

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



EVALUACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA PRESENTE EN BIOPSIAS DE
HERIDAS DE PIEL DE RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON
TERAPIA MITOCONDRIAL

PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO/A EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR/A:

CARLA MIREYA PUPIALES CUPICHAMBA
INTI YUYARI YAMBERLA TAMBACO

DIRECTOR:

Blgo. PEDRO BARBA. MSc.

Ibarra – Ecuador

2022

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERIA EN

BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA PRESENTE EN BIOPSIAS DE
HERIDAS DE PIEL DE RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON TERAPIA
MITOCONDRIAL”

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como
requisito parcial para obtener Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

Blgo. PEDRO BARBA MSc.

DIRECTOR


FIRMA

Ing. ANDREA CHILQUINGA MSc.

MIEMBRO TRIBUNAL


FIRMA

Ing. TANIA SULCA PhD.

MIEMBRO TRIBUNAL


FIRMA



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN
A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1004367742		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Pupiales Cupichamba Carla Mireya		
DIRECCIÓN:	Ibarra, La Esperanza, calle Galo Plaza Lasso		
EMAIL:	cmpupialesc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0968484436

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1003860739		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Yamberla Tambaco Inti Yuyari		
DIRECCIÓN:	Otavalo, Barrio Monserrath, calle 8 de septiembre		
EMAIL:	iyyamberlat@utn.edu.ec		
ELÉFONO FIJO:		TELÉFONO MÓVIL:	0981628364

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EVALUACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA PRESENTE EN BIOPSIAS DE HERIDAS DE PIEL DE RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON TERAPIA MITOCONDRIAL
AUTOR (ES):	Carla Mireya Pupiales Cupichamba Inti Yuyari Yamberla Tambaco
FECHA: DD/MM/AAAA	14/10/2022
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	Blgo. Pedro Barba MSc.

2. CONSTANCIAS

2. El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 14 días del mes de octubre del 2022

EL AUTOR



.....
Carla Mireya Pupiales Cupichamba

C.I.: 1004367742



.....
Inti Yuyari Yamberla Tambaco

C.I.: 1003860739

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darnos la fortaleza para jamás rendirnos, por llenarnos de sabiduría para enfrentar cada obstáculo y enseñarme a crecer como ser humano.

A nuestros padres, por ser nuestro motor, apoyo y guía pese a las adversidades; quienes con su amor, confianza y paciencia no dejaron que nos rindamos hasta culminar esta etapa.

A nuestros compañeros de carrera Erick S., Sebastián A., Ismael G. y Adrian A. por su amistad sincera y animarnos en cada momento difícil de la vida universitaria.

A nuestro director, MSc. Pedro Barba, que gracias a todos sus conocimientos pudo guiarnos en la realización de esta investigación y apoyarnos en nuestro desarrollo como profesionales. A nuestros asesores MSc. Andrea Chilibinga, PhD. Tania Sulca, PhD. Nubia Grijalva y MSc. Gabriel Chimbo, por su ayuda con la redacción, y guía en el desarrollo y culminación de esta investigación.

Gracias Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (CEDIA) por financiar el proyecto de investigación y seguir impulsando la producción de ciencia en el país, al equipo de trabajo conformado por la Universidad San Francisco de Quito y la Universidad Politécnica Salesiana por la colaboración y apoyo durante el desarrollo de la investigación.

A todo el personal de los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Biotecnología Aplicada, quienes brindaron su atención y apoyo para poder desarrollar nuestras actividades de investigación en sus instalaciones.

A la gloriosa Universidad Técnica del Norte y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología, a todos y cada uno de mis profesores, quienes durante nuestra trayectoria estudiantil nos brindaron su apoyo y comprensión para cumplir con este gran objetivo propuesto.

Carla Mireya Pupiales Cupichamba

Inti Yuyari Yamberla Tambaco

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a mi hija Scarlett Abigail G., mi orgullo más grande, por ser el impulso y motivación para ser mejor cada día, enseñándome que las limitaciones solo se encuentran en la mente, además de su comprensión y cariño para que pueda desenvolverme como de madre y estudiante, sabiendo que este logro es de los dos y que es el motor de esta y futuras investigaciones.

A mis padres Carlos Pupiales y Rosa Cupichamba que me han inculcado excelentes valores para ser una mujer sabia que pueda superar las adversidades con fortaleza, paciencia y sobre todo con humildad. Enseñándome que nunca se debe perder la fe, esperanza y confianza.

