



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Evaluación *in vitro* del efecto adherente de un apósito
impregnado con Cloruro de Dialquilcarbamoilo sobre
Staphylococcus aureus.

T E S I S

Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo

P r e s e n t a
Alberto Tejeda Fernández de Lara

Asesor de Tesis
Dr. en C. Fernando Edgar Krötszch Gómez
Co Asesor de Tesis
Dr. en C. Víctor Manuel Zendejas Buitrón

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNANDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación in vitro del efecto adherente de un apósito impregnado con Cloruro de Dialquilcarbamoilo sobre Ataphylococcus aureus

Que presenta el pasante: Alberto Tejeda Fernández de Lara
Con número de cuenta: 304223552 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de marzo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
SECRETARIO	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
2do. SUPLENTE	Dr. Julio Cesar Botello Pozos	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Antes que nadie debo agradecer a mi familia, mi padre Alberto Tejeda, mi madre Laura R. Fernández de Lara y mi hermano M.V.Z. Daniel R. Tejeda por su paciencia, su tiempo, su apoyo, sus consejos, sus pláticas, sus sonrisas... Simplemente por estar ahí para mí cuando los necesité, sin ustedes como motor, este proyecto simplemente no se hubiera realizado.

Al Dr. Fernando Edgar Kröttsch Gómez por depositar su confianza en mí para realizar este proyecto, por su tiempo, por todo el conocimiento que compartió conmigo, por sus regaños a tiempo y justos, por demostrarme que la ciencia es una forma de vida y que se puede llegar a tener grandes resultados cuando uno tiene la visión de hacer las cosas en grande, no solamente quedarse con lo que uno puede o no ver, el indagar, buscar, obtener información y sobre todo entender que todo está relacionado de una u otra manera, y que es nuestra labor como científicos identificar esos sitios donde se unen.

A todo el equipo del Laboratorio de Tejido Conjuntivo del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados (CENIAQ) en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), al Dr. René Abarca, al Q.F.B. J. Francisco González, al M. en C. Mario Chopin, al M. en C. Christian Hidalgo, al Dr. Gerardo Leyva, a la M. en C. Rosa Ma. Salgado, al Biol. Eduardo Vera, a la Lic. Araceli Guerra y a la que en su momento formó parte de ese gran equipo, M en C. Gabriela Espinosa, por sus consejos, su supervisión, su tiempo, sus preguntas en los seminarios, pero sobre todo, por su amistad.

Al equipo del Dr. Rafael Franco en el Laboratorio de Infectología del CENIAQ en el INR, sobre todo al Q. en C. Esaú López por todo el apoyo que me brindaron para este proyecto, sin ustedes, su conocimiento y apoyo este trabajo no hubiera llegado a buen puerto.

Al Dr. Víctor M. Zendejas por apoyarme en el proyecto, por sus consejos, por ser una parte fundamental de mi formación como Q.F.B. por enseñarme tanto durante la carrera y ser un gran ejemplo a seguir.

Y a todas las personas que estuvieron a mi lado durante estos 2 años de trabajo, esfuerzo, cansancio, pero sobre todo, mucho aprendizaje.

A todos ustedes, MUCHAS GRACIAS POR SER PARTE DE ESTO.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	I
Índice de figuras.....	IV
Lista de abreviaturas.....	V
Resumen.....	VI
Introducción.....	1
La piel.....	1
Epidermis.....	1
Dermis.....	2
Hipodermis.....	3
Heridas.....	3
Inflamación.....	4
Los fagocitos.....	5
Fagocitos mononucleares.....	6
Citocinas.....	7
Infecciones.....	8
Mecanismos de resistencia bacteriana.....	9
Hidrofobicidad bacteriana.....	11
Inflamación derivada de la infección (endo y exotoxinas).....	12
Control microbiano (terapias).....	14
Apósitos de cobertura.....	15
Apósitos hidrofóbicos.....	17
Cloruro de Dialquil Carbamoilo (DACC).....	18
Efecto <i>in vitro</i> del apósito hidrofóbico recubierto con DACC.....	18
Efecto <i>in vivo</i> del apósito hidrofóbico recubierto con DACC.....	20
Objetivos.....	22
General.....	22
Particulares.....	22
Hipótesis.....	23
Materiales y métodos.....	24
Cultivo bacteriano.....	24

Preparación de los apósitos.....	24
Cultivo celular.....	27
Evaluación de la actividad mitocondrial de macrófagos tratados con sobrenadantes del cultivo bacteriano a su vez tratado con el apósito hidrofóbico (Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT).....	28
Análisis de la expresión del TNF- α por medio de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA.....	30
Resultados.....	33
Discusión.....	44
Conclusiones.....	50
Referencias:.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la piel humana y sus apéndices.....	1
Figura 2: Ilustración de los pasos que sigue la inflamación.....	5
Figura 3: Origen hematopoyético de los macrófagos.....	7
Figura 4: Tabla de TLRs conocidos y los ligandos tanto microbianos como endógenos a los cuales se unen los receptores.....	13
Figura 5: TLRs más conocidos con sus ligandos.....	14
Figura 6: PAMPs y DAMPs reconocidos por el sistema inmune.....	15
Figura 7: Resultados obtenidos de la comparación de tiempos de los diferentes apósitos, resultados MRSA y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 8: Gráficas de los resultados obtenidos por nefelometría de ambas cepas, resultados obtenidos con MRSA y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 9: Materiales empleados en la preparación de la caja de 24 pozos.....	25
Figura 10: Cortes de los apósitos usados en las pruebas.....	25
Figura 11: Esquema de la colocación de los apósitos y la suspensión de bacterias en la caja de 24 pozos...	26
Figura 12: Morfología normal de los macrófagos RAW264.7.....	28
Figura 13: Imagen de macrófagos tras la incubación con MTT por 4 horas.....	30
Figura 14: Esquema del desarrollo teórico de la prueba de ELISA.....	32
Gráfica 1: Crecimiento bacteriano en los sobrenadantes de cultivo de <i>S. aureus</i> incubados con PBS por 3h.....	33
Gráfica 2: Porcentaje de cambio tomando el comportamiento del grupo Control como 100% en los grupos incubados 3 horas en PBS.....	34
Gráfica 3: Retención bacteriana en los diferentes apósitos ocupados en la incubación a 3 horas en PBS.....	35
Gráfica 4: Crecimiento bacteriano en los sobrenadantes de cultivo de <i>S. aureus</i> incubados en caldo MH por 3h.....	36
Gráfica 5: Porcentaje de cambio tomando el comportamiento del grupo Control como 100% en los grupos incubados 3 horas en caldo MH.....	37
Gráfica 6: Retención bacteriana en los diferentes apósitos ocupados en la incubación a 3 horas en PBS.....	38
Gráfica 7: Prueba de MTT para los macrófagos sometidos a los sobrenadantes filtrados obtenidos del cultivo de <i>s. aureus</i> incubados en PBS.....	39
Gráfica 8: Prueba de MTT para los macrófagos sometidos a los sobrenadantes filtrados obtenidos del cultivo de <i>s. aureus</i> incubados en caldo MH.....	40
Gráfica 9: Concentración de TNF- α secretado por los macrófagos enfrentados a los sobrenadantes filtrados de la incubación a 3 horas de <i>s. aureus</i> en PBS.....	41
Gráfica 10: Concentración de TNF- α presente en los sobrenadantes obtenidos de los macrófagos tras enfrentarlos con el sobrenadante de PBS.....	42

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DACC: Cloruro de dialquil carbamoilo

mL: Mililitros

μL: Microlitros

MH: Caldo de cultivo Mueller Hinton

PBS: Buffer salino de fosfatos

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Medio de Eagle modificado por Dulbecco)

S. aureus: Staphylococcus aureus

cm: Centímetros

SFB: Suero fetal bovino

UFC: Unidades formadoras de colonias

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

mg: Miligramos

nm: Nanometros

mM: Milimolar

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

TLR: Receptores tipoToll

PHMB: Poli hexametileno de Biguanida

PMN: Polimorfonucleares

MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina)

Resumen:

Las heridas, sin importar cuál sea su etiología, son un problema de salud que puede tratarse de diferentes maneras, sin embargo, todos parten de la premisa de que una herida siempre se encuentra contaminada, y parte vital del tratamiento es el evitar la infección. El mal empleo de las diferentes técnicas y tratamientos para eliminar microorganismos de las heridas han desencadenado un problema grave al provocar resistencia biológica, lo cual dificulta al médico y al paciente lidiar con este tipo de padecimientos, terapéuticas como la de los apósitos hidrofóbicos, como los cubiertos con cloruro de dialquilcarbamoilo (DACC), son una alternativa para casos en los cuales otros tratamientos han fallado.

En el presente estudio se evaluó la capacidad de un apósito hidrofóbico impregnado con DACC para retener microorganismos (*Staphylococcus aureus*) y demostrar que el efecto no favorece la activación de macrófagos como célula inflamatoria clave. Para esto se incubaron los apósitos cubiertos con DACC, DACC en Gel acuoso, y Gasa de algodón en una suspensión bacteriana de concentración de 1×10^6 UFC/mL durante 3 horas en 2 medios diferentes (PBS y caldo Mueller-Hinton). Posteriormente, se retiraron los apósitos de los sobrenadantes para cuantificar, las bacterias presentes en el medio y las adheridas a los apósitos. Además, se incubaron los filtrados recuperados de los sobrenadantes del cultivo microbiano con macrófagos murinos, a los cuales se les realizó la prueba de reducción de MTT y expresión de TNF- α .

Comparativamente hablando, los grupos con los apósitos de DACC parecen brindar un microambiente adecuado para el crecimiento de bacterias comparándolas con el control, pero fueron los que menor expresión de TNF- α presentaron, mientras que la gasa de algodón presentó un aumento considerable en el crecimiento bacteriano pero ligero en la expresión de la citocina.

Los resultados mostraron que si bien la cantidad de bacterias adheridas a los apósitos no es muy alta, éstos no dañan a las bacterias de manera tal que sus productos puedan sobrestimular la actividad mitocondrial o la liberación en grandes cantidades de TNF- α por parte de los macrófagos, por lo cual la terapéutica empleada, al menos *in vitro*, presenta una buena opción para ayudar a disminuir la sobreactivación del sistema inmunitario y posteriormente mejorar la cicatrización de los pacientes.

1. Introducción:

1.1 LA PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo, sirve principalmente como barrera protectora en contra del ambiente, aunque también regula la temperatura corporal y el balance electrolítico. Contiene terminaciones nerviosas de diferentes tipos que identifican sensaciones como el dolor, la presión y temperatura. La pérdida de integridad de segmentos extensos, debido a heridas o enfermedades puede resultar en discapacidad o incluso la muerte. (Rashmi T *et al.* 2008, Priya SG *et al.*, 2007)

El desarrollo de la piel como órgano inicia durante la etapa embrionaria; sin embargo, su desarrollo final ocurre de manera postnatal. En los humanos adultos, la estructura de la piel se puede categorizar de manera general en 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis (Rashmi T *et al.* 2008).

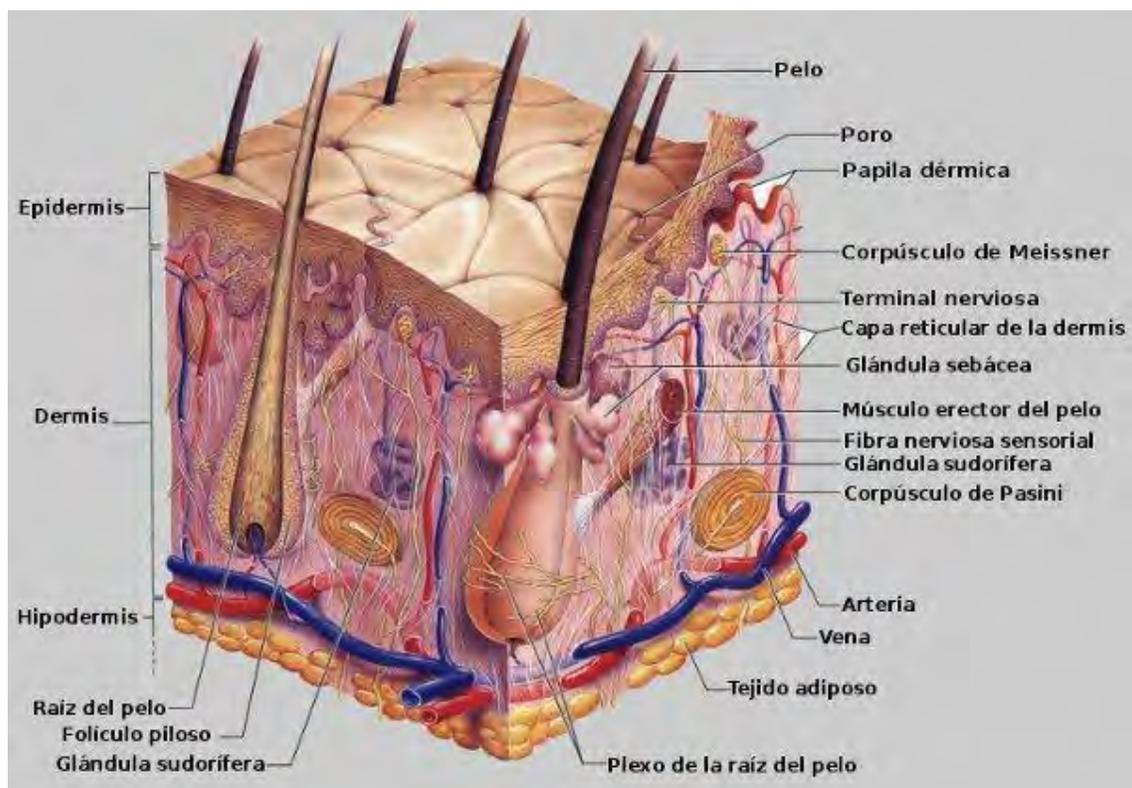


Figura 1. Esquema de la piel humana y sus apéndices. Tomado de: <http://www.sabelotodo.org/anatomia/piel.html> 4-11-2013

1.1.1 La Epidermis:

La epidermis es la capa más externa y expuesta al ambiente, está compuesta por el estrato córneo, el estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. *El estrato córneo* es una capa de espesor aproximado de 10 a 15 células no viables, con queratinocitos anucleados, orientados como “ladrillos” y embebidos en los lípidos

circundantes (que sirven como “mortero”). Para evitar que la capa córnea sea viable, la siguiente capa, el *estrato granuloso* (1 a 3 células de ancho), contiene enzimas que tienen la capacidad de degradar organelos celulares vitales como el núcleo. Mediante la síntesis de queratina y la degradación de organelos celulares, los queratinocitos en esta capa gradualmente se diferencian en corneocitos. Los queratinocitos también sintetizan gránulos que llevan precursores para las láminas intercelulares de lípidos del estrato córneo (cuerpos lamelares). El *estrato espinoso*, la siguiente capa viable de la epidermis consiste en 2 a 6 capas de queratinocitos columnares que se modifican a ellos mismos en formas poligonales. La queratina en esta capa se agrega en forma de filamentos llamados “tonofilamentos” que después de la condensación producen estructuras conectivas de membranas celulares llamadas desmosomas. El estrato espinoso junto con el estrato inferior, la capa basal, son conocidas como la capa Malpighi. El *estrato basal* es la capa que tiene las células con todos los organelos clásicos y es la única que es capaz de realizar la división celular. Los queratinocitos en esta capa se conectan con la membrana base (o membrana dermo-epidermal) por estructuras proteínicas llamadas hemidesmosomas y con las células del estrato espinoso con desmosomas. Además de los queratinocitos, otras células especializadas presentes en la capa basal son melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Los melanocitos secretan melanosomas que contienen melanina, la cual protege la piel de la radiación ultravioleta y radicales libres. Las células de Langerhans son derivadas de la médula ósea y como parte del sistema inmunitario funcionan como células presentadoras de antígeno para la piel. Finalmente, las células de Merkel junto con las terminaciones nerviosas son responsables de las sensaciones cutáneas (Rashmi T *et al.* 2008).

1.1.2 Dermis

La dermis es la siguiente capa, de 3 a 5 mm de ancho y está compuesta de numerosos tejidos conjuntivos, especialmente fibras de colágena y tejidos elásticos que proveen respectivamente soporte y flexibilidad a la dermis. Ésta es abastecida por una red reticulada de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminaciones nerviosas y numerosos apéndices (Rashmi T *et al.* 2008).

Hay 3 apéndices principales a decir: folículos capilares, glándulas sebáceas y glándulas eccrinas presentes en la piel. Los folículos capilares cubren el cuerpo completo salvo las plantas de pies, palmas de manos y los labios. El sebo secretado por las glándulas sebáceas, asociadas a los folículos, está compuesto por ácidos grasos libres, triglicéridos y ceras que juegan un papel vital en la lubricación de la piel y mantiene el

pH de la superficie aproximadamente en 5.0. Las glándulas eccrinas (o sudoríparas) que se originan en la dermis secretan sudor (una solución diluida de sales con pH de 5.0) en respuesta a estrés físico o emocional. Todos los apéndices actúan como "rutas alternas" para sustancias permeables que pueden entrar a capas profundas de la piel sin dañar el estrato córneo (Rashmi T *et al.* 2008).

1.1.3 Hipodermis

La hipodermis o capa grasa subcutánea, conecta la dermis con los órganos bajo ella. Esta provee aislamiento al cuerpo, lo ayuda con la regulación térmica, provee de energía y lo protege de daños mecánicos. Las células principales presentes en la hipodermis son los adipocitos (más de 100 μm), células redondeadas con un citoplasma cargado de lípidos (triglicéridos, ácidos grasos) que comprimen el núcleo contra la membrana celular. En las tinciones rutinarias, los adipocitos parecen vacíos porque su contenido se disuelve durante el proceso de fijación-deshidratación. Mediante inmunohistoquímica, ellos muestran una expresión pericelular de proteína S100 y vimentina. Los adipocitos están dispuestos en lóbulos primarios y secundarios, la morfología varía algo de acuerdo con el sexo y la región del cuerpo considerado. Estos lóbulos están separados por fibroblastos, células cebadas, la parte más profunda de las glándulas sudoríparas, así como vasos y nervios que contribuyen a la formación de los plexos cutáneos correspondientes. (Rashmi T *et al.* 2008 y Kanitakis J 2002).

