & Chiru, O.M., & De Masi, A., & Antonelli, M., & Palazzo, G., & Massarelli, R., & Insalaco, d., & Ippolito, d., & Pattofatto, F., & agostini, f., & Adorno, G. (2014). Automated cell processing device to eliminate DMSO: experience of Policlinico Tor Vergata. *Transfusion and apheresis science.* **50** pp 19-20
- 19) Fortier, L., & Hackett, C., & Cole, B. (2011). The effects of platelet-Richplasma on Cartilage:Basic Science and clinical application. *Sports Med.* **19** pp 154-159

- 20) Ganong, W. Fisiología Médica. Treceava edición. Editorial MacGrawhill. México 1992.
- 21) Giusto, G., & Vercelli, C., & Iussich, S., & Tursi, M., & Perona, G., & Gandini, M. (2017). Comparison of the effects of platelet-rich or growth factor-rich plasma on intestinal anastomosis healing in pigs. *BMC Veterinary research*. **13** pp188-196
- 22) Gobbi, G., & Vitale M. (2012). Operative Techniques in Orthopaedics. Platelet- Rich Plasma Preparations for Biological therapy: applications and limits. Operative techniques in orthopaedics. **22** pp.10-15
- 23) Huang, J., & Hitchins, A. D., & Tran T.T., & McCarron, J. E. Microbiology methods for cosmetic. In *Bacteriological analytical manual*, 8th ed. USA. 1995
- 24) Jalowiec, J.M., & D'este, M., & Bara, J.J., & Denom, J., & Menzel, U., & Alini, M., & Verrier, S., & Herrmann, M. (2015). An In vitro investigation of Platelet-rich plasma-gel as a cell and growth factor delivery Vehicle for tissue engineering. *Tissue engineering & regenerative medicine international society*. **22** pp 49-58
- 25) Lee R., & Barcel D., & William J., & Wang J., & Boles J., Manly D., & key N., & Mackman N. (2012). Pre- analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity. *Thrombosis research*. **129** pp 80-85
- 26) Lehniger, A. Principios de bioquímica. Segunda edición. Editorial Omega. México 1993.
- 27) Lemos, C., & Mello, C., & dos Santos, D., & Verri, F., & Goiato, M., & Pellizzer, E. (2015). Effects platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. **45** pp 517-525
- 28) Luke F. (2011). *Pathogens Resistant to antibacterials Agents. Medical clinical*. **95** pp 647-676
- 29) MacConkey, A. (1905). Lactose-fermenting bacteria in faeces. *Epidemiology and infectio*. **5** pp 333-379.
- 30) MacConkey, A.T. (1900). Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. *The Lancet*, Part II:20.

- 31) Maciel, F., & De Rossi, R., & J.C. Módolo, T., & C., R. (2012). Scanning electron microscopy and microbiological evaluation of equine burn wound repair after platelet-rich plasma gel treatment. *Burns. Journal burns.* **38** pp 1058-1065
- 32) Madurantakam, P., & Yoganarasimha, S., & Hasan, F.K. (2015). Characterization of leukocyte-platelet rich fibrin, a novel biomaterial. **103** pp 53221-53229
- 33) Marcinkiewicz, C., & Gerstenhaber, J. A., & Sternberg, M., & Lelkels, P.I., & Feuerstein, G. (2017). Bitistatin-functionalized fluorescent nanodiamond particles specifically bind to purified human platelet integrin receptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and activated platelets. *International journal of nanomedicine.* **12** pp 3711-3720
- 34) Mariani, E., & Canella, V., & Berlingeri, A., & Cattini, A., & Landini M.P., & Kon E., & Marcacci, M., & Di Matteo, B., & Filardo, G. (2015). Leucocyte presence does not increase microbicidal activity of platelet-rich plasma in vitro. *BMC Microbiology.* **15** pp 149-152
- 35) Mariani, E., & Filardo, G., & Canella, V., & Berlingeri, A., & Bielli, A., & Cattini, L., & Landini, MP., & Kon, E., & Marcacci, M., & Facchini, A. (2014). Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytotherapy.* **13** pp 1294-1304.
- 36) Marx, RE., & Carlson ER., & Eichstaedt, RM., & Schimmele, SR., & Strauss, JE., & Georgeff, KR. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg.* **85** pp 638-46
- 37) Matus, V., & Valenzuela, J.G., & Hidalgo, P., & Pozo, L.M., & Panes, O., & Wozniak, A., & Mezzano, D., & Pereira, J., & Sáez, C. G. (2017). Human platelet interaction with *E. coli* promotes tissue-factor-dependent procoagulant activity, involving Toll like receptor 4. *Journal plos one.* **12** (9) pp 1-12
- 38) Mert Karaduman, M., & Okkaoglu, M., & Sesen, H., & Taskesen, A., & Ozdemir, M., & Altay, M. (2015). Platelet-rich plasma versus open surgical release in chronic tennis elbow: A retrospective comparative study. *Journal Orthopaedics.* **13** pp 10-14.
- 39) Morel A., & Bijak, M., & Miller, E., & Rywaniak, J., & Miller, S., & Saluk, J. (2015). Relationship between the increased haemostatic properties of blood platelets and oxidative stress level in multiple sclerosis patients with the secondary progressive stage. *Oxidative*