A mis hermanos, Valeria, Israel, Santiago y David, quienes me han apoyado incondicionalmente y con sus ingeniosidades llenan de alegría mis días.

A mi amiga Mallury P., quien me ha brindado su amistad incondicional y cariño, con el cual me ha animado y motivado para cumplir con mis sueños.

A mi familia, que con su cariño infinito y su apoyo incondicional en cada momento que lo he necesitado.

Muchas gracias a todos mis seres queridos que han contribuido para el cumplimiento de esta meta.

Carla Mireya Pupiales Cupichamba

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a mis padres Luis Yamberla y María Tambaco quienes me inculcaron todos los valores que una persona correcta debe poseer. Por guiarme por el camino correcto durante toda mi vida, donde a pesar de todas las dificultades me enseñaron a nunca darme por vencido y ser perseverante hasta alcanzar mis metas y sueños.

A mi hermana Sisa Yamberla, que ha sido mi confidente y acompañante en los momentos difíciles, y en los momentos felices que con su carisma alegraba aún más.

A mis hermanos Amaru Yamberla y Arawik Yamberla, quienes llegaron a alegrar mi vida con sus ocurrencias, con sus travesuras y con su sola presencia que me enseñó a procurar el bien de los demás ante el bien propio.

A toda mi familia, por ser siempre unida y por las enseñanzas que cada uno me ha dejado las cuales recordaré por siempre.

Agradecimientos eternos a todos quienes estuvieron presentes en este largo camino de vida estudiantil.

Inti Yuyari Yamberla Tambaco

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	6
DEDICATORIA	7
DEDICATORIA	8
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE ANEXOS	14
CAPÍTULO I	17
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 Antecedentes.....	17
1.2 Planteamiento del problema.....	18
1.3 Justificación	19
1.4 Pregunta directriz.....	20
1.5 Objetivos.....	20
1.5.1 Objetivo general.	20
1.5.2 Objetivos específicos.....	21
1.6 Hipótesis	21
CAPÍTULO II	
2 MARCO TEÓRICO	22
2.1 Microbiota de la piel	22
2.2 Tipos de microorganismos de la piel	23
2.2.1 Organismos procariotas	24
2.2.2 Organismos eucariotas.....	25
2.3 Heridas	25
2.3.1 Tipos de heridas.....	26
2.4 Cicatrización de heridas.....	27
2.4.1 Fases del proceso de cicatrización.....	27
2.4.2 Influencia de las bacterias durante la cicatrización	29
2.5 Tratamientos para la cicatrización de heridas	30
2.5.1 Hidrogel.....	30
2.5.2 Células madre	31

2.5.3	Terapia mitocondrial.....	31
2.5.4	Perspectivas actuales en tratamientos para la cicatrización de heridas	32
2.6	Estudio del proceso de cicatrización de heridas	33
2.6.1	Muestreo en heridas	33
2.6.2	Caracterización e identificación de microorganismos en tejidos	35
CAPÍTULO III.....		
3	METODOLOGÍA.....	39
3.1	Delimitación del sitio de estudio.....	39
3.2	Origen de las muestras	39
3.3	Almacenamiento y conservación de las biopsias	42
3.4	Preparación del inóculo.....	42
3.5	Establecimiento de la concentración.....	42
3.6	Cultivo y caracterización morfológica de especies.....	42
3.7	Cuantificación de UFC	43
3.8	Identificación molecular	43
3.9	Elaboración del manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel 46	
3.10	Análisis estadístico.....	46
CAPÍTULO IV.....		
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1	Determinación del Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	48
4.1.1	Hidrogel.....	50
4.1.2	Células Madre.....	50
4.1.3	Mitocondrias.....	50
4.1.4	Control Herida	51
4.1.5	Piel Sana	52
4.2	Detección molecular de especies bacterianas	52
4.2.1	Detección de la presencia de <i>E. coli</i>	52
4.2.2	Detección de <i>S. aureus</i>	54
4.2.3	Detección molecular de <i>P. aeruginosa</i>	56
4.3	Contraste del tratamiento mitocondrial con otros tratamientos convencionales 58	
4.3.1	Dosis más efectiva del tratamiento mitocondrial y de células madre.....	58

4.3.2	Comparación de terapias de cicatrización de heridas.....	60
4.4	Manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel sometidas a tratamientos para la cicatrización.....	64
CAPÍTULO V.....		
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
5.1	Conclusiones.....	66
5.2	Recomendaciones	66
REFERENCIAS.....		68
ANEXOS		86