1.2 Heridas

Una herida es la pérdida de continuidad de la piel o mucosas producida por algún agente físico o químico (Salem Z Ch *et al.* 2000); es decir, una herida es el efecto producido por un agente externo que actúa de manera brusca sobre una parte de nuestro organismo, superando la resistencia de los tejidos sobre el que incide (García-Alonso I. 2013). Éstas se pueden clasificar de diferentes maneras, por ejemplo, en relación con la **dirección** al eje principal del área que afectan (longitudinales, transversales, oblicuas o espiroideas) o a la **profundidad** de las mismas (arañazos, desolladuras, superficial o profundas). Una subclasificación de las heridas, pueden ser las **penetrantes** o las que alcanzan alguna cavidad natural del cuerpo, como la peritoneal y las **perforantes**, que penetran en alguna víscera hueca, como alguna parte del tubo digestivo. La **forma** de la herida puede ser tomada también como una forma de clasificación (lineales, curvas, arqueadas, estrelladas, puntiformes, irregulares) que a su vez también tiene algunas subclasificaciones, en la cual aparecen las

heridas con *colgajo* donde existe un amplio despegamiento del tejido manteniéndose unido solamente por un puente o pedículo, y también están las que presentan *pérdida de sustancia* en las cuales se retira por completo el tejido del lecho de la herida. También tenemos que tomar en cuenta el *mecanismo* por el cual se genera la herida, cuando se produce por un objeto puntiagudo de forma más o menos cónica se le denomina *punzante*; también cuando se realizan con objetos de corte o mediante una compresión tal que provoque la rotura de la piel o mucosas se llaman incisivas; mientras que si el objeto es romo se denominan contusas (García-Alonso I, 2013), si éstas son realizadas a través de la temperatura se llaman quemaduras. Y por último, se pueden clasificar también debido al *tiempo de evolución* que presentan en agudas o crónicas (Esteva E. 2006).

Cabe mencionar que la piel de un adulto tiene un área aproximada de 2m^2 y es la segunda barrera del cuerpo contra microorganismos ambientales y materiales ajenos. Sin embargo, dada su localización externa la piel es colonizada de manera normal por microorganismos y es frecuentemente agredida por traumas y quemaduras. Es por eso que ante un daño, la piel se vuelve un portal común de entrada para una gran cantidad de microorganismos y sustancias extrañas, lo que da lugar a una respuesta inmunitaria (Abbas AK, *et al.* 2012).

1.3 Inflamación

La inflamación es una reacción de defensa que se manifiesta ante cualquier agresión, actúa como un mecanismo homeostático y tiene como finalidad adaptar al organismo a circunstancias anormales, es un fenómeno complejo que se presenta ante estímulos generadores de lesión tisular. Su objetivo es localizar el proceso, remover el agente causal y reparar el área dañada, y podemos dividirla en diferentes etapas para su estudio:

Quimiotaxis: Atracción que se realiza gracias a un gradiente de concentración inducido por sustancias inflamatorias; a través de este proceso llegan y se acumulan células en el sitio del daño.

Aumento del diámetro vascular: Estimulado principalmente por sustancias como histamina, bradicinina, eicosanoides y triptasas, los basófilos y las células endoteliales activadas aumentan el flujo de sangre a la herida, lo que genera elevación o tumor, aumento de la temperatura y enrojecimiento local.

Aumento de la permeabilidad vascular: La dilatación capilar permite el paso de líquido y proteínas sanguíneas, lo que al acumularse produce edema.

Adherencia y rodamiento celular: A través de moléculas de adhesión al endotelio como las selectinas, las células de la sangre se desplazan sobre las endoteliales a través de un proceso que se llama rodamiento. Las quimiocinas como la interleucina (IL) -8 se adhieren a la superficie de los leucocitos en rodamiento e induce en ellos la expresión de moléculas de alta adhesión (integrinas). Otras citocinas como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) - α también actúan simultáneamente para aumentar la expresión de los ligandos de integrinas de los leucocitos.

Diapedesis: Tras el rodamiento, los leucocitos pueden pasar a través de las uniones intercelulares de la barrera endotelial con lo que pueden llegar al tejido inflamado guiados por las señales quimioatrayentes que se van generando (Vega GB, 2008).

La organización anatómica de las células de la fórmula blanca y su habilidad de circular y cambiar entre sangre, linfa, y tejido también es de importancia crítica para la generación de la respuesta inmunológica (Abbas AK, *et al.* 2012).

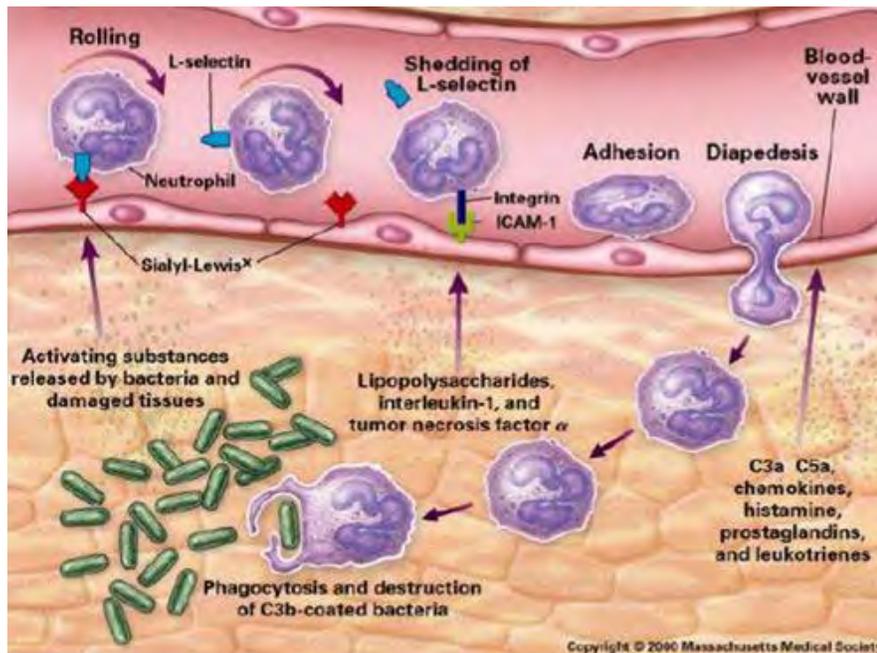


Figura 2: Ilustración de los pasos que sigue la inflamación. Tomado de <http://patologiahumanaxesteban.blogspot.mx/2012/05/inflamacion-aguda.html>

1.3.1 Los fagocitos:

Incluyen a neutrófilos y macrófagos, son células que tienen como función principal identificar, ingerir y destruir microorganismos. La respuesta funcional de los fagocitos en la defensa del hospedero consiste en una serie de pasos: reclutamiento de células en el sitio de infección, reconocimiento y activación e ingestión de microorganismos por el proceso de fagocitosis el cual inicia con el reconocimiento del microorganismo a través de receptores endocíticos (como los tipo Toll, de barrido (*scavengers* en inglés), tipo Nod, etc.) que reconocen patrones moleculares altamente conservados (PAMP, por sus siglas en inglés), lo que les permite actuar contra estímulos sin que hayan estado en contacto previo con ellos, además de reconocer patógenos unidos a IgG y factores de complemento. Esto desencadena una cascada de señales de activación que induce, entre otras cosas, movimientos del citoesqueleto que permiten a la célula emitir proyecciones de la membrana, estos pseudópodos rodean a la partícula extraña y fusionan sus extremos para formar una vacuola llamada fagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas para que el contenido enzimático de éstos actúe y el hidrolizado quede lo suficientemente reducido para que los receptores del linfocitos T puedan presentar los antígenos (Vega GB, 2008). Además, a través del contacto directo y de la secreción de proteínas, se comunican con otras células para promover o regular la respuesta inmunitaria (Abbas AK, *et al.* 2012).

Los macrófagos son un grupo de fagocitos que están de manera constitutiva en tejidos y responden rápidamente a antígenos que entran al organismo. Los monocitos son los precursores de éstos y siempre se encuentran en la sangre, por lo que pueden responder de manera rápida y dirigirse a cualquier parte del cuerpo (Abbas AK, *et al.* 2012).

1.3.2 Fagocitos mononucleares

Consisten en células también llamadas monocitos que tienen un origen común en la médula ósea, que presentan un estado prediferenciado cuando se encuentran circulantes. Son células de 10 a 15 μm de diámetro con un núcleo en forma “frijol” y gránulos citoplasmáticos que contienen lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos del citoesqueleto. Hay 2 tipos de poblaciones, una llamada inflamatoria debido a que es rápidamente reclutada de la sangre a los sitios de inflamación en los tejidos, y otra que puede ser la fuente

de macrófagos residentes y algunas células dendríticas. Cuando entran al tejido, ambas líneas, maduran y se convierten en macrófagos (Abbas AK, *et al.* 2012; Vega GB. 2008 y Lucas T, *et al.* 2010).

Los macrófagos realizan funciones importantes en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa:

Su principal tarea es eliminar los microorganismos, el mecanismo incluye generación enzimática de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como digestión proteolítica. Además, los macrófagos también ingieren células muertas del hospedero como parte de la limpieza del tejido tras una infección o lesión (Abbas AK, *et al.* 2012).

Los macrófagos activados secretan citocinas que participan en la comunicación intercelular para responder de diferentes maneras y contribuir a la defensa del organismo, también sirven como células presentadoras del antígeno que activan a las células T (Abbas AK, *et al.* 2012 y Vega GB. 2008).

Estimulan la reparación del tejido dañado al promover la angiogénesis y la fibrosis; este cambio es posible debido a que hay 2 vías de activación para los macrófagos, una clásica que lo lleva a ser un eficiente eliminador de microorganismos y la alterna, la cual lo dirige a la remodelación y reparación (Abbas AK, *et al.* 2012 y Lucas T, *et al.* 2010).

Los macrófagos, que son las células efectoras dominantes en etapas largas de respuesta inflamatoria, suelen responder a los estímulos a la misma velocidad que los neutrófilos, pero a diferencia de los últimos sobreviven mucho más tiempo en los sitios de inflamación y su infiltración al área del daño la llevan en un estado indiferenciado (Abbas AK, *et al.* 2012).

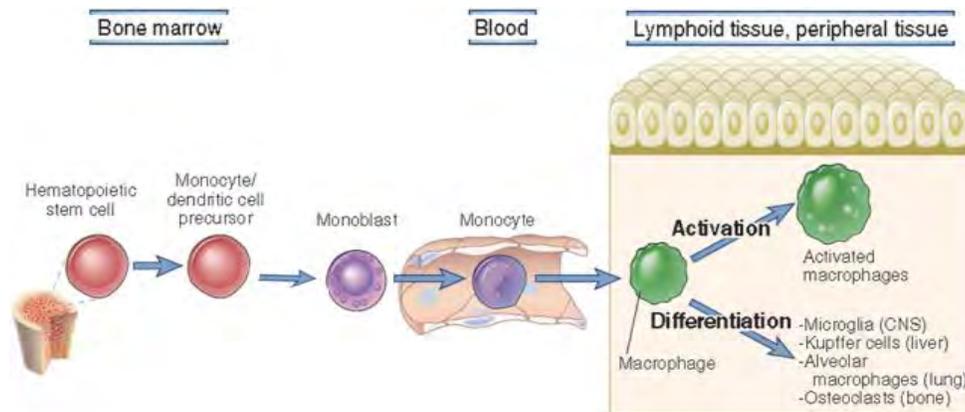


Figura 3: Origen hematopoyético de los macrófagos, Modificado de Abbas AK *et al.* 2012;

1.3.3 Citocinas:

En el proceso de inflamación participan principalmente IL-1, 6 y 8, así como el TNF- α , que son, entre muchas otras funciones quimioatrayentes celulares. La producción de interferones (IFN) tipo I, α y β , es inducida de manera inmediata como respuesta a la infección viral, y el tipo II o IFN γ , también conocido como activador de macrófagos, es secretado en grandes cantidades por células asesinas naturales (NK en inglés). La IL-15, por su parte, activa y favorece el crecimiento de linfocitos T, B, células NK y macrófagos, mientras que opuestamente, la IL-10 regula la respuesta inmunitaria al inactivar tanto a linfocitos T como a macrófagos, esto al igual que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), quien además frena la inflamación e induce la angiogénesis (Vega GB. 2008). Todas las células residentes activas en el proceso de inflamación, así como los fagocitos producen citocinas como el TNF- α e ILs que aumentan la capacidad de fagocitosis de células del sistema inmunitario, donde los niveles elevados de estos factores llevan al reclutamiento de células y proteínas plasmáticas. (Moser M y Leo O. 2010).

El TNF- α es una citocina perteneciente a la superfamilia de mediadores que llevan su nombre, son proteínas monotriméricas y participan en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, aunque en especial el TNF- α tiene una importante actividad proinflamatoria. Esta es secretada principalmente por células como monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T CD4⁺, aunque otros tipos celulares también pueden hacerlo (Anaya M. 2003) y de la misma manera es considerada como una citocina de alarma o de aparición temprana junto con IL-1 y 6 (Vega GB. 2008). Su síntesis puede ser inducida por otras citocinas, tal es el caso de IFN- γ , IL-1, 2 y 12, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor activador de plaquetas (PAF) y el mismo TNF- α . La presencia de TNF- α desencadena la síntesis de citocinas como IL-1, 2, 4, 6, 10, 12 y 18, IFN- γ , TGF- β , PAF, leucotrienos, proteínas de fase aguda y hormonas como el cortisol, epinefrina, glucagon, insulina o norepinefrina, y algunos de ellos mismos actúan en la regulación del factor, tal es el caso de IL-6 y 10, la prostaglandina E2 y el cortisol (Anaya M. 2003).

1.4 Infecciones

La palabra infectar, acorde a la Real Academia de la Lengua, es la acción de invadir o ser invadido por microorganismos patógenos, así como la reproducción en el ser vivo que invaden (RAE. 2013) sin

embargo, solo cuando las bacterias penetran muy profundo en la herida, se multiplican, dañan el tejido o inducen síntomas de inflamación, podemos hablar de una verdadera infección (v.Hallern B, *et al.* 2004).

Debido a que las heridas, por definición son pérdidas de la continuidad de la barrera de protección del cuerpo debe aceptarse que, por el simple hecho de exponer tejidos internos tiene microorganismos en su interior. Estos penetran en la herida movilizados por el agente traumático del que proceden y/o de la superficie del mismo organismo. Además de esta contaminación primaria, también se puede presentar la llegada posterior de otros microorganismos del medio ambiente, de las excreciones que se producen en la proximidad de la herida o por el contacto directo con objetos no estériles (García-Alonso I. 2013).

Los microorganismos que llegan a una herida deben de adaptarse a las nuevas condiciones del medio antes de poder multiplicarse. Esto conlleva a cambios en el metabolismo como la producción de nuevas enzimas, o en cantidades diferentes, lo cual implica tiempo. Durante este periodo de adaptación en que existen los microorganismos en la herida, pero sin capacidad patógena, se le denomina “contaminación”. Transcurrida esta primera fase de latencia o adaptación, si no han sido eliminados del organismo comienza la fase de crecimiento logarítmico en la cual se empieza a gestar una infección propiamente (García-Alonso I. 2013).

En conclusión, las infecciones suelen ser complicaciones severas que pueden llevar, incluso, a considerar varios procedimientos en el paciente, prolongando su estadía en el hospital y aumentando de manera considerable los costos del tratamiento (v.Hallern B, *et al.* 2004).

1.5 Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias patógenas, a diferencia de las comensales, activan la respuesta inmunitaria al decodificar factores que permiten la adherencia y translocación a través de la barrera epitelial, los patógenos muestran el potencial de invasión y destrucción de tejidos, llevando a una posible diseminación sistémica. Las bacterias patógenas pueden ocupar diferentes estrategias para burlar el sistema inmunitario del hospedero, algunas aplican estrategias de evasión para distraer la detección en las etapas iniciales, mientras que otras confrontan los mecanismos del sistema inmunológico, tanto innato como adaptativo; estos mecanismos incluyen:

- Patrones de reconocimiento, no obstante que algunos PAMP son compartidos por microorganismos patógenos y comensales. Así, hay características que distinguen ambos grupos de microorganismos, por ejemplo, varios tipos de bacterias patógenas, han desarrollado estrategias para disminuir su toxicidad generada a través de endotoxinas al reducir la acilación de lípido A (las bacterias comensales suelen ser pentaaciladas, mientras que las patógenas contienen un grupo acilo extra).
- Evasión de la muerte por PMN: Ésta representa la primera línea de defensa contra bacterias Gram positivas, lo que se consigue a través de enzimas e inmunoreguladores llamados “modulinas” que inhiben la quimiotaxis neutrofílica; efecto observado en diferentes cepas de *S. aureus* aislados de heridas y que además se unen con gran afinidad al receptor C5a y a otros receptores en los neutrófilos, por lo que bloquean su unión a los respectivos agonistas.
- Evitando la muerte por macrófagos: El sistema secretor tipo III (TTSS, por sus siglas en inglés) y sus moléculas efectoras fueron descritos originalmente en las Gram negativas: Shigella y Salmonella, donde el sistema secretor interactúa con la actina del citoesqueleto para entrar en las células epiteliales. Asimismo, tiene capacidad para alterar la fagocitosis y la lisis bacteriana, o simplemente puede matar a los macrófagos, por lo que el TTSS altera el mecanismo de la defensa innata.
- Amortiguación de las señales de la inflamación: Además de las alteraciones del citoesqueleto que suprimen la fagocitosis, existen 2 moléculas “yop” de *Yersinia sp.* que son usadas para la amortiguación de la respuesta inmunológica. Por ejemplo, YopP/J es una proteasa de cisteína que interrumpe en las vías de NF- κ B y MKK, posiblemente al actuar como una desubiquitinasa. Ésta inhibe la respuesta proinflamatoria al disminuir la expresión de citocinas como TNF- α , pero al mismo tiempo también induce apoptosis de macrófagos infectados.
- Desactivando células del sistema inmunitario: Algunos factores de virulencia de las bacterias pueden infligir daño global en la reactividad inmunológica al tener como objetivo la inactivación o destrucción de células hematopoyéticas. Por ejemplo, al paralizar a los iniciadores esenciales y efectores de la respuesta inmunitaria (macrófagos, células dendríticas y linfocitos) algunas toxinas pueden modificar dramáticamente la capacidad de respuesta para resistir la invasión bacteriana, tal es el caso de la listeriolisina O de *Listeria monocitogenes* que causa lisis de la membrana celular permitiendo que se libere del citoplasma de la célula y se multiplique de célula en célula.

- Trastornando funciones de células dendríticas: Varios patógenos parecen interferir con la capacidad de estimular de manera eficiente a las células T por parte de las células dendríticas (DC), ya sea por la falla en la presentación antigénica o suprimiendo las funciones coestimuladoras. La toxina tripartita de *Bacillus anthracis* puede de manera selectiva disminuir la población de macrófagos, y a pesar de que no consigue lisar a las DC, si tiene la capacidad de afectar de manera severa su función primaria.
- Disparando efectores adaptativos inmunológicos: Las cepas de *S. aureus* suelen expresar superantígenos, que son sustancias de origen viral o bacteriano que suele unir al MHC II y los TCR, lo que activa al 30% de los linfocitos, mientras que un antígeno convencional activa solo el 0.001% (Vega GB, 2009). Entre ellos, la enterotoxina estafilocócica y la toxina del síndrome de shock sistémico-1, causan efectos sistémicos como la emesis (vómito) o diarrea, pero también malestar severo o incluso el choque; efecto generado en gran parte por la rápida liberación de citocinas proinflamatorias (Sansonetti PJ y Di Santo JP. 2007).