medicine and cellular longevity. **2015** pp 1-10

- 40) Nuri, R., & Shprung, T., & Shai, Y. (2015) .Defensive remodeling: How bacterial surface properties and biofilmformation promote resistance to antimicrobial peptides *Biochimica et Biophysica*. **1848** pp 3089–3100
- 41) Oulette, M., & Bissonnette, L., & Roy, PH. (1987). Proceedings of the National Academy of Sciences. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. **84** pp 7378-7382
- 42) P. Arnoczky, S., & Delos, D., & A. Rodeo, S. (2011). What is platelet-rich plasma? Operative techniques in sport medicine. **19** pp 142-148
- 43) Patel, D. (2010). Ethidium Bromide MIC Screening Enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54. pp 5070-5073
- 44) Pavia, S., & Veloso, C. A., & Campos, F., & Carneiro, M.M. & Tilan, J.U., & Wang, H., & Umans, J.G., & Zukowska, Z., & Kitlinska, J. (2017). Elevated levels of neuropeptide Y in preeclamsia: a pilot study implicating a role for stress in pathogenesis of the diase. *Neuropeptides*. **55** pp 127-135.
- 45) Peterson G.L. (1997). *Analytical Biochemistry*. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **83** pp 346-356.
- 46) Pieters, M., & Barnard, S.A., & Loots, D.T., & Rijken, D. C. (2017). The effects of residual platelets in plasma on plasminogen activator inhibitor-1 and plasminogen activator inhibitor-1-related assays. *Journal plos one*. **12** (2) pp 1-11
- 47) Rai, A., & Pinto, S., & B. Evangelista, M., & Gil, H., & G.S. Ferrerira, M., & Ferreira, L. (2016). High-density antimicrobial peptide coating with broad activity and low cytotoxicity against human cells. *Acta biomaterialia*. **33** pp 64-77
- 48) Reyes, M., & Montero, S., & Cifuentes, J., & Zarzar, E. (2002). Actualización de la técnica de obtención y uso del plasma rico en factores de crecimiento (P. R. G. F.). *Revista dental de Chile*. **93** (2) pp 25-28
- 49) Ruggiero, S. (2009). Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaw (BRONJ): Initial

Discovery and Subsequent Development. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. **67** pp 13-18

- 50) S. F., Carroll & R.J. Martínez, R.J. (1981). Antibacterial peptide from normal rabbit serum. 1. Isolation from whole serum, activity, and microbicidal spectrum. *Biochemistry*. **20** pp 5973-5981
- 51) Schar, M. O., & Romero, J.D., & Kohl, S., & Zumstein, M. A., & Nestic, D. (2015). Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clinical orthopaedics and related research*. **473** pp 1635-1643
- 52) Santonja, F., & Pastor, A. (2009). Plasma rico en factores de crecimiento. *Imucot (Terapia biológica)*. **5** pp 1265–1280.
- 53) Tang, Y., & Yeaman, M., & Selsted, M. (2002). Antibacterial peptides from human platelets. *Infection and immunity*. **70** pp 6524-6533
- 54) Wen, J., & Li, H.T., & Li, S.H., & Li, X., & Duan, J.M. (2016). Investigation of modified platelet-rich plasma (mPRP) in promoting the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells from deciduous teeth. *Brazilian Journal of medical and biological research*. **49** (10) pp 1-8
- 55) Wiesner, J., Jochen, & Vilcinskas, A. (2010). Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immune system. *Virulence*. **1** (5) pp 440-464.
- 56) Yeaman, M.R; 1997. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clinical Infection Dis*. **25** pp 951-970
- 57) Yeaman, M.R & Yount, N. Y., & Waring, A.J., & Gank, K.D., & Kupferwasser, D., & Wiese, R., & Bayer, A. S., & Welch, W. H. 2006. Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochim Biophys Acta*. **1768** pp 609–619
- 58) Yount, N. Y., & Gank, K.D., & Xiong, Y.Q., & Bayer, A. S., & Pender, T., & Welch, W. H., & Yeaman, M. R. (2004). Platelet microbicidal protein 1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48** pp 4395-4404
- 59) Zaragoza, R., & Ramírez, P., & López-Pueyo, MJ. (2010). Antibiotic multiresistance in

critical care units. Medicina Intensiva. **35** pp 41-53.