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Clasificación de las heridas de la piel (Balsa y Culp, 2015; Flowers y Grice, 2020).</i>	26
<i>Figura 2. Tipos de técnicas de microbiología convencional para el análisis de muestras de tejidos (Ferrés et al., 2019; Lopardo, 2016).</i>	36
<i>Figura 3. Distribución de los modelos de investigación.</i>	41
<i>Figura 4. Biopsia por escisión en modelos murinos</i>	41
<i>Figura 5. Métodos de microbiología para el análisis de morfología colonial.</i>	43
<i>Figura 6. Amplificación del gen uidA de la especie bacteriana E. coli en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.</i>	54
<i>Figura 7. Amplificación del gen nucA de la especie bacteriana S. aureus en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.</i>	56
<i>Figura 8. Amplificación del gen lasR de la especie bacteriana P. aeruginosa en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.</i>	58
<i>Figura 9. Efectividad de distintas dosis del tratamiento mitocondrial y células madre en el medio Agar Nutritivo.</i>	59
<i>Figura 10. Contraste de la efectividad de la mejor dosis de los tratamientos para la cicatrización en el medio Agar Nutritivo.</i>	60
<i>Figura 11. Mecanismo de acción de hidrogel cargado con células madre y con PHBM.</i>	61
<i>Figura 12. Mecanismo de acción de células inmunitarias y mitocondrias en la herida.</i>	63
<i>Figura 13. Contenido del manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel sometidas a tratamientos para la cicatrización.</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Microorganismos de la microbiota cutánea.</i>	22
<i>Tabla 2. Factores de crecimiento involucrados en el proceso de cicatrización de heridas.</i>	32
<i>Tabla 3. Clasificación de las biopsias para análisis microbiológico.</i>	35
<i>Tabla 4. Codificación de las biopsias de heridas de piel de ratones.</i>	40
<i>Tabla 5. Secuencia de los primers para la identificación de las especies bacterianas en estudio.</i>	44
<i>Tabla 6. Temperatura de melting y anilling para E. coli, S. aureus y P. aeruginosa. ...</i>	44
<i>Tabla 7. Programación de PCR para los genes de estudio.</i>	45
<i>Tabla 8. Medias de la cuantificación de UFC.ml⁻¹mm⁻² de las muestras sometidas a los tratamientos de cicatrización en los diferentes medios de cultivo sólidos.</i>	48
<i>Tabla 9. Identificación fenotípica de las UFC de las especies bacterianas patógenas en estudio.</i>	49
<i>Tabla 10. Presencia de S. aureus en muestras de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.</i>	52
<i>Tabla 11. Presencia de S. aureus en biopsias de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.</i>	55
<i>Tabla 12. Presencia de S. aureus en biopsias de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.</i>	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Ficha de lectura de placas microbiana.</i>	86
Anexo 2. Identificación de las especies bacterianas del cultivo en placa y PCR.	86
Anexo 3. Resultados de la prueba de Tukey para las dosis de la terapia mitocondrial en el medio Agar Nutritivo.....	88
Anexo 4. Resultados de la prueba de Tukey para las dosis de la terapia mitocondrial en el medio Agar Pseudomonas.	88
Anexo 5. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia mitocondrial en el medio Manitol Salado.....	89
Anexo 6. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia mitocondrial en el medio MUG.....	89
Anexo 7. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Agar Nutriente.	89
Anexo 8. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Agar Pseudomonas.	90
Anexo 9. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Manitol Salado.....	90
Anexo 10. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio MUG.	90
Anexo 11. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Nutriente. Terapia (1): Hidrogel, Terapia (11): Piel Sana, Terapia (5): Células Madre con dosis CM3, Terapia (10): Control con herida, Terapia (7): Mitocondrias con la dosis M1.	90
Anexo 12. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Pseudomonas.	91
Anexo 13. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Bilis Rojo Violeta con MUG.....	91
Anexo 14. Efectividad de distintas dosis del tratamiento mitocondrial en el medio Agar Pseudomonas	92

RESUMEN

Las heridas son traumatismos que alteran la integridad de la piel que causa un estado de vulnerabilidad. En este estado la piel es susceptible de contraer enfermedades infecciosas por la invasión de microorganismos patógenos que modifican el proceso de cicatrización. El estudio de la microbiota presente en heridas de piel ha sido una herramienta importante para el desarrollo de tratamientos como hidrogeles, células madre o terapias basadas en genes. Estos tratamientos se enfocan principalmente en