1.6 Hidrofobicidad bacteriana

Como ya se dijo, las infecciones son causadas por microorganismos patógenos que pueden penetrar en una herida donde se multiplican, causando un daño local debido a la liberación de toxinas y enzimas. (Ljungh A y Wadström T. 2005). Las infecciones en tejidos blandos como la piel son causadas de manera común por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* grupo A, *Pseudomonas aeruginosa*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, enterococos, así como los anaerobios *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides fragilis*. Las infecciones crónicas son por lo regular de origen polimicrobiano, pudiendo encontrar también hongos como el *Tricophyton spp* y la *Candida albicans*, mientras que los anaerobios son subestimados (Ljungh A, *et al.* 2006 y Ljungh A y Wandtröm T. 1995). Además, se han encontrado heridas con diferentes tipos de microorganismos resistentes a tratamientos, tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, especies de enterococos, *Pseudomonas aeruginosa* así como con *Staphylococcus coagulasa negativos* y *Streptococcus*. (Ljungh A y Wadström T. 2005).

Las heridas traumáticas son siempre sujeto de un mayor número de contaminación con microorganismos. Especialmente abrasiones superficiales, laceraciones y contusiones requieren no solamente desinfección extensa y posible tratamiento quirúrgico, sino también una correcta forma de vendaje que ayude

a proteger la zona (v.Hallern B *et al*, 2004) aunque la presencia de material ajeno al cuerpo, como la sutura es capaz de disminuir la dosis de microorganismos necesarios para la infección por un efecto mecánico de acercamiento del borde de la herida (Ljungh A y Wadström T 2005). Cuando la bacteria alcanza la piel o mucosas, debe disponer de mecanismos de adherencia para poder colonizarla; de manera genérica las estructuras bacterianas responsables de este proceso reciben el nombre de adhesinas. En las bacterias Gram negativas el proceso más estudiado es el mediado por fimbrias y *pilis*, normalmente la proteína ubicada en el extremo de la fimbria es la adhesina propiamente dicha, la cual se adhiere al receptor de la célula huésped constituido por regla general, por residuos de carbohidratos de glicoproteínas o glicolípidos. Algunas bacterias Gram negativas poseen proteínas localizadas en la membrana externa que tienen un papel importante en la adherencia, se llaman adhesinas afimbriadas, y en algunos casos usan ambos métodos para adherirse a la célula; las bacterias Gram positivas pueden presentar estructuras similares a las fimbrias, pero parecen no desempeñar un papel importante en la adherencia. Aunque existe la adherencia afimbriada que media la unión de la bacteria con fibronectina (proteína de la matriz extracelular), éstas suelen estar ancladas al péptidoglicano y la adherencia es bastante específica. (Villa J, *et al*. 2008)

Hasta el momento, se han definido 3 tipos principales de interacción adhesina receptor: 1) Lectina-carbohidrato, por ejemplo, la fimbria tipo 1 de *E. coli* y la célula epitelial de la vejiga urinaria; 2) Proteína-proteína, por ejemplo, la proteína F de *Streptococcus pyogenes* y fibronectina o 3) Hidrofobina-proteína, por ejemplo, el ácido lipoteicoico y la fibrina (Villa J, *et al*. 2008). Sin embargo, no solo se puede presentar este tipo de interacciones de adhesión, sino que también pueden tomar lugar algunas de tipo hidrofóbicas (cuando las moléculas hidrófobas de la pared bacteriana se encuentran con estructuras de la misma característica), o de interacciones electrostáticas (debido a que los microorganismos presentan carga neta negativa en su superficie y se encuentran con estructuras de carga positiva) (Ljungh A, *et al*. 2006).

Algunos estudios realizados *in vitro* han demostrado que diversos factores afectan la hidrofobicidad de las bacterias, entre ellas la nutrición que se les brinda a través de los medios de cultivo, obteniendo mejores resultados con agares enriquecidos con sangre (Mamo W, *et al*. 1987), lo cual se puede traducir en que las bacterias pueden cambiar esa capacidad de adherirse a los tejidos dependiendo del microambiente donde se encuentre.

1.7 Inflamación derivada de la infección (endo y exotoxinas)

Los signos clásicos de infección incluyen enrojecimiento de la zona, hinchazón, hipertermia, dolor y pérdida de la función de la zona afectada. Los signos y síntomas generales como la fiebre, escalofríos y parámetros elevados de inflamación como leucocitosis, Proteína C reactiva e inflamación de los nodos linfáticos de la zona son también parámetros definitivos de un proceso infeccioso (v.Hallern B, *et al.* 2004). Las células del sistema inmunitario innato son capaces de detectar un patógeno invasor a través de una serie limitada de receptores codificados para las bacterias. Estos receptores inmunitarios innatos, referidos comúnmente como receptores de reconocimiento de patrones (PRR), reconocen una serie de moléculas conservadas expresadas en la estructura de patógenos de una determinada clase. Estas moléculas derivadas de patógenos o PAMPS, generalmente representan estructuras moleculares complejas que son distintivas para una serie de patógenos, como las bacterias Gram negativas. Dentro de los PRR, los receptores tipo Toll (TLR) han emergido como un componente pivote en la inmunidad innata y se pueden clasificar basados en su localización y en tipo de PAMP que reconocen, los TLR 1, 2, 4, 5 y 6, son principalmente expresados en la superficie celular y reconocen básicamente productos bacterianos (Moser M y Leo O. 2010).

TLR	Ligando microbiano	Ligando endógeno
TLR1	Peptidoglicano, lipopeptidos	----
TLR2	Lipopeptidos, ácido lipoteicoico. Glicopeptidos, zymosan	----
TLR3	dsRNA, siRNA	mRNA
TLR4	Lipoolisacarido, Proteinas de fusión RSV, tumores de ratón, proteína de recubrimiento de virus	HSP, defensina 2, fibrinógeno, ácido hialuronico
TLR5	Flagelina	----
TLR6	Lipopeptidos	----
TLR7/TLR8	ssRNA, imidazoquinolina, imiquinodina	Autoantígenos con complejos inmunes
TLR9	CpGDNA	Complejo de Cromatina
TLR10	Desconocido	Desconocido

Figura 4: Tabla que muestra los TLRs conocidos, y los ligandos, tanto microbianos como endógenos, a los cuales se sabe, se unen estos receptores. Tomado de Moser M y Leo O. 2010

Las estructuras diferentes que se expresan acorde a cada grupo de PAMP es única en los microorganismos y diferente a los que encontramos en los seres humanos, tal es el caso de la doble cadena de RNA encontrada en virus de replicación, y secuencias de DNA CpG sin metilar en las bacterias; proteínas características encontradas en microorganismos, como las iniciadas por N-formilmietionina, que es típica de

proteínas bacterianas y complejos de lípidos con carbohidratos que son sintetizados por microorganismos pero no por las células de mamíferos, como es el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas, el ácido lipoteicoico en bacterias Gram positivas y oligosacáridos ricos en manosa encontrados en glicoproteínas microbianas (Abbas AK, *et al.* 2012).

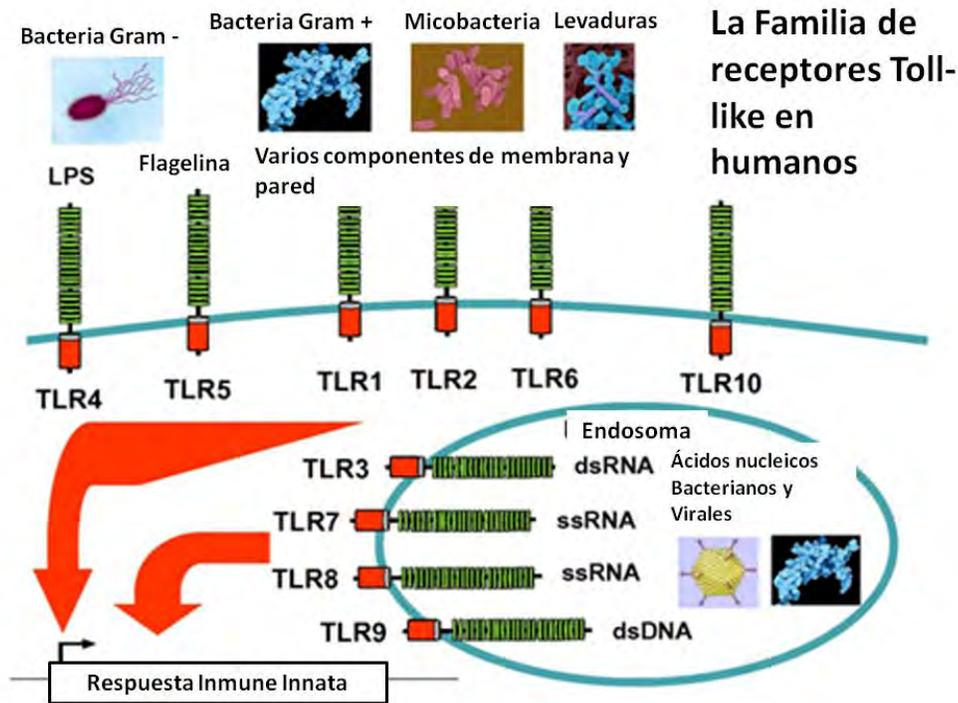


Figura 5: TLRs más conocidos con sus ligandos. Modificado de <http://mcb.illinois.edu/faculty/profile/tapping/>

En la actualidad solo hay un número limitado de diferencias fundamentales entre moléculas microbianas y las producidas por organismos superiores, a pesar de ello el sistema inmune ha evolucionado para reconocer solo un grupo de moléculas, la mayoría de las cuales son únicas en los microorganismos (Abbas AK, *et al.* 2012).

Patrones moleculares asociados a patógenos		Tipo microbiano
Ácidos nucleico	ssRNA	Virus
	dsRNA	Virus
	CPG	Virus, Bacterias
Proteínas	Pilis	Bacteria
	Flagelina	Bacteria
Lípidos de pared celular	LPS	Bacteria
	Ácido lipoteicoico	Bacteria
Carbohidratos	Manano	Hongo, Bacteria
	Decitin glucanos	Hongo

Patrones moleculares asociados a daño	
Proteínas inducidas por estrés	HSPs
Cristales	Uratos monosodicos
Proteínas nucleares	HMGB1
CpG, guanida-citodina dinucleotica, dsRNA, RNA de doble cadena, HMGB1, grupo caja de alta movilidad 1, HSPs, proteínas de choque térmico, LPS, ssRNA, lipopolisacáridos,	

Figura 6: Ejemplos de PAMPs y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) reconocidos por el sistema inmune.
Tomado de de Abbas AK *et al*, 2012

El sistema inmunitario innato también reconoce productos microbianos que muchas veces son esenciales para la sobrevivencia del microorganismo, esta característica es importante ya que asegura que el objetivo del sistema no sea descartado por los esfuerzos que realiza el microorganismo para evadir el reconocimiento del hospedero, tal es el caso del LPS o del ácido lipoteicoico que son componentes estructurales de la pared celular de las bacterias y que son reconocidos por los receptores, ambos son requeridos para la sobrevivencia de la bacteria por lo que no se pueden descartar (Abbas AK, *et al.* 2012).

1.8 Control microbiano (terapias)

Si se permite que las bacterias presentes en una herida proliferen y se llega al punto de la infección, se puede producir una cicatrización tardía (Moore K y Gray D. 2008), por esto el tratamiento inicial comprende lavado mecánico de la zona con agua, soluciones amortiguadoras y antisépticos para remover las bacterias y desbridar o limpiar quirúrgicamente la zona afectada (Ljungh A y Wadström T. 2005). Ante la sospecha de una infección se deben de tomar algunas medidas para poder mitigar el daño que ésta causa, entre ellos se encuentra el control de la infección, que puede incluir la toma de muestra para cultivo que tiene como objetivo evaluar, identificar y aislar los agentes etiológicos que apoyen al médico clínico en la confirmación diagnóstica y designe el uso de antisépticos y/o antibióticos cuando se considere oportuno (Aburto TI y Morgado AP. 2000).

Una gran cantidad de estudios han demostrado que cuentas bacteriológicas por arriba de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/g de tejido, está relacionada directamente con una pobre cicatrización así como del impedimento de adhesión y sobrevivencia de injertos de piel (Ljungh A y Wadström T. 2005), mientras que en heridas crónicas son responsables de una recuperación lenta de las mismas (v.Hallern B, *et al.* 2004). Cuando se forman seromas o hematomas, es necesario exponer nuevamente la lesión, desbridar el área y dejarla que cierre por segunda intención para mantener el tratamiento con antibiótico tópico; para infecciones severas se utiliza antibiótico sistémico de manera simultánea. Si bien existen coberturas modernas capaces de tratar estas

heridas críticamente infectadas, el uso de compresas impregnadas con antiséptico sigue siendo común. Si ponemos atención al periodo de vida útil de un antiséptico en una herida, este varía de los 10 a los 30 minutos dependiendo de la naturaleza del mismo (v.Hallern B, *et al.* 2004). Actualmente existe una gran cantidad de coberturas que contienen plata, las cuales están sobreutilizadas, su empleo excesivo y la emergente resistencia bacteriana son temas de preocupación, pero también es de observar otros temas importantes como la toxicidad, eficacia clínica y costo-beneficio, así como la necesidad de ser ocluidas (Hampton S. 2007 y Mijndonckx K, *et al.* 2013). Por su parte, el cambio de vendajes que se realiza por lo regular cada 24 horas revela 2 situaciones importantes, una es que el material se adhiere a la herida y segundo es que es difícil de retirar de la misma (v.Hallern B, *et al.* 2004). También existen en el mercado apósitos recubiertos con una sustancia llamada polihexametileno de biguanida (PHMB) el cual se introduce en la membrana de las bacterias y las daña. El PHMB es un compuesto que se ha ocupado por más de 60 años en el control microbiológico, sin embargo apenas se está considerando como opción terapéutica en el cuidado de heridas y del cual hasta el momento no se ha encontrado resistencia bacteriana (Moore K y Gray D. 2008).

1.9 Apósitos de cobertura

Los apósitos deben proporcionar un microambiente adecuado desde la superficie a toda la herida de forma que se produzca la cicatrización en las mejores condiciones posibles, en el menor tiempo y reduciendo al máximo la posibilidad de infección, estos deben de ser: permeables a gases, permeables a la humedad, impermeables a microorganismos, mantener el pH, mantener la temperatura en su funcionalidad, tener baja adherencia a la herida, nula cesión de partículas, elasticidad y flexibilidad, capacidad de absorción, esterilidad, no alergizante y no tóxico (Veses C. 2011); no obstante aún no ha sido creado un dispositivo que incluya todas esas características.

Clasificación apósitos estériles:

Es importante destacar que se refiere a familias de productos, por lo que en la práctica pueden existir una gran cantidad de variables entre las diferentes marcas en cuanto a la configuración, características y presentaciones de los mismos:

1) Apósitos de película de poliuretano (hidrocelulares): Crean un ambiente húmedo en la herida que estimula la reparación tisular y acelera la curación. Cuando se presentan en espumas poliméricas adoptan características hidrófilas semipermeables.

2) Hidrocoloides: compuestos de carboximetilcelulosa sódica (CMC) generalmente se añaden otras sustancias hidroactivas de condición absorbente y otras que le permiten adherirse.

3) Hidrogeles: fundamentalmente, formados por agua más sistemas microcristalinos de polisacáridos o polímeros sintéticos muy absorbentes.

4) Apósitos de silicona: cubierta de silicona y red de poliamida. La naturaleza hidrofóbica de la cubierta de silicona y su suavidad le proporciona microadherencia selectiva.

5) Alginatos: derivados de las algas naturales, son polisacáridos formados por la asociación de los ácidos gulurónico y manurónico, donde la base es una fibra de alginato cálcico.

6) Apósitos de carbón: apósitos de carbón activado que tienen la propiedad de absorber bacterias y eliminar los olores desagradables.

7) Apósitos de plata: su efecto antimicrobiano o bactericida, los hace útiles ante heridas de evolución tórpida, con sospecha de infección o con evidencia de ella.

8) Apósitos con carga iónica: son productos bioactivos que contienen iones de zinc, calcio y manganeso. Los iones son liberados al lecho de la herida favoreciendo la cicatrización en cada una de las fases.

9) Apósitos de colágena: el polvo de colágena tiene alta capacidad hidrofílica y es cicatrizante.

10) Ácido hialurónico: es un polisacárido biológico (glicosaminoglicano) distribuido en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos; gracias a sus propiedades hidrofílicas proporciona un medio hidratado entre las células.

11) Centella asiática: estabiliza la producción de fibras de colágena y promueve la curación del tejido de vascularización.

12) Colagenasa: el principio activo es una colagenasa clostridiopeptidasa A específica, obtenida del cultivo del *Clostridium histolyticum*, que no afecta a las células intactas o tejidos. La acción sinérgica de colagenasa y proteasa asociadas, permite la digestión de los componentes necróticos de la herida.

13) Sulfadiacina argéntica: posee acción bactericida y bacteriostática frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos.

14) Compuestos impregnados: impregnados de parafina y/o lanolina, tienen como función evitar la pérdida transdérmica de agua y a la vez evitan la adherencia a la herida.

15) Ácidos grasos hiperoxigenados (AGHO): son compuestos formados por ácidos grasos esenciales polinsaturados tales como el ácido linoléico. Incrementan la microcirculación sanguínea, facilitan la renovación de las células epidérmicas, aumentan la resistencia de la piel y disminuyen el efecto de los radicales libres.

16) Protectores cutáneos no irritantes (PCNI): carecen de acción citotóxica sobre las células implicadas en cada una de las fases de la cicatrización. Están formados por tres componentes esenciales, un copolímero acrílico formador de la película, un plastificante con base de silicona que permite la flexibilidad de la película y un solvente con una base de silicona no irritante y de rápida evaporación que facilita a su vez la homogeneidad de la mezcla (Veses C. 2011).

1.10 Apósitos hidrofóbicos

Los apósitos hidrofóbicos trabajan mediante interacciones moleculares que se presentan en medios acuosos para poder eliminar a las bacterias del lecho de la herida sin lisarlas, con lo cual, las bacterias no crean resistencia (v.Hallern B, *et al.* 2004), para éstos encontramos marcas comerciales como los Cutimed Sorbact de la empresa BSN Medical de Alemania que promueve el control microbiano basado en su hidrofobicidad. Por su parte, otros apósitos como los TenderWet® Active de Medline de Estado Unidos, solamente la consideran para no evitar la adherencia del apósito al lecho de la herida.

Los apósitos “atrapadores de bacterias” se encuentran manufacturados a partir de fibras de acetato y están recubiertos con un agente hidrofóbico como el cloruro de dialquil carbamoilo (DACC en inglés), un derivado de ácido graso que es altamente lipofílico (v.Hallern B, *et al.* 2004 y Hampton S. 2007) y con el cual

hasta el momento no se han encontrado efectos adversos (como alergias o reacciones de intolerancia) o citotóxicos. Debido a la naturaleza de la interacción que hace que funcione el proceso, se contraindica el uso de sustancias oleosas o de origen graso, como las cremas o gasas vaselinadas. (v.Hallern B, *et al.* 2004).

1.11 Cloruro de Dialquil Carbamoilo (DACC)

Cuando dos moléculas repelentes al agua (hidrofóbicas) se encuentran en un medio húmedo, aumenta su entropía, y a pesar de que no hay una fuerza de atracción mutua, se asocian por interacciones hidrofóbicas y expulsan toda el agua que se encuentra entre ellas. Por su parte, la expresión de moléculas hidrofóbicas de superficie microbiana es un mecanismo importante de adhesión y su presencia puede ser desencadenada, entre otros factores, por la falta de nutrientes. (Ljungh A, *et al.* 2006).

La presencia del derivado de ácido graso, DACC y que recubre las fibras de acetato en el apósito previamente descrito, le da al dispositivo un carácter altamente hidrófobo, lo cual le permite que una vez en contacto con la cama de la herida y en presencia de humedad, favorece la interacción con los microorganismos al adherirlos al apósito, con lo cual al eliminarlo se reduce la concentración de contaminación bacteriana en la herida. (Hampton S. 2007, Rosana Y, *et al.* 2009 y Powell G. 2009) De esta manera, cada vez que se realiza el cambio de materiales en la curación se arrastran a las bacterias adheridas a las fibras y con esto va disminuyendo la carga bacteriana (v.Hallern B, *et al.* 2004 y Powell G. 2009).

1.12 Efectos *in-vitro* del apósito hidrofóbico recubierto con DACC

En el trabajo de Yeva Rosana y cols., el cual está relacionado con pruebas *in vitro* realizadas al apósito hidrofóbico, se pusieron a prueba los apósitos recubiertos con el DACC y se compararon contra gasas convencionales, se encontró que tras incubar a diferentes tiempos los apósitos con las suspensiones bacterianas de MRSA y *Pseudomonas aeruginosa* por 18 o 24 horas, la cantidad de bacterias retenidas por el apósito hidrofóbico fue mayor que con la gasa (Figura 7).

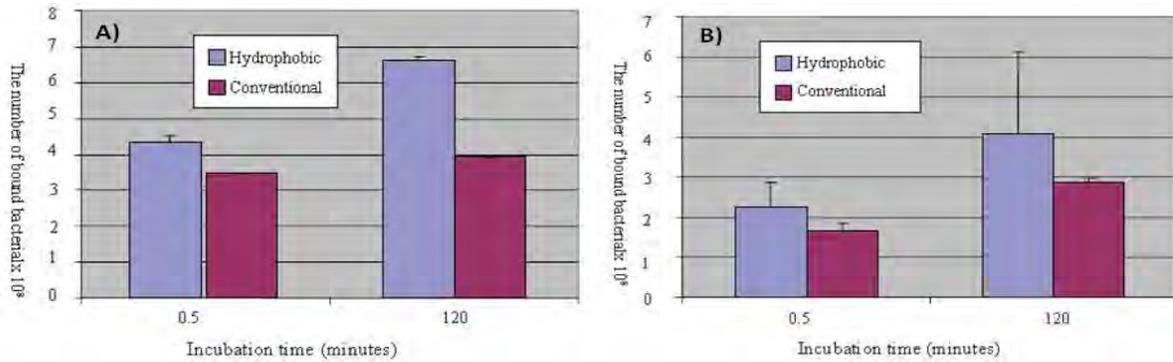


Figura 7: Resultados obtenidos de la comparación de tiempos de los diferentes apósitos, en el A tenemos los resultados del MRSA, y en el B los resultados de *Pseudomonas aeruginosa*, Tomado de Rosana Y,

Además, los resultados que se obtuvieron de una cinética de adherencia al apósito con ambas cepas, demostraron que el máximo de adhesión se presentó a las 2 horas de incubación (Figura 8).

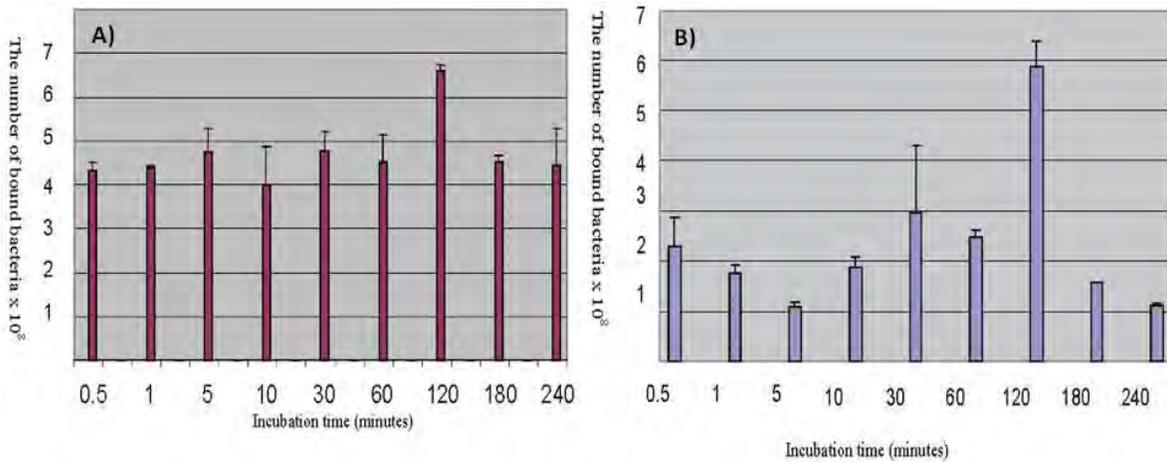


Figura 8: Gráficas de los resultados obtenidos por nefelometría de ambas cepas, la gráfica A muestra los resultados obtenidos del MRSA y la B de la *Pseudomonas aeruginosa*, Tomado de Rosana Y.

Sin embargo, consideramos que la metodología seguida por este grupo de investigadores no es la más adecuada debido a una serie de faltas técnicas, por citar algunas, la carencia de controles que muestren el comportamiento normal de las bacterias sin los apósitos, el recorte de tiempos a seguir con la gasa normal, y el hecho de que el número de bacterias registrado en los resultados no es exactamente el número de bacterias que están adheridos a la malla, si no que se tratan de las bacterias que se obtienen del crecimiento de las que estuvieron adheridas, por eso es que se tienen números más grandes que los del inóculo inicial (Rosana Y *et al.*2009).

1.13 Efectos *in-vivo* del apósito hidrofóbico recubierto con DACC

El uso clínico de este apósito está avalado en una serie de reportes en los cuales se muestra que pueden ocuparse en diferente tipos de heridas, tanto crónicas, como las úlceras venosas (v.Hallern B. 2008), arteriales (Zemanek M. 2008) o úlceras de presión (Lang F. 2008), por mencionar algunos ejemplos. Incluso en heridas agudas, ya fueran traumáticas (v.Hallern M-R. 2008) o de intervenciones intrahospitalarias (Duffels W y Boomars S. 2009, v.Hallern B. 2008 y Doerk M-R. 2008), incluyendo lo reportado por Cartan K y Webb L quienes los han empleado en uso veterinario (Cartan K, Webb L). También se ha ocupado en casos con bacterias multiresistentes (Probst A. 2008) y en caso de infecciones fúngicas, donde Claesson M, y cols. obtuvieron resultados positivos para los pacientes sin importar la etiología de la lesión, aunque en algunos casos después de tratamientos prolongados (Claesson M *et al.*).

En el reporte de Hampton S. de 2007, además de mostrar las cantidades de casos con mejoras y las etiologías de las heridas, se hizo una evaluación de características interesantes, como el mal olor, el cual era evidente en 56% de las heridas al empezar el tratamiento; a las 4 semanas ninguna herida presentaba esta característica. Además de que se realizó una escala análoga sensorial de medición del dolor, a través de la cual todos los pacientes mostraron una disminución significativa de éste. Cabe mencionar que el cambio de las cubiertas se vuelve mucho menos agresivo, coincidiendo con lo reportado por v. Hallern B. Doerk M.-R. y v. d. Weth A. en 2004, así como por Kammerlander G y cols.; en este último caso, de un estudio total de 116 pacientes se pudo notar que el 93% de ellos tuvo una mejoría importante o se curó la herida en cuestión (v.Hallern, B. Doerk M.-R. y v.d.Weth A, 2004 y Kammerlander G *et al.*).

Ljungh A. Yanagisawa N. y Wadstöm T. en su trabajo del 2006 hacen referencia a estudios en los que se atendieron a pacientes con heridas de pie diabético infectadas, arteroesclerosis, lesiones post operativas, úlceras en miembros inferiores, lesiones post-trauma, así como en heridas crónicas como úlceras de presión, quemaduras y otras heridas diabéticas, algunas de ellas ya tratadas con estrategias convencionales y sin obtener resultados benéficos para el paciente. En este caso se logró controlar la infección durante el tratamiento con el apósito hidrofóbico en el 69% de los pacientes, mientras que en el segundo las heridas crónicas sanaron en un periodo de 6 a 7 semanas.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la capacidad de un apósito hidrofóbico impregnado con cloruro de dialquilcarbamoilo (DACC) para retener microorganismos (*Staphylococcus aureus*) y demostrar que el efecto no favorece la activación de macrófagos como célula inflamatoria clave.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Buscar las condiciones idóneas experimentales con respecto al tiempo, concentración bacteriana y tiempo de incubación para determinar si estas variables a considerar afectan de manera significativa al experimento.
- Identificar si la presentación del producto a trabajar afecta la capacidad de atrapar las bacterias en la metodología experimental a través de la comparativa de los resultados obtenidos de las pruebas con respecto a una gasa de algodón compacto y así poder determinar si tiene el comportamiento esperado.
- Mediante la medición del formazan creado por las células en la prueba de MTT medir la posible citotoxicidad y supervivencia de las células sometidas al contacto de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos bacterianos.
- Mediante la medición de la liberación de TNF- α a través de la prueba de ELISA, como citocina pro inflamatoria clave, identificar si los macrófagos están siendo activados por las toxinas bacterianas.

HIPÓTESIS:

Si el apósito impregnado con cloruro de dialquil carbamoilo tiene la capacidad suficiente de retener bacterias sin causarles ningún daño o lissarlas, entonces deberá limitar la activación *in-vitro* del sistema inmunitario.

HIPÓTESIS ALTERNA:

Si el apósito impregnado con cloruro de dialquil carbamoilo no tiene la capacidad suficiente de retener bacterias sin causarles ningún daño o lissarlas, entonces deberá de notarse la activación *in-vitro* del sistema inmunitario.

Materiales y Métodos

Se planteó un modelo de trabajo mediante el cual se pudiera poner a prueba al apósito comercial (Cutimed Sorbact de BSN Medical) recubierto con DACC, el cual, gracias a su capacidad hidrofóbica es capaz de atrapar a las bacterias sin lisarlas, así mismo cuando este apósito es retirado de la herida, arrastra consigo a todas aquellas bacterias que están unidas a él. Con este antecedente se decidió realizar una serie de pruebas mediante las cuales se colocó al apósito en contacto con una suspensión de bacterias (*S. aureus*) en un medio controlado, de donde la metodología seguida fue la siguiente:

Cultivo bacteriano

Se utilizó una cepa de referencia (ATCC 29213), *S. aureus*, sensible a oxacilina para el cultivo bacteriano. Los microorganismos fueron resembrados en placas nuevas 24 horas antes de su uso y se permitió el crecimiento en agar sangre humana al 5%. Utilizando la cepa sembrada se realizó una suspensión de concentración de 1.5×10^8 UFC medida mediante turbidez en un nefelómetro (Densichek Plus, Biomerieux, Francia) y llegando a la marca de 0.5 en la escala de McFarland. A ésta se le realizaron dos diluciones, la primera tomando un mililitro de la suspensión que se llevó a 10 mL con PBS (1:10) o caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH), dependiendo del grupo a probar, la segunda tomando 2 mL de la primera que fueron llevados a 10 mL con el diluyente correspondiente (1:5); esta última quedó como la suspensión bacteriana para realizar las pruebas.

Preparación de los apósitos

Por medio de un sacabocados de 1.4 cm de diámetro, se realizaron cortes de gasa compacta de algodón, que se esterilizaron en autoclave. Asimismo, pero en condiciones de esterilidad y habiendo esterilizado el sacabocados por inmersión en etanol al 70%, se realizaron cortes del apósito con DACC, simple o con gel acuoso (Cutimed Sorbact 7cm x 9 cm y Cutimed Sorbact gel 7.5cm x 7.5 cm de BSN Medical GmbH, Hamburgo, Alemania) y la gasa estéril con PHMB.

En las figuras 9 y 10 se observan los implementos ocupados para preparar los apósitos de las pruebas.

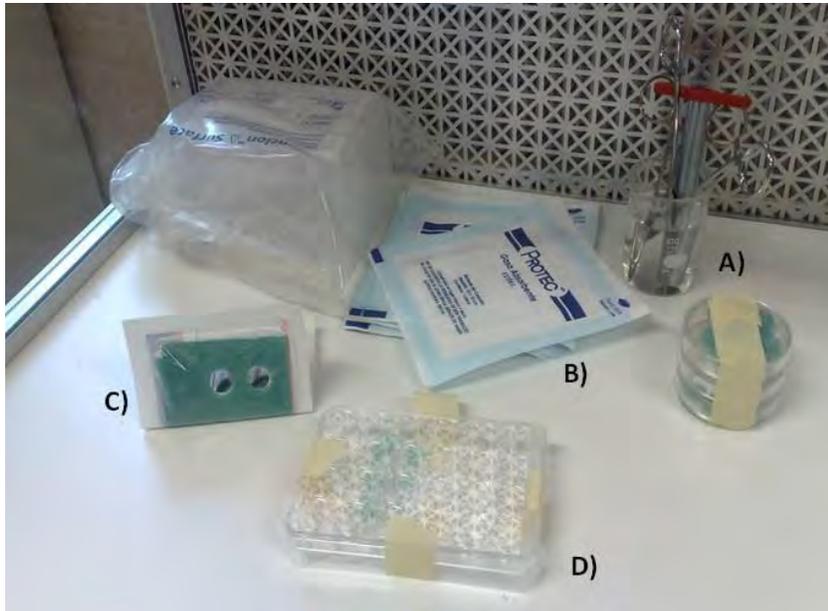


Figura 9. Se muestra el material ocupado en la colocación de los apósitos dentro de la caja de 24 pozos. A: Pinzas y sacabocados ocupados par realizar los cortes, se mantuvieron embebidos en alcohol de 70° para eliminar su contaminación. B: Gasas. C: Apósito con DACC con dos cortes del sacabocados D: Caja de 24 pozos con los apósitos ya colocados.

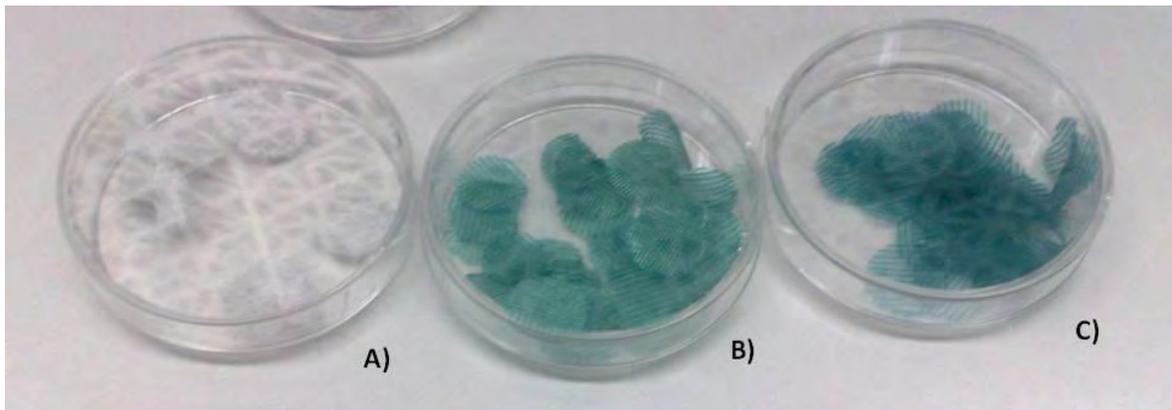


Figura 10. Se muestran los cortes de los apósitos usados en la prueba, A: Gasa de algodón compacto estéril, B: Apósitos cubiertos con DACC. C: Apósitos que además del DACC contienen una cubierta de gel de propilenglicol.

Una vez depositados los apósitos por triplicado, se adicionó la suspensión bacteriana mencionada, suministrando 500 μ l de ella en cada uno de los pozos de una placa de 24 (Corning Incorporated, Estados Unidos) acorde al esquema mostrado en la figura 11:

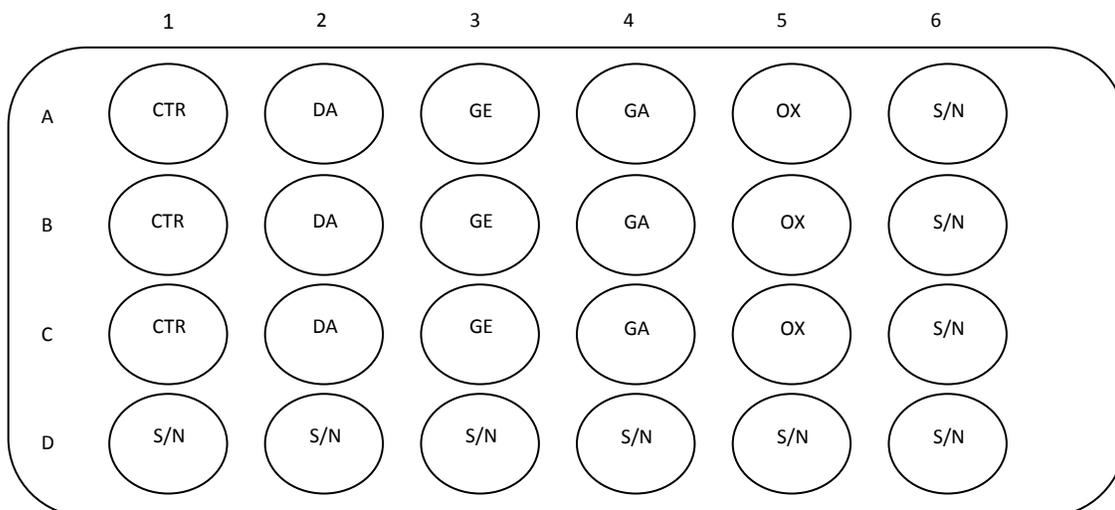


Figura 11: Esquema de colocación de los apósitos y la suspensión de bacterias, el grupo DA es el apósito cubierto con DACC; GE es el grupo que además del DACC tiene una cubierta de gel; GA es la gasa de algodón compacto. También se colocaron dos grupos control, CTR es el grupo control negativo o sin apósito; Ox es el control positivo que contiene oxacilina.

El grupo **Control** únicamente contiene las bacterias en suspensión, el grupo **DACC** contiene el apósito con DACC y la suspensión. El grupo **Gel** contiene el apósito cubierto con DACC y gel acuoso además de la suspensión. El grupo **Gasa** contiene la gasa estéril y la suspensión de bacterias. El grupo **Oxacilina** contiene a la suspensión bacteriana y 10 μL de una solución recién preparada de Oxacilina a una concentración de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo cual lo deja en una concentración final de 100.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que resulta letal para la concentración de bacterias de la prueba.

A partir de este esquema se prepararon dos experimentos, el primero incubando en PBS y el segundo en caldo MH, incubándose en condiciones estáticas para ambos casos a 37°C durante 3 horas, tras las cuales, se retiraron los sobrenadantes y se dividieron en dos porciones de 100 y 250 μL si provenían del cultivo con MH o PBS, respectivamente y el sobrante se filtró a través de una membrana de 0.22 μm para eliminar todas las bacterias que pudieran estar presentes y se congeló inmediatamente a -70°C para su posterior uso en la estimulación de células eucarióticas.

Una vez retirado el sobrenadante del cultivo con PBS, se lavó el apósito 2 veces con 1 mL de PBS estéril colocándolo en un tubo de vidrio con tapa de baquelita y llevándolo a agitación durante 5 segundos, este paso se realizó para eliminar de la malla todas aquellas bacterias que no se hubieran adherido

directamente por el DACC. También se lavó el pozo ocupado, 2 veces con 0.5 mL de PBS para recuperar la mayor cantidad de bacterias posibles que hubieran quedado adheridas a las paredes del pozo. Los lavados resultantes se reunieron con el sobrenadante y se agregaron 750 μ L para aforar la cantidad obtenida a 4 ml (dilución 1:16). De esta suspensión de bacterias se tomaron 100 μ L y se llevaron a 10 ml (1:100). De estos 10 mL se tomaron 100 μ L y se sembraron en placas de agar Soya Trypticaseína (Becton Dickinson Estados Unidos) mediante el método de vaciado en placa para poder contar 24 horas después el número de unidades formadoras de colonias que se generaron en las 3 horas de incubación con el apósito.

Para los cultivos crecidos en caldo MH, se tomaron 100 μ L de la suspensión bacteriana y se llevaron a 9 ml con PBS (1:90) y se reunieron con los lavados del pozo y del apósito (éstos se realizaron de la misma manera que en el caso de los grupos que se incubaron con PBS, adicionando a la dilución anterior 3 mL de lavados). De esta suspensión de 12 mL totales, se tomaron 50 μ L y se llevaron a 10 mL con PBS (1:200) y de esta dilución se tomaron 50 μ L que se colocaron para sembrar en las cajas Petri mediante el método de vaciado en placa.

En ambos casos, cultivos en PBS y MH, se tomaron los apósitos por separado y se lavaron con 1 mL de una solución de Tween 20 al 0.5% con agitación fuerte por 30 segundos. Del grupo cultivado en PBS se tomaron 50 μ L de manera directa y se sembraron nuevamente por vaciado en placa, mientras que para el grupo cultivado en caldo MH el mililitro completo del lavado se mezcló con 9 mL de PBS (dilución 1:10) y de estos se tomaron 50 μ L que se llevaron nuevamente a 10 mL (1:200) para finalmente sembrar 50 μ L mediante vaciado en placa.

Cultivo celular

Para las pruebas de estimulación de la inflamación se utilizó una línea celular de referencia ATCC, que proviene de macrófagos murinos obtenidos de líquido de ascitis de un ratón macho infectado con el virus de leucemia murina de Abelson, línea designada como RAW 264.7. Las células fueron crecidas en DMEM adicionado en un 10% de suero de bovino fetal (SBF) (Gibco, Estados Unidos), L-glutamina 2 mM (Gibco, Estados Unidos) y 1% de mezcla de antibióticos penicilina-estreptomicina (5000 unidades/mL de Penicilina y 5000 μ g/mL de estreptomicina) (Gibco, Estados Unidos); los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ hasta llegar a confluencia.

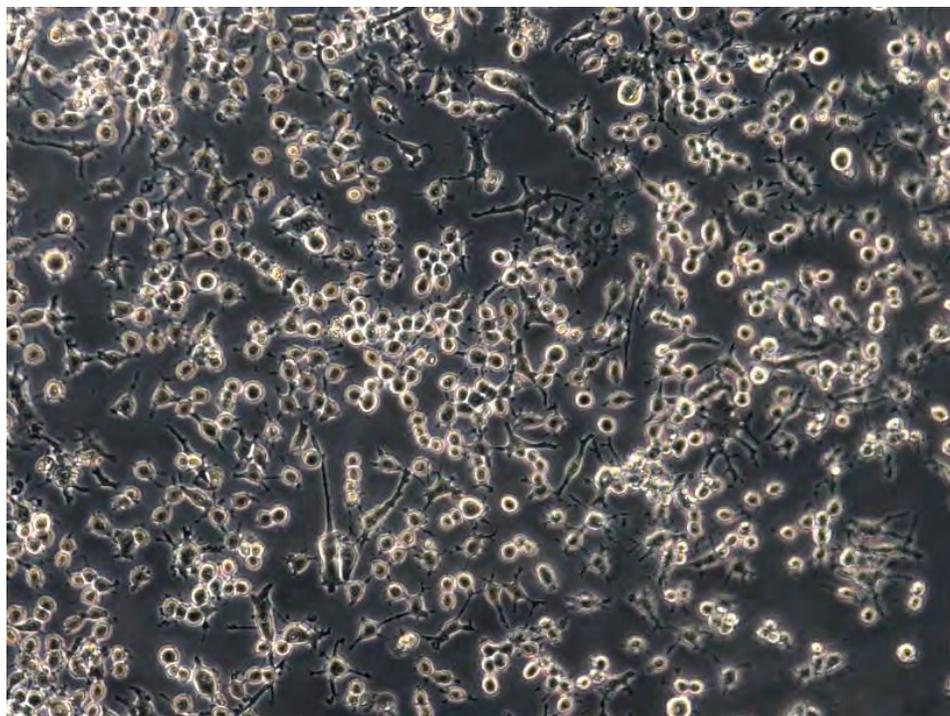


Figura 12: Morfología de los macrófagos en cultivo (línea RAW 264.7)

Evaluación de la actividad mitocondrial de macrófagos tratados con sobrenadantes del cultivo bacteriano, a su vez tratado con el apósito hidrofóbico (reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT).

La mayoría de las aplicaciones de los colorantes de tetrazolio involucran ensayos en microplacas que miden la citotoxicidad y/o la proliferación y donde se asume que la reducción del colorante es proporcional al número viable de células en fase de crecimiento exponencial (ocupando poblaciones homogéneas) (Mosmann T. 1983 y Berridge MV, *et al.* 2005). En 1983 Mosmann desarrolló un ensayo colorimétrico en microplacas con MTT para medir proliferación celular y citotoxicidad (indicadores de actividad Redox en las células), y este simple ensayo y sus modificaciones, son usados actualmente de manera extensa en laboratorios de biología celular alrededor del mundo, donde el MTT es reducido por una gran variedad de compuestos celulares, entre los cuales el más común es el NADH derivado primordialmente de la mitocondria y que se deriva del ciclo del ácido cítrico (Ciclo de Krebs) (Mosmann T. 1983 y Berridge MV, *et al.* 2005). Esta prueba es de gran utilidad ya que al no ocupar radioisótopos es muy segura y simple de evaluar por medio de un lector de placas de ELISA (Mosmann T. 1983).

En este trabajo se sembraron 1×10^5 células (macrófagos murinos RAW 264.7) por pozo en una caja de 24 y se adicionaron 45 μL de los 500 μL filtrados de cada sobrenadante obtenido del cultivo bacteriano, el cual previamente fue descongelado, dejando el cultivo con un aforo de 1 mL en medio (DMEM 10% SBF, 2 mM L-glutamina y 1% antibióticos). A cada sobrenadante se le realizó la prueba por triplicado, así como a sus controles. De ellos, el primero fue un grupo en el cual solamente se colocaron las células para identificar cual sería su comportamiento basal. Y el siguiente fue el de las células tratadas con la proporción correspondiente de PBS o MH sin crecimiento bacteriano, para identificar si estos medios presentaban algún efecto en el metabolismo de las células. Los cultivos eucarióticos se incubaron durante 18 horas a temperatura de 37°C con atmosfera de 5% de CO_2 . Tras este tiempo se recolectó el sobrenadante de cada uno de los pozos y se congeló a -70°C para la cuantificación del TNF- α expresado por los macrófagos estimulados con los medios condicionados del cultivo bacteriano.

Simultáneamente, la monocapa celular se lavó con 500 μL de PBS estéril a temperatura ambiente y teniendo cuidado de no levantar las células existentes en el fondo del pozo. Después de eso se agregaron 0.475 mL de DMEM suplementado y fresco y 25 μL de una solución de MTT a una concentración de 10 mg/mL (concentración final de 0.5 mg/mL) y se incubaron durante 4 horas más en las mismas condiciones (Kim ID y Ha BJ. 2009). Después de ese tiempo se retiró todo el medio por succión y se disolvieron los cristales de formazán con isopropanol /dimetilsulfóxido en una proporción 1:1. Este sobrenadante se evaluó por colorimetría a 595nm en un lector de placas de ELISA (Microplate iReader, Biorad, CA. Estados Unidos) con un filtro de referencia de 655 nm (Kim ID y Ha BJ. 2009) para corregir la absorción intrínseca del plástico de la caja.

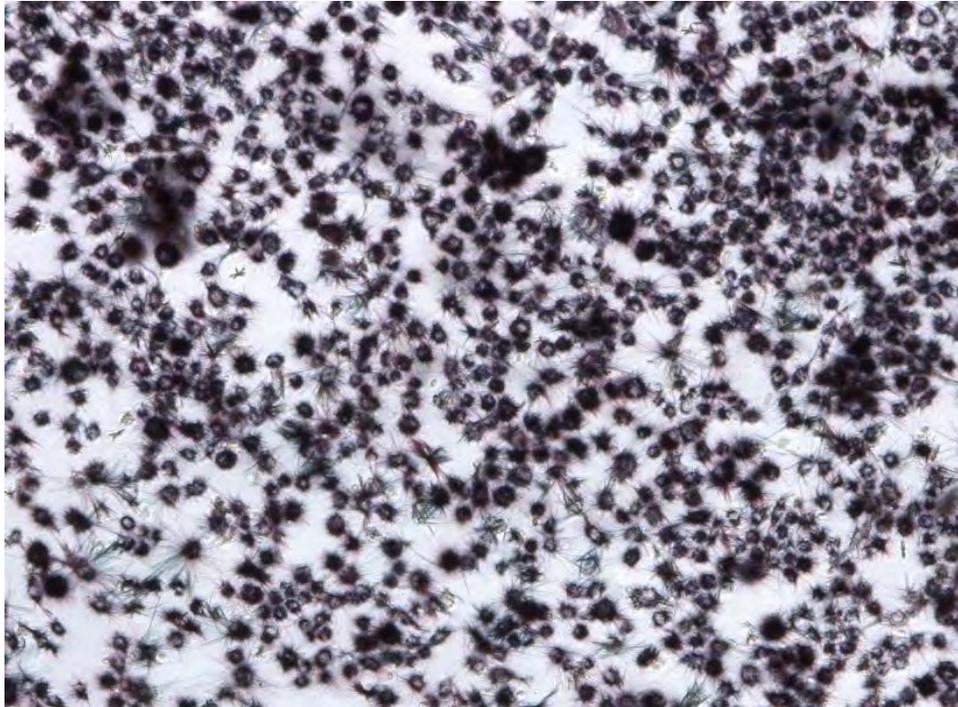


Figura 13: Imagen de los macrófagos tras las 4 horas de incubación con el reactivo de MTT

Análisis de la expresión de $TNF-\alpha$ por medio de un ensayo inmunoenzimático de tipo ELISA.

Los ensayos enzimáticos se han convertido en una de las metodologías más comunes en el diagnóstico clínico y en la investigación científica. El ensayo de inmunoadsorción enzimática (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA por sus siglas en inglés) es la configuración de inmunoen ensayo más ampliamente ocupada y el acrónimo ELISA es usado como un eufemismo para todos los ensayos de este tipo. La prueba consiste en hacer interaccionar a un antígeno (problema) con un anticuerpo o receptor adsorbido en una fase sólida (placa) y evidenciado a través de un segundo anticuerpo que reconoce otra región del antígeno de detección y que se encuentra acoplado a una enzima (sándwich), para finalmente evidenciar la proporción de antígeno por medio de una reacción enzimática lineal (Wild D. 2013).

Debido a que una sola molécula de enzima puede convertir muchas moléculas del sustrato, la señal generada es amplificada de manera importante pero lineal. De manera típica, los “ELISAs” se realizan en placas de poliestireno (Wild D. 2013).

Obtener el mejor desempeño posible de dos entidades biológicas (anticuerpos y enzimas) puede ser demandante en tiempo, pero el esfuerzo se ve reflejado en la capacidad de probar cientos de muestras de

manera rápida y relativamente barata, afortunadamente una gran variedad de anticuerpos se encuentran disponibles comercialmente, y las enzimas de uso común están bien caracterizadas y han sido probadas en innumerables situaciones. La prueba de ELISA es usada para la detección y cuantificación de antígenos, anticuerpos, hormonas y otras moléculas; además de su uso en aplicaciones clínicas, la técnica se utiliza como método exclusivo para muchos propósitos de investigación, tal es el caso de la caracterización de nuevas proteínas y el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas (Wild D. 2013).

El proceso básico de un ELISA involucra la unión al pozo, bloqueo, lavado, generación de señal y lectura de la misma. El ELISA se realiza de manera regular en placas de 96 pozos que unirán de manera pasiva las proteínas; en ELISA los anticuerpos son unidos comúnmente a poliestireno de manera directa, a menos que los antígenos sean unidos directamente para detectar anticuerpos en la muestra. El área residual sin recubrimiento para cada pozo es saturada con una proteína inerte (como la albumina de suero bovino) para prevenir cualquier unión no específica de los agentes involucrados. Después, las muestras son agregadas a cada pozo e incubadas para que el analito (antígeno o anticuerpo de la muestra) se una al recubrimiento de anticuerpos. Lavando los pozos se eliminan los materiales no unidos, permitiendo a la prueba medir de manera específica los analitos dentro de una preparación en crudo. Finalmente la reacción es cuantificada con un anticuerpo ligado a una enzima que, en conjunto al substrato induce un cambio proporcional en una reacción colorida. El atrapamiento del analito entre dos capas de detección (dos anticuerpos) es la razón por la cual se le conoce a este tipo de ensayos como de “Sándwich” (Wild D. 2013).

En la figura siguiente se muestra esquemáticamente los pasos ya descritos

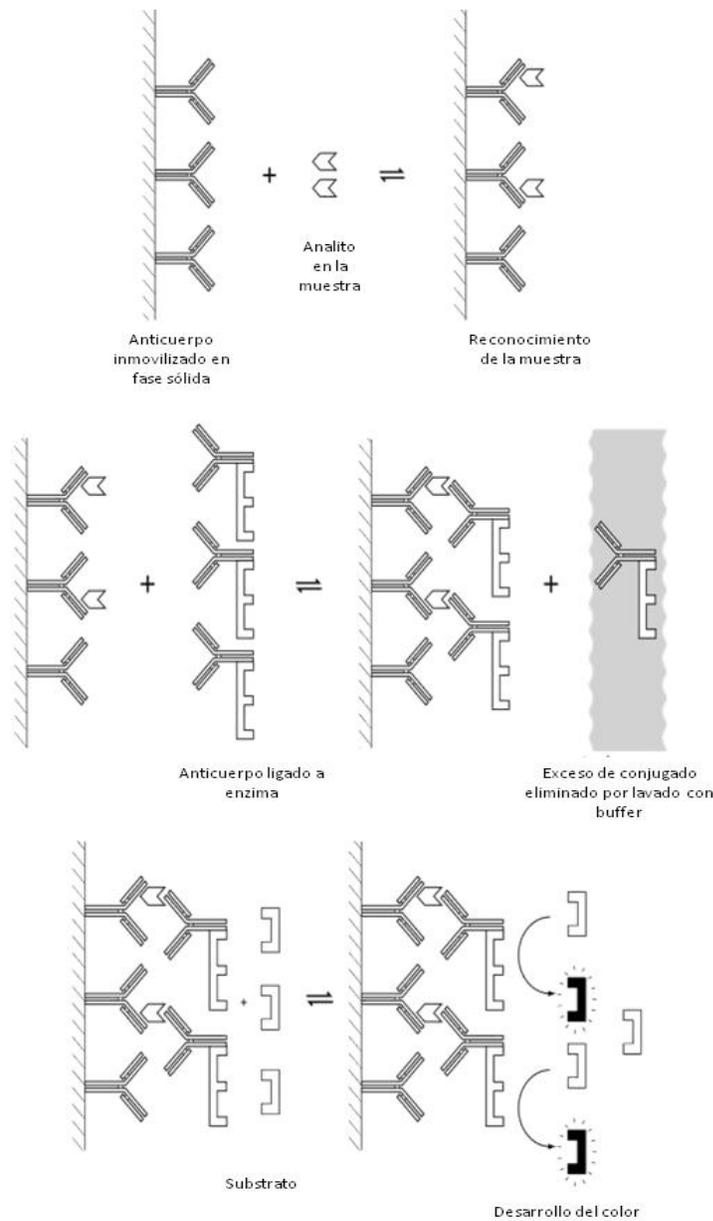
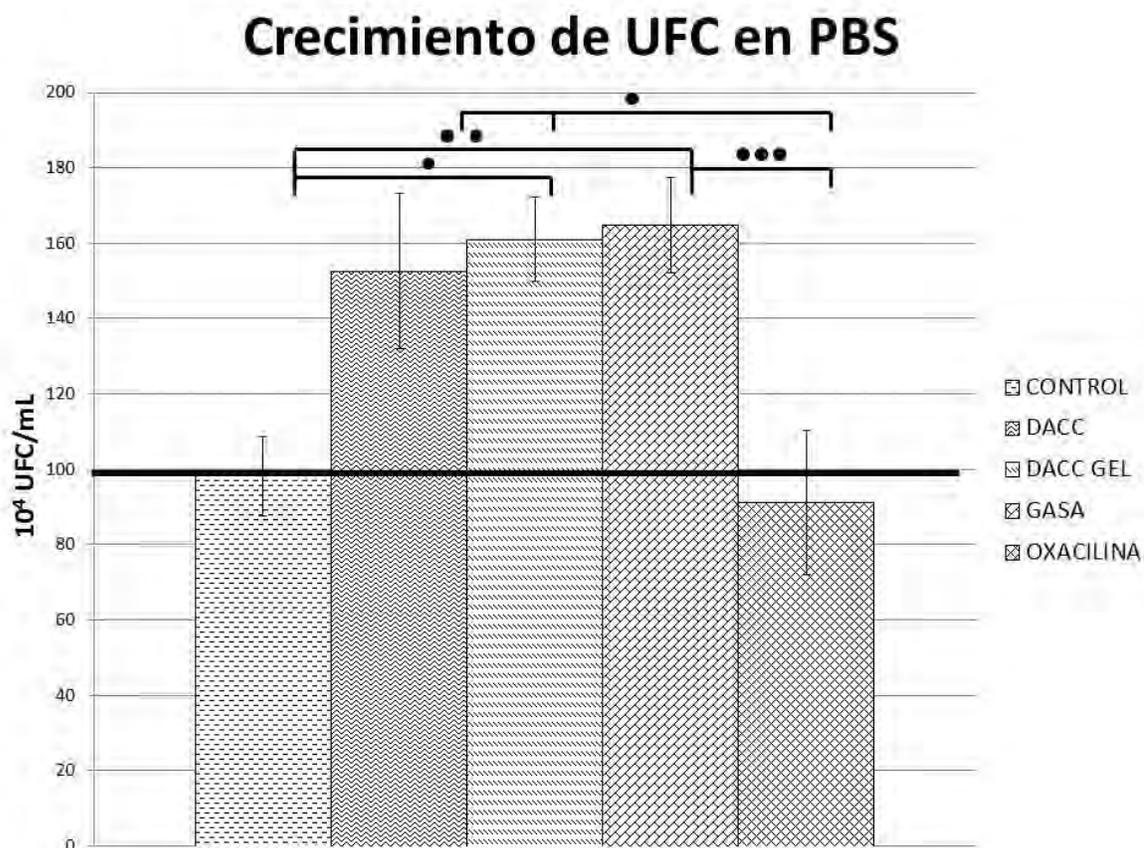


Figura 14: Esquema del desarrollo teórico de una prueba de ELISA, tomado de Wild D.

Para medir el TNF- α , se utilizó un kit comercial (Quantikine Mouse TNF- α de R&D Systems, Estados Unidos), por lo que se siguieron las indicaciones del inserto para realizar las pruebas, considerando solo 25 y no 50 μ L de muestra como decía el instructivo, debido a que se realizaron pruebas de concentración del factor en nuestro sistema antes de llevar a cabo el ensayo final; todos los sobrenadantes obtenidos de los cultivos se probaron por duplicado.

Resultados:

Las siguientes gráficas muestran los resultados finales de las pruebas realizadas, sin embargo, estos provienen de un proceso de estandarización en las cuales se usaron diferentes tiempos y concentraciones bacterianas (datos no mostrados).

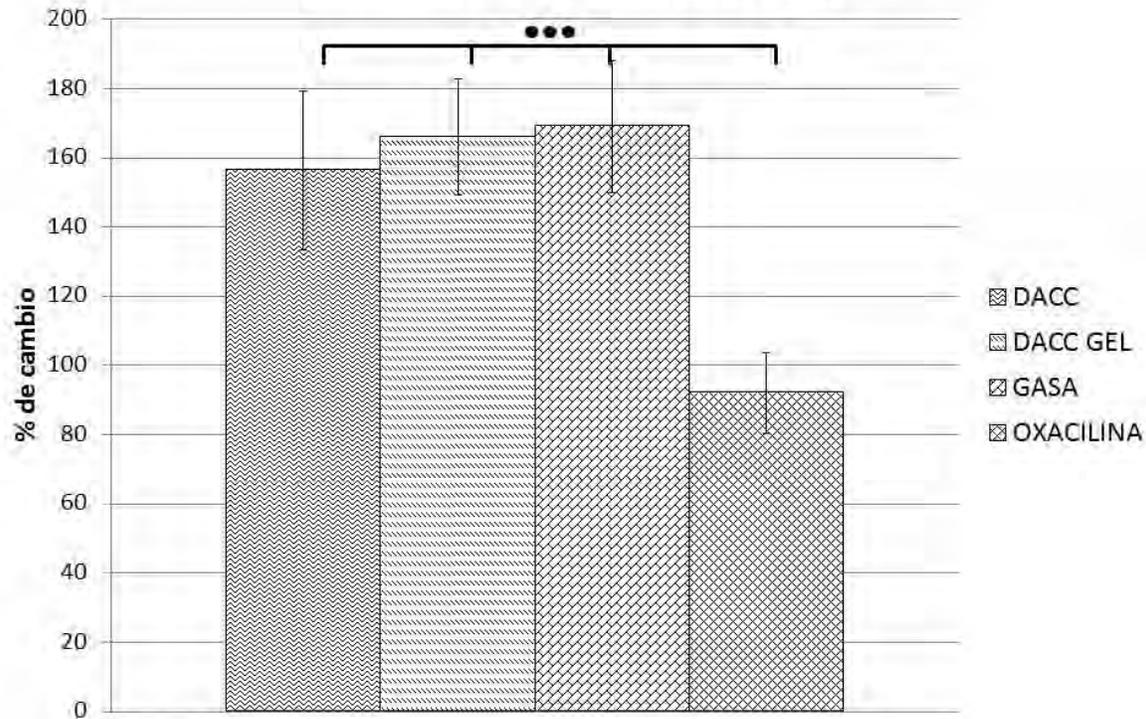


Gráfica 1: Crecimiento bacteriano en los sobrenadantes de cultivo de *S. aureus* incubados con PBS por 3h. La línea continua representa el valor en UFC del inóculo inicial. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). • p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

En esta gráfica podemos observar que los grupos Control y Oxacilina mantienen niveles muy similares al inóculo inicial (1×10^6 UFC/mL de *S. aureus*) marcado con una línea negra que cruza la gráfica, lo cual nos indica que no se propició la muerte de las bacterias (directamente relacionado con el mecanismo de acción del antibiótico empleado) ni su proliferación (debido a que el PBS no le proporcionó a la bacteria ningún nutrimento para lograrlo). Sin embargo, los tres grupos restantes parecen proporcionar a las bacterias

las condiciones propicias para aumentar su replicación, siendo el grupo de la Gasa la que permite la mayor proliferación. Estadísticamente se encontró una diferencia significativa con una $p < 0.01$ precisamente entre los grupos Control y de Gasa, y aún más entre el grupo de Oxacilina y esta última, ya que el valor encontrado fue de $p < 0.001$.

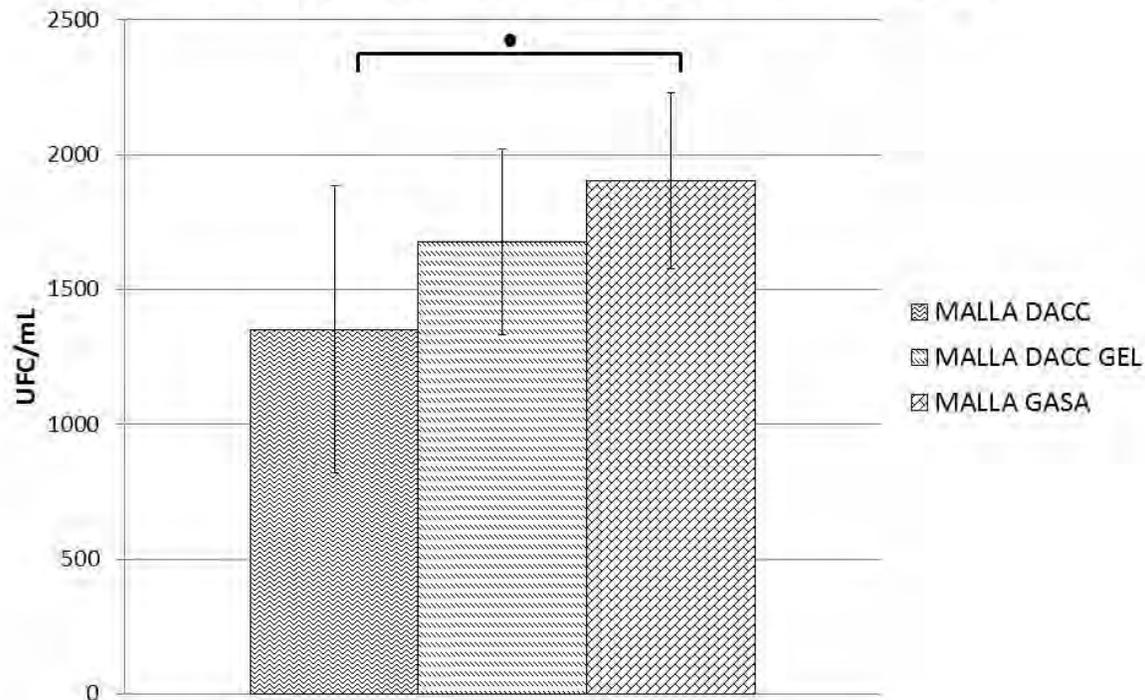
Porcentaje de cambio con respecto al Control de grupos en PBS



Gráfica 2: Porcentaje de cambio tomando el comportamiento del grupo Control como 100% en los grupos incubados 3 horas en PBS Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos ($n=9$). *** $p < 0.001$.

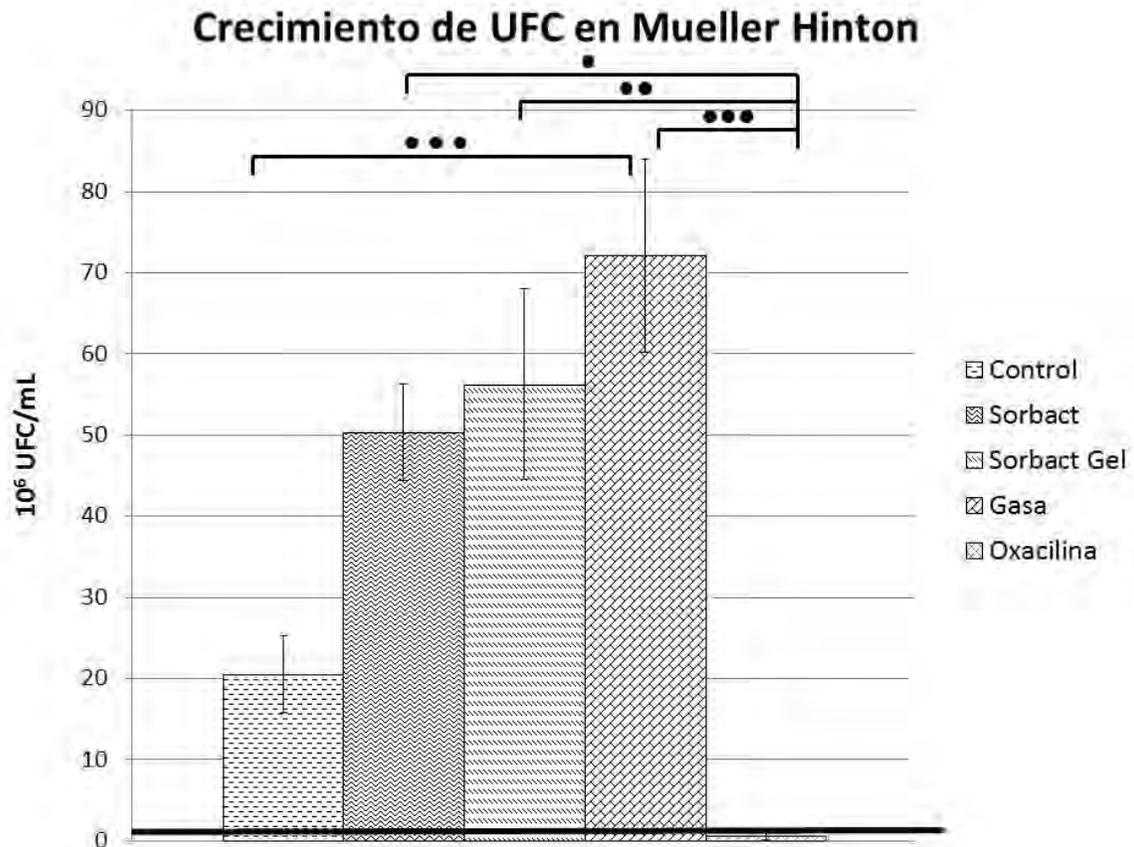
En la gráfica se puede observar el comportamiento si se toma al grupo Control como un valor de cien por ciento (ya que éste proporcionó el comportamiento normal de las bacterias en el medio) y si se compara con el resto de los grupos se puede observar que los otros tres que propician la proliferación bacteriana están muy cercanos entre sí, oscilando entre 50 y 70 puntos porcentuales por arriba del cien proporcionado por el grupo Control. Todos estos tienen diferencia significativa con el grupo de Oxacilina tomando un valor de $p < 0.001$, lo cual nos reafirma lo observado en la gráfica anterior.

Retención de bacterias en las diferentes mallas en grupos de PBS



Gráfica 3: Retención bacteriana en los diferentes apósitos ocupados en la incubación a 3 horas en PBS. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). • $p < 0.05$.

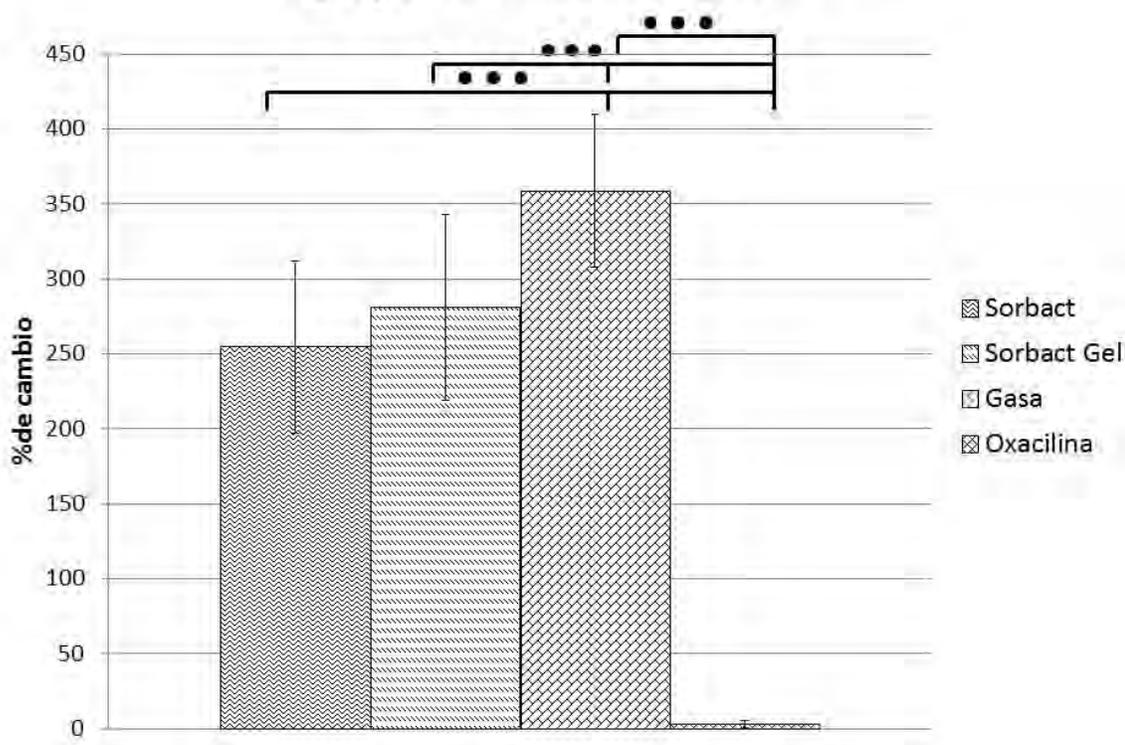
A pesar del recubrimiento hidrofóbico, la malla con DACC es la que retiene la menor cantidad de bacterias, obteniendo valores de alrededor de las 1,400 UFC/mL; es seguida por la malla con DACC y recubrimiento de Gel con un promedio de 1,700 UFC/mL. Finalmente la que más bacterias captura es la Gasa de algodón con valores promedio cercanos a los 1,900 UFC/mL. A pesar de la dispersión en los datos la diferencia entre los grupos de la malla con DACC y la Gasa compacta de algodón es significativa con una $p < 0.05$, con lo cual podemos decir que, además de retener una mayor cantidad de bacterias, el grupo de la malla de algodón también permite una mayor proliferación usando un medio mínimo de supervivencia bacteriana como lo es el PBS.



Gráfica 4: Crecimiento bacteriano en los sobrenadantes de cultivo de *S. aureus* incubados en caldo MH por 3h. La línea continua representa el valor en UFC del inoculo inicial. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). • $p < 0.05$, •• $p < 0.01$, ••• $p < 0.001$.

A las 3 horas de incubación con un medio enriquecido, podemos encontrar una serie de patrones similares a los encontrados con el PBS. El primero es que los tres grupos con mallas (DACC, DACC con Gel y Gasa de algodón) tienen valores muy por encima de lo visto por el grupo Control. El segundo es que nuevamente el grupo de Gasa de algodón fomenta el mayor crecimiento bacteriano, llegando a ser significativamente diferente del grupo control ($p < 0.001$), y del grupo de la malla de DACC con Gel ($p < 0.01$). Sin embargo aquí podemos notar que el grupo sometido a la Oxacilina cae de manera importante en comparativa con los demás grupos, llegando a ser significativo el cambio con respecto a los grupos DACC ($p < 0.05$), DACC con Gel ($p < 0.01$) y Gasa ($p < 0.001$).

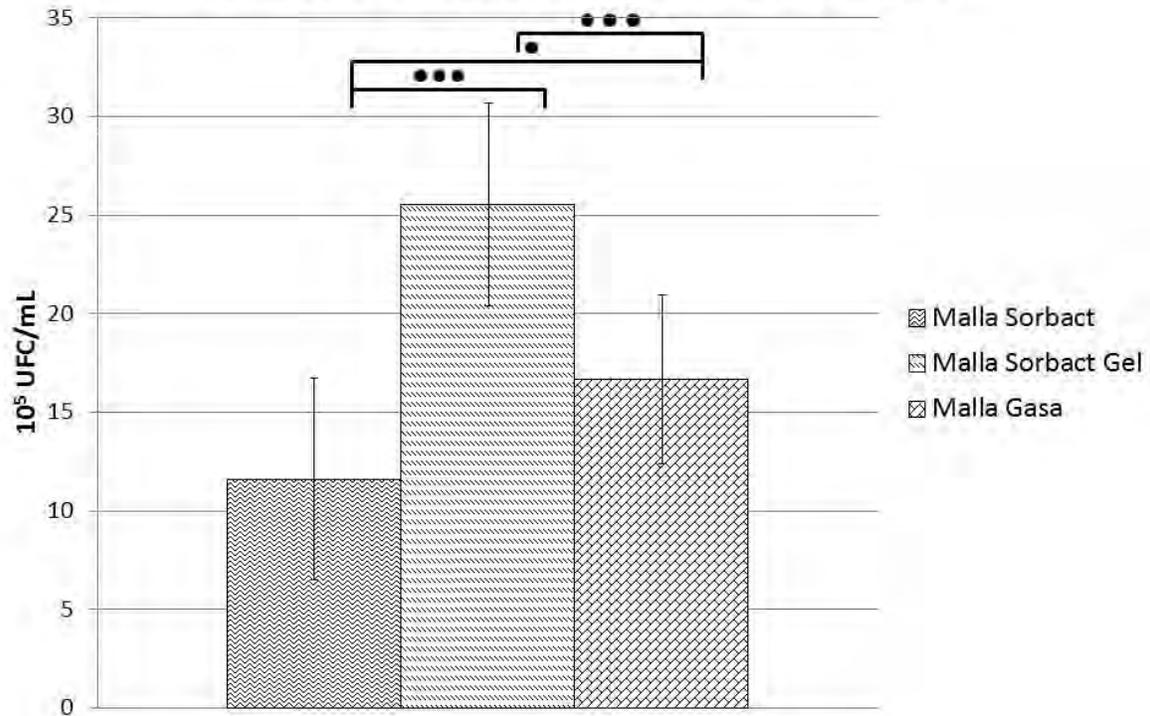
Porcentaje de cambio con respecto al Control de grupos en Mueller Hinton



Gráfica 5: Porcentaje de cambio tomando el comportamiento del grupo Control como 100% en los grupos incubados 3 horas en caldo MH. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). *** p<0.001.

Al observar el valor de los cambios con respecto a el grupo Control (que nuevamente nos muestra el comportamiento normal de las bacterias en el medio de cultivo usado), nos dimos cuenta que las mallas pueden propiciar el crecimiento bacteriano de dos y media o hasta tres y media veces más que el crecimiento normal, mientras que el antibiótico hizo que el grupo cayera hasta el 3% de lo sucedido de manera natural, siendo evidente que hay significancia en las diferencias de los tres grupos con mallas y el grupo de Oxacilina ($p < 0.001$) así como entre el grupo de la Gasa de algodón y el grupo con DACC ($p < 0.001$) ya que entre ellos hay aproximadamente cien puntos porcentuales de diferencia.

Retención de bacterias en las diferentes mallas en grupos de Mueller Hinton

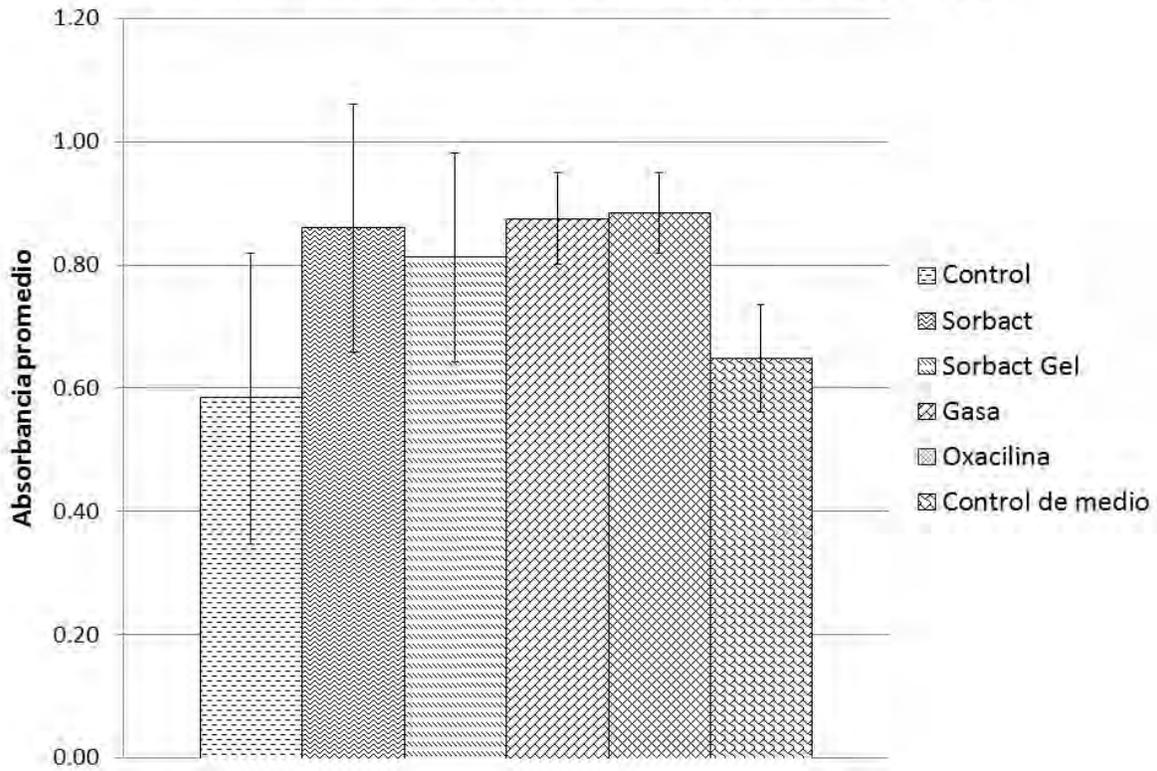


Gráfica 6. Retención bacteriana en los diferentes apósitos ocupados en la incubación a 3 horas en PBS. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). • p<0.05, *** p<0.001.

En este caso nos pudimos dar cuenta de que la cantidad de bacterias capturadas fue mucho mayor que la observada en los grupos incubados en PBS, pero a diferencia de ellos la malla de DACC con Gel presentó el mejor comportamiento, capturando la mayor cantidad de bacterias de las tres, y nuevamente la que menos capturó fue la malla con DACC, teniendo una diferencia significativa entre estos dos (p<0.001), así como entre la malla con DACC con Gel y la Gasa de algodón (p<0.001), y en el caso de la diferencia entre el grupo de la malla de DACC y la malla de la Gasa se encontró también diferencia importante (p<0,05).

Cabe mencionar que no hay un estudio reportado en el cual se indique la cantidad de bacterias que son capaces de retener ninguno de estos materiales, por lo cual esta gráfica y la correspondiente a PBS son resultados completamente novedosos.

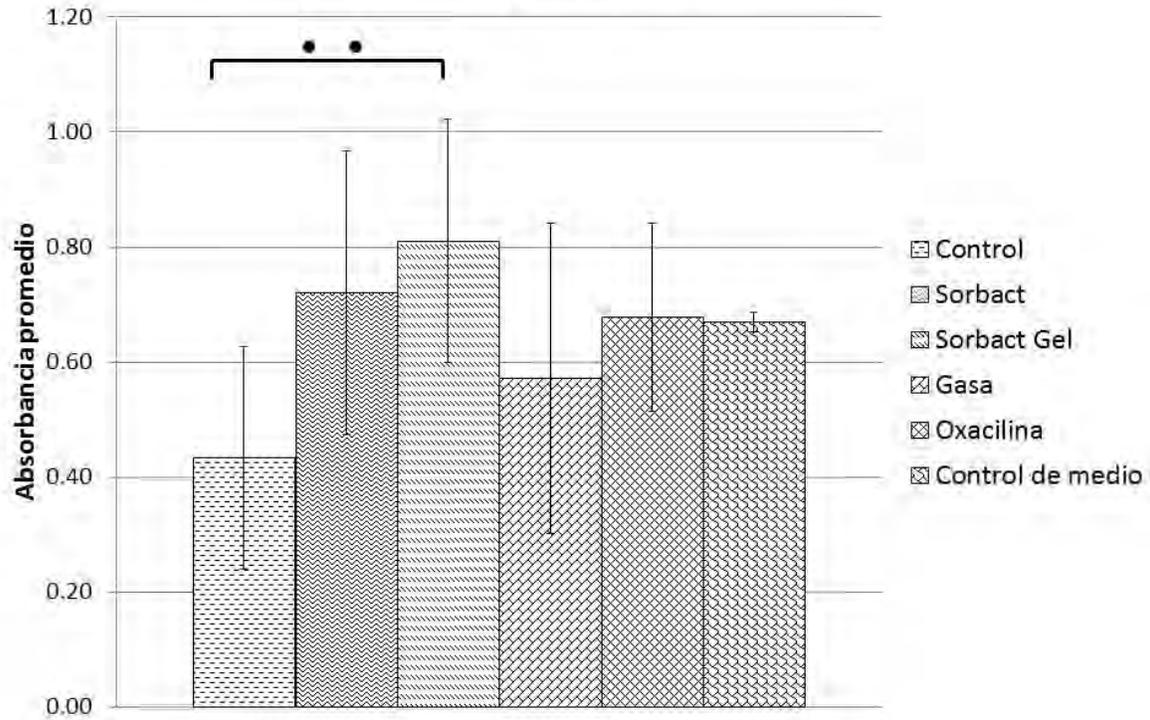
Prueba de MTT para grupos en PBS



Gráfica 7: Prueba de MTT para los macrófagos sometidos a los sobrenadantes filtrados obtenidos del cultivo de *s. aureus* incubados en PBS. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9).

En la prueba para determinar si las células eran estimuladas metabólicamente (a nivel mitocondrial) con los sobrenadantes obtenidos de las bacterias incubadas en el PBS, evidenciaron que a pesar de la ligera elevación de los valores con respecto al Control de medio, el cual se realizó colocando la misma cantidad de células que en los experimentales, pero únicamente se colocó con DMEM fresco, no se encontraron cambios importantes entre los grupos de la prueba.

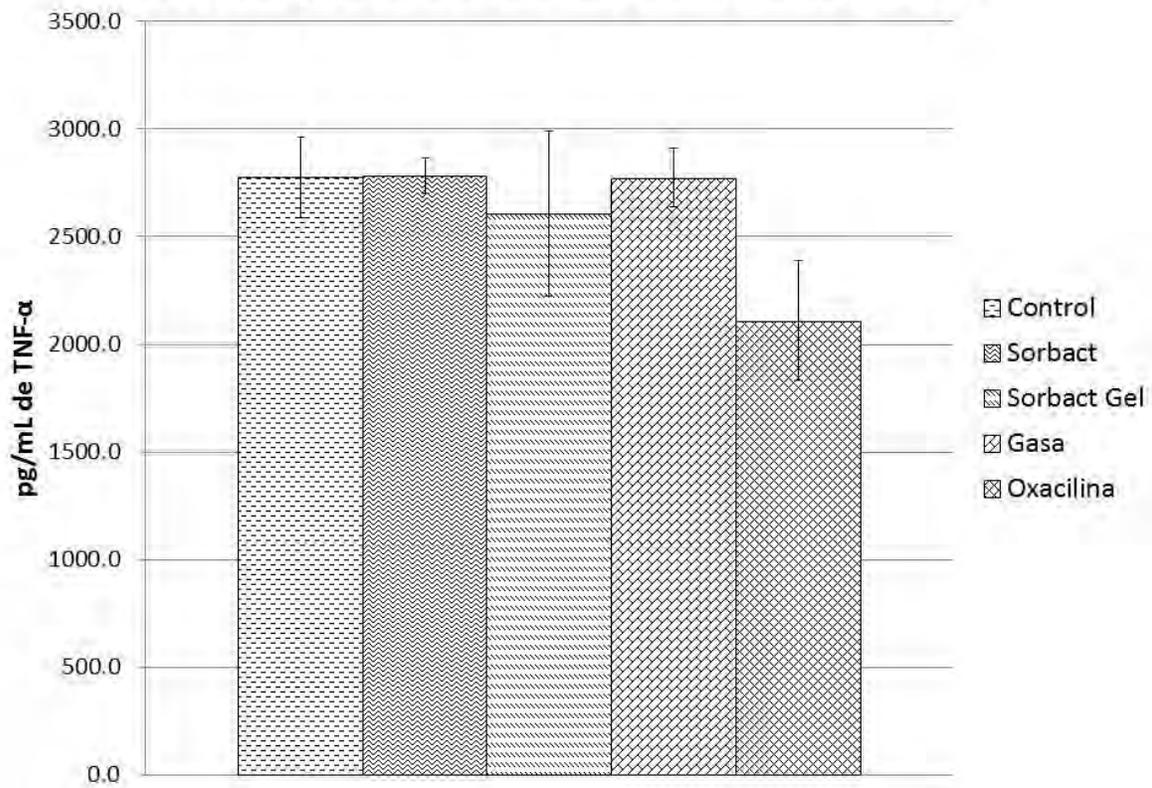
Prueba de MTT para grupos en Mueller Hinton



Gráfica 8: Prueba de MTT para los macrófagos sometidos a los sobrenadantes filtrados obtenidos del cultivo de *s. aureus* incubados en caldo Mueller-Hinton. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). ** p<0.01.

En el caso de los resultados obtenidos de los sobrenadantes del caldo nutritivo, observamos que, con respecto al control de medio, las variaciones siguen sin tener importancia significativa, no obstante la disminución del grupo Control (que también se observó en la prueba de PBS aunque en menor proporción). El único caso estadísticamente diferente fue cuando se comparó al grupo Control contra la malla de DACC con Gel teniendo un valor de $p < 0.01$.

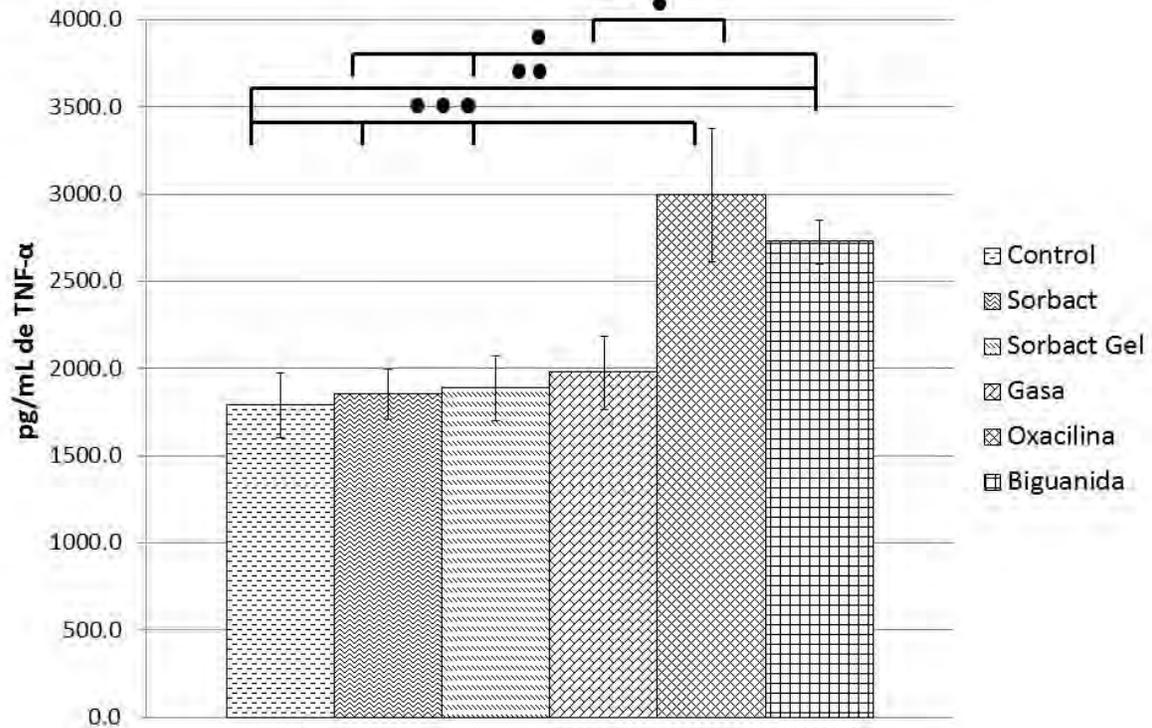
TNF- α presente en las muestras de PBS



Gráfica 9: Concentración de TNF- α secretado por los macrófagos enfrentados a los sobrenadantes filtrados de la incubación a 3 horas de *s. aureus* en PBS. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9).

Tras obtener los sobrenadantes de los macrófagos incubados durante 18 horas y que a su vez fueron estimulados con los respectivos sobrenadantes rescatados de las bacterias, pudimos observar que en el caso de los incubados con PBS no se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento.

TNF- α presente en las muestras de Mueller Hinton



Gráfica 10. Concentración de TNF- α presente en los sobrenadantes obtenidos de los macrófagos tras enfrentarlos con el sobrenadante de PBS Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar; cada experimento se realizó 3 veces y cada uno por triplicado, los datos representados en las barras son el promedio de los 3 experimentos (n=9). • p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Al observar los resultados de la gráfica obtenida de la estimulación con los sobrenadantes proveniente de las bacterias en PBS y comparándolos con los obtenidos en el caldo enriquecido nos dimos cuenta de que los macrófagos disminuyeron la producción de TNF- α con respecto a sus pares en los grupos Control, DACC, DACC con Gel y Gasa. Es decir, en el PBS se encuentran valores más altos que en el MH, sin embargo el grupo de Oxacilina se dispara de manera importante, ya que el mecanismo de acción del antibiótico provoca que se presenten más estímulos para los macrófagos, lo cual se vio reflejado en el resultado. En esta gráfica en especial se encuentra una columna extra la cual nos sirvió como control, es una gasa que está recubierta de PHMB y que esperábamos similitud con la Oxacilina, ya que también tiene efectos bactericidas. Con respecto a los demás grupos, encontramos que, tanto el grupo Control, como el DACC y DACC con Gel presentaron diferencias importantes con respecto a los dos grupos con valores más altos, es

decir, Oxacilina y Biguanida. Sin embargo, el grupo de Gasa ya no presentó diferencia con el grupo de Biguanida, pero sí con Oxacilina ($p < 0.05$).

Discusión:

La presencia innegable de microorganismos en las heridas abiertas es un problema en los centros hospitalarios, y la posibilidad de que estas heridas se vuelvan crónicas implica que pueden contener uno o varios tipos de bacterias, las cuales tienen la tendencia a volverse resistentes a tratamientos convencionales, además de que pueden presentarse en forma de biopelícula (Powell G, 2009), dificultando de manera importante el manejo y cuidado de los pacientes. *S. aureus* es una bacteria que se encuentra de manera frecuente en diferentes tipos de infecciones humanas (Buszewski B y Klodzinska E, 2008). En un estudio retrospectivo en pacientes quemados, realizado en el Instituto de Investigación del Ejército de Estados Unidos en 2012, se reportaron 196 casos de posibles bacteriemias, de las cuales 101 resultaron positivas y de éstas, únicamente 20 se reportaron con bacterias grampositivas, donde 14 tenían presencia de *S. aureus*, (Hogan BK *et al.* 2012).

Parte del problema que hace tan especial a *S. aureus* es la presencia de resistencia a antibióticos de uso común en hospitales, como la metilicina (antibiótico β -lactámico), lo cual ha sido reportado desde 1960 en Inglaterra, generando tiempos prolongados de hospitalización y tratamientos con antibióticos durante periodos largos. Cabe mencionar que esta bacteria se hace cada vez más común en infecciones no hospitalarias (Carvalho KS, *et al.*, 2010). También es importante decir que en 2007 el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos declaró que *S. aureus* es la causa más importante de infecciones serias y fatales en ese país (Spentzas T *et al.*, 2011).

En el presente trabajo, abordamos un estudio *in vitro*, donde se buscaba conocer, no solo la capacidad que presenta un apósito hidrofóbico para retener bacterias, sino la posibilidad de que los metabolitos bacterianos derivados del tratamiento pudieran activar la respuesta inflamatoria resultante del cambio en el microambiente bacteriano. Por estos motivos escogimos como modelo de la tesis a *S. aureus*, ya que como ha quedado claro, es una bacteria que actualmente ofrece problemas importantes en el tratamiento de las heridas.

En 2009 Rosana Y y cols. realizaron un estudio con el objeto de demostrar la capacidad de un apósito hidrofóbico para atrapar bacterias, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En ese trabajo incubaron a los

microorganismos en presencia de PBS y determinaron que el apósito hidrofóbico con DACC exhibía mayor retención bacteriana que la gasa de algodón, no obstante solamente utilizaron un medio mínimo para realizar las pruebas como lo es el PBS. Por otro lado, en nuestro trabajo realizamos las incubaciones bacterianas en PBS, además de un caldo enriquecido (caldo MH) para poder observar el comportamiento de las bacterias de un modo más aproximado a lo que sucede en una herida real. Lo anterior nos permitió tener un panorama más amplio del evento a estudiar, ya que pudimos observar cómo afecta la falta de nutrientes a la adherencia de las bacterias al apósito hidrofóbico, todo ello basado en los trabajos de Mamo W y cols. en 1987 y Ljungh A y Wadstrom T en 1995, donde se demostró que las condiciones de crecimiento sí afectan la cantidad de receptores hidrofóbicos que presentan las bacterias.

Comparativamente hablando en los resultados, en el caso expuesto de Rosana Y y cols. podemos observar que a las 3 horas de incubación se obtuvieron valores más altos de bacterias unidas a las mallas, sin embargo esto lo podemos justificar debido a que en su metodología las incubaciones con la malla se realizaron en un caldo enriquecido y se midió la turbidez que se genera tras 24 horas, con lo cual no se aprecia el número real de bacterias unidas a la malla, si no que se pueden ver las variaciones amplificadas que se presentan de la unión a la malla relativas al tiempo y en cultivos asincrónicos, fenómeno que puede llevar a una detección inadecuada de la cantidad de bacterias. En el trabajo realizado por nosotros obtuvimos una cantidad de bacterias atrapadas por el apósito hidrofóbico considerablemente más pequeña que la reportada en el artículo, incluso con resultados opuesto, pues en el grupo tratado con gasa de algodón la “retención” fue mayor. En la prueba realizada con PBS, apenas encontramos 1.6×10^3 UFC, mientras que en los resultados observados en Mueller-Hinton se alcanzaron 2.5×10^6 UFC. Cabe mencionar que en esta tesis se partió de una concentración menor que en el artículo citado, sin embargo el sesgo que presenta este último es de gran consideración. Además, nosotros incluimos dos grupos de estudio extra, que fueron el apósito hidrofóbico cubierto con un gel acuoso y un control positivo de lisis bacteriana con oxacilina.

Es de resaltar que, a excepción de los apósitos simples con DACC, los demás grupos presentaron valores más altos de retención microbiana que puede deberse a que en el caso de las mallas de algodón la cantidad de bacterias atrapadas por capilaridad fuera mucho mayor mientras que en el caso de los recubiertos con gel, el propilenglicol de su composición pudo brindarle a los microorganismos un entorno más adecuado

para atraparse o embeberse, contrario a lo que nosotros esperamos en un principio, pensando que el mismo gel podría servir como barrera física para evitar la adherencia al DACC y que por efectos químicos seguimos considerando esa hipótesis, ya que si el argumento es la adhesión hidrofóbica, entonces ésta se vería afectada con una interfase acuosa.

El resto de bacterias que no se adhirieron y que se muestran en las graficas 1 y 4, permanecieron en el sobrenadante del cultivo alcanzando mayores cantidades a las del grupo control que no tenía apósito. Esto nos da una idea de por qué es que hay casos clínicos exitosos en los cuales se reportan procedimientos que llevaron más de un mes de tratamiento, como lo reportado por Kammerlander G y cols. en donde en promedio el tratamiento llevó 37 días, pero con variación de respuesta desde los 4 hasta los 134 días de uso continuo (más de 4 meses). También Zemanek M, Duffels W y Boomars S, v.Hallern B y Doerk M-R. reportaron efectos positivos con este tratamiento en pacientes, pero a través de tiempos largos de recuperación, todos por arriba de los 3 meses con el uso del apósito con DACC y con cambios frecuentes del mismo; cabe señalar que en todos estos estudios otras estrategias habían fallado y por ello y a pesar del tiempo de resolución de las lesiones, se consideran efectos positivos con el apósito mencionado, independientemente del tipo de lesión de que se tratara, que también es un factor muy importante a considerar.

Algo de llamar la atención en nuestro estudio es que comparando el número de bacterias en cada sobrenadante con respecto a los grupos controles, nos percatamos que en cada uno de los grupos problema la cuenta bacteriana aumentaba de manera importante y estadísticamente significativa, lo cual nos indica que sin importar el medio donde se encuentren, las mallas parecen darle un entorno más apropiado a las bacterias para replicarse. Nuestro hallazgo difiere de lo expuesto por Ljungh A y cols. en 2006, quienes mencionan que usando bioluminiscencia para detectar el ATP de las bacterias, pudieron determinar la cantidad de *S. aureus* adheridos a una malla, obteniendo 10^6 bacterias en 1 cm^2 a los 120 minutos, y replicándose solamente hasta $10^{6.5}$ en 20 horas, exponiendo, según este estudio, las bacterias se replican de manera muy lenta al adherirse a los apósitos. Sin embargo, Glinel K, y cols. mencionan que las bacterias necesitan adherirse a estratos sólidos para sobrevivir, formando en algunos casos colonias en biopelículas las cuales pueden protegerlos de diferentes agentes externos. Nuestros resultados apuntan a la posibilidad de que las bacterias que se encuentran en suspensión, al agregarse un estrato sólido tienden a replicar de manera más rápida, por lo cual

podría coincidir con lo mencionado por Glinel K y cols., aunque si bien nosotros únicamente evaluamos el comportamiento a las 3 horas y evidentemente la formación de biopelículas aún no podría generarse, sería interesante estudiar si existe la posibilidad de formar biopelículas en los diferentes tipos de mallas ocupadas en este estudio. Es de importancia señalar que en todos los casos se ocuparon mallas estériles y la misma suspensión de bacterias que para los controles, por lo cual descartamos una posible contaminación, de hecho, se realizaron pruebas a la cepa para poder autenticar que sí estábamos trabajando con un *S. aureus* sensible a oxacilina.

En cuanto al comportamiento de células eucariontes quienes pudieran estar estimuladas por productos del metabolismo y/o lisis microbiana bajo las condiciones de prueba, realizamos ensayos de reducción de MTT a macrófagos incubado en presencia de los sobrenadantes del cultivo bacteriano tratado con los diferentes apósitos. A pesar de que se realizó la prueba de MTT para poder determinar si los macrófagos tenían alguna alteración relevante con respecto a su metabolismo, buscando que ésta pudiera ligarse directamente a la activación de los mismos y observando como producto final la secreción de TNF- α como marcador principal de la inflamación, o en su defecto, una disminución de la actividad celular ligada a una posible toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos bacterianos (Mosmann T. 1983 y Berridge MV, *et al.* 2005). Basándonos en nuestros resultados, gráficas 7 y 8, no parece haber ningún efecto, estadísticamente significativo, entre los cultivos de macrófagos sin tratamiento y los tratados con las diferentes estrategias de prueba, tanto en los experimentos con PBS y MH.

No obstante, al analizar la expresión de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos tratados en las condiciones del experimento, las pruebas realizadas con los sobrenadantes provenientes del grupo de PBS no presentaron cambios significativamente importantes, incluso para el grupo de Oxacilina, que esperaríamos se encontrará muy por arriba de todos los demás, ya que al ser un antibiótico β -lactámico (Carvalho KS, *et al.* 2010) afecta la síntesis de la pared bacteriana, lo que deja vulnerable al microorganismo y éste muere. Sin embargo para que esto ocurra, la bacteria se debe de replicar y este proceso se ve interrumpido por la falta de nutrimentos al incubarse en PBS, como se identifica en la gráfica 1 donde se aprecia que el grupo de oxacilina es similar al control, no obstante que el aumento en el número de bacterias de los demás grupos no refleja un aumento en la expresión de TNF- α estimulado en los macrófagos, lo que

quiere decir que aunque existen más microorganismos aún en presencia de los diferentes apósitos, éstos no son lisados, al menos *in vitro*. Mamo W y cols. así como Ljungh A y Wadström T, establecieron que la hidrofobicidad se ve afectada por el medio en el cual la bacteria se replica, sin embargo, esta capacidad forma parte de un grupo de factores de virulencia (Vila J *et al.*, 2008 y Ljungh A *et al.*, 2006) por lo que podemos mencionar que, al menos en este estudio, pudimos observar que la falta de nutrimentos en el medio (en el caso del PBS) logró hacer que las bacterias liberaran más factores capaces de estimular más la expresión del TNF- α que las que se encontraban en un medio enriquecido, como lo es el MH.

Sin embargo, si nos referimos a la gráfica del grupo que se mantuvo en el caldo MH, podemos observar cambios significativos. Al observar la gráfica 10, encontramos que en este caso el grupo de Oxacilina tuvo un aumento importante en comparación con los demás, esto debido a que el antibiótico sí surte el efecto esperado y las bacterias al ser lisadas *in vitro*, liberan una serie de sustancias al medio como lo son ácidos nucleicos, los cuales pueden activar a los macrófagos al mismo nivel que los lipopolisacáridos de la pared bacteriana (Zhu FG, Pisetsky DS. 2001), también se liberan al medio fragmentos del peptidoglicano y algunos factores de virulencia que puede presentar la bacteria, como las α -toxinas, γ -toxinas, la leucocidina Panton-Valentine, modulinas solubles en fenol, δ -toxina y en algunos casos pudiera incluso encontrarse súper antígenos como el TSST-1 (Spentzas T, *et al.* 2011). Caso similar, pero que logra una menor activación es el que encontramos con los apósitos que usan el PHMB, el cual afecta directamente a la pared celular y provoca la liberación del contenido mencionado (Moore K y Gray D. 2008). Los metabolitos bacterianos son reconocidos por los receptores de membrana de los macrófagos como los de tipo *scavenger*, los cuales son capaces de reconocer el ácido lipoteicoico de las bacterias grampositivas (Peiser L, *et al.* 2002) o los TLR 1 y 2, los cuales reconocen, además del ácido lipoteicoico al peptidoglicano de la pared bacteriana (Moser M y Leo O. 2010) por lo que se desencadena la activación de la célula y la liberación de TNF- α en mayor proporción que los grupos en los cuales no se les causó daño a las bacterias. Un ejemplo de ello, y era de esperarse, el grupo Control presentó la menor de todas las expresiones de la citocina, seguido por el grupo DACC y después por el grupo DACC con Gel. El hecho de que entre estos grupos no se presentara diferencia significativa quiere decir que no se le está causando un daño a la bacteria y que ésta no liberó al medio los factores ya mencionados, por lo cual la respuesta de los macrófagos se vio disminuida de manera importante.

Al analizar la metodología de la forma en que lo realizamos en esta tesis, se procuró eliminar la estimulación indirecta por parte de factores como el mismo apósito o el antibiótico (no encontramos información relacionada con esta posible alteración, ya fuera con los apósitos que contienen DACC o con algodón). También podemos asegurar que la activación de las células eucarióticas fue debido a estímulos liberados por las bacterias, y no por la presencia de las mismas, ya que al separarlas de los sobrenadantes obtenidos mediante filtración nos aseguramos de ello.

Con este resultado demostramos que, si bien la terapéutica propuesta con los apósitos mencionados puede ser larga en algunos casos, se evita la sobre activación de los macrófagos, lo cual, a la larga, puede llevar a una mejora en la cicatrización de la herida ya que, como menciona Lucas T y cols. En su estudio de 2010, el restringir a los macrófagos a las etapas más tempranas de la inflamación reduce la formación de tejido de granulación vascularizado, la alteración de la epitelización y resulta en la formación mínima de cicatriz, sin embargo, el médico que pueda ocupar esta terapéutica, debe de ser capaz de valorar el factor costo-beneficio que conlleva el uso de este tipo de apósitos, los cuales, si bien presentan una serie de beneficios al paciente, no son de fácil acceso para todas las instituciones de salud.

CONCLUSIONES

No se encontraron grandes diferencias en la presentación de los apósitos que contienen el DACC. Sin embargo, el principal cambio se da entre la gasa de algodón y el recubierto por DACC, en donde la estimulación del crecimiento bacteriano en la gasa permite que las bacterias se reproduzcan de manera mucho más elevada que los apósitos con DACC.

Las pruebas de MTT realizadas a los macrófagos no nos permitieron hacer la comparativa con los resultados de la prueba de TNF- α , sin embargo si nos deja observar que estas se encontraban vivas y estables a pesar del estímulo de los sobrenadantes. Mientras que, los resultados obtenidos con la prueba de ELISA para TNF- α , nos arrojan una clara disminución de la lectura comparando los grupos de control positivos contra los apósitos impregnados con DACC.

Este trabajo demuestra que si bien la capacidad de los apósitos con DACC para adherir bacterias no es tan grande como uno podría esperar, si presenta un beneficio a la terapéutica de los pacientes con heridas, sobre todo, aquellas cuyos problemas de cronicidad o las que se encuentran contaminadas con bacterias resistentes a diferentes tratamientos, además, se comprueba que hay una disminución en la estimulación de los macrófagos en un sistema *in vitro*, por lo cual se limita la activación del sistema inmunitario, situación que puede llevar a una cicatrización más adecuada.

Referencias:

1. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. Cellular and Molecular Immunology. Estados Unidos. Elsevier Saunders. 7ma edición. 2012.
2. Aburto TI, Morgado AP; Manejo y tratamiento de heridas y úlceras. Toma de cultivos, curación y arrastre mecánico; Ministerio de Salud de Chile; 2000; Santiago, Chile.
3. Anaya JM. Descripción molecular del TNF- α . Reumatología. 2003; 19 (2): 112-20.
4. Berridge M V, Herst P M, Tan A S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005; 11: 127-52.
5. Buszewski B, Klodzinska E. Determination of pathogenic bacteria by CZE with surface-modified capillaries. Electrophoresis. 2008; 29(20):4177-84.
6. Cartan K, Webb L. Managing contaminated and infected wounds [Panfleto]. Reino Unido: BSN Medical.
7. Carvalho K S, Mamizuka E M, Filho P G. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. Braz J Infect Dis. 2010;14 (1):71-6.
8. Claesson M, Bulgakow B, Blomqvist P, Andersson K. A promising alternative in the treatment of dermal fungal infections [Panfleto]. Suecia: BSN Medical.
9. Doerk M-R. Postoperative treatment of diabetic foot gangrene [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
10. Duffels W, Boomars S. Postoperative wound after rectal surgery [Panfleto]. Holanda: BSN Medical; 2009.
11. Esteva E. El tratamiento de las heridas, tipos de apósitos y antisépticos. Offarm. 2006;25 (8): 54-60.
12. García-Alonso I. Traumatismos mecánicos abiertos [Internet] [citado el 11 de noviembre del 2013]. Disponible en: <http://www.oc.lm.ehu.es/Fundamentos/patologia/Apoyo/cap%206%20Heridas.pdf>.

13. Glinel K, Thebault P, Humblot V, Pradier C M, Jouenne T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater.* 2012; 8 (5): 1670-84.
14. Hampton S. An evaluation of the efficacy of Cutimed Sorbact in different types of non-healing wounds. *Wounds.* 2007; 3(4):1-6.
15. Hogan B K, Wolf S E, Hospenthal D R, D'Avignon L C, Chung K K, Yun H C, Mann E A, Murray C K. Correlation of American Burn Association sepsis criteria with the presence of bacteremia in burned patients admitted to the intensive care unit. *J Burn Care Res.* 2012; 33 (3): 371-8.
16. Kammerlander G, Locherer E, Süss-Burghart A, vHallern B, Wipplinger P. Non-medicated wound dressing as an antimicrobial alternative in wound management [Panfleto]. Austria: BSN Medical.
17. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(4):390-9; quiz 400-1.
18. Kim I D, Ha B J. Paeoniflorin protects RAW 264.7 macrophages from LPS-induced cytotoxicity and genotoxicity. *Toxicol in Vitro.* 2009; 23: 1014–9.
19. Lang F. Infected decubitus ulcer over the greater trochanter [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
20. Ljungh A, Wadström T. A new antibacterial wound dressing without a chemically active agent for the care of infected wounds. *Medizin & Praxis Spezial.* 2005.
21. Ljungh A, Wandtröm T. Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobicity of Staphylococci and other wound infection pathogens. *Microbiol Immunol.* 1995; 39(10): 753-7.
22. Ljungh A, Yanagisawa N, Wadström T. Using the principle of hydrophobic interaction to bind and remove wound bacteria. *J Wound Care.* 2006;15(4):175-80.

23. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol.* 2010; 184 (7):3964-77.
24. Mamo W, Rozgonyi F, Brown A, *et al.* Cell surface hydrophobicity and charge of *Staphylococcus aureus* coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis, *J Appl Bacteriol.* 1987; 62(3):241-9.
25. Mijnendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S, Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals.* 2013; 26: 609–21.
26. Moore K, Gray D. Uso del agente antimicrobiano PHMB para prevenir la infección en heridas. *Gerokomos.* 2008;19(3):145-52.
27. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine.* 2010; 28 Suppl 3:C2-13.
28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 16: 55–63.
29. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14 (1): 123-8.
30. Powell G. Evaluating Cutimed Sorbact: using a case study approach. *BJN.* 2009;18(5):30-6.
31. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng.* 2007; 14(1):105-17.
32. Probst A. Chronic arterial leg ulcer with MRSA [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
33. Rashmi Thakur, Priya Batheja, Diksha Kaushik and Bozena Michniak. Structural and Biochemical Changes in Aging Skin and Their Impact on Skin Permeability Barrier. En: Nava Dayan editor. *Skin Aging Handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development.* Estados Unidos. William Andrew Inc. 2008.
34. Real Academia Española [Internet], 2013 [Citado el 21 de octubre del 2013]. Disponible en: <http://lema.rae.es/drae/?d=drae&val=infectar&x=-1189&y=-256>.

35. Rosana Y, Dewi BE, Tjampakasari CR. Microbiology aspect of wound infection: *in vitro* test for efficacy of hydrophobic dressing in microorganism binding. *Med J Indones.* 2009;18(3); 155-60.
36. Sansonetti PJ, Di Santo JP. Debugging how bacteria manipulate the immune response. *Immunity.*2007; 26(2): 149-61.
37. Salem ZCh, Pérez PJ, Henning LE, *et al.* Heridas. Conceptos generales. *Cuad. Cir.* 2000;14: 90-99.
38. Spentzas T, Shapley RK, Aguirre CA, Meals E, Lazar L, Rayburn MS, Walker BS, English BK. Ketamine inhibits tumor necrosis factor secretion by RAW264.7 murine macrophages stimulated with antibiotic-exposed strains of community-associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Immunol.*2011; 25;12:11. doi: 10.1186/1471-2172-12-11.
39. Vega GB. Antigenos e inmunogenos. *Rev Fac Med UNAM.* 2000; 52(1):41-2.
40. Vega GB. Fagocitosis. *Rev Fac Med UNAM.* 2008; 51(6): 261-3.
41. Vega GB. Inmunidad natural o innata. *Rev Fac Med UNAM.* 2008; 51(4): 171-3.
42. Veses Donet C. Apósitos estériles modernos en el tratamiento de heridas crónicas. (Trabajo fin de máster) Valencia, España: Universitat de València 2011.
43. vHallern B, Doerk M-R, vdWeth A. Removal of wound bacteria from infected and colonized wounds with Cuisorb Sorbact. *Medizin &Praxis Spezial.* 2004.
44. vHallern B, Doerk M-R, vdWeth A. Cutisorb Sorbact – Nonpharmacologic antibacterial therapy in traumatology and surgery. *Praxis aktuell.* 2004;13-20.
45. vHallern B. Phlegmons of the lower extremity in AOD with gangrene [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
46. vHalern M-R. Preventing infection in superficial traumatic wounds [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.

47. vHallern B. Chronic venous insufficiency and venous leg ulcers [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
48. Villa J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(1): 48-55.
49. Wild D. The immune assay handbook, Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4ta ed. Oxford, Reino Unido: Elsevier; 2013.
50. Zemanek M. Arterial leg ulcer [Panfleto]. Alemania: BSN Medical; 2008.
51. Zhu FG, Pisetsky DS. Role of the heat shock protein 90 in immune response stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Infect Immun*. 2001;69 (9):5546-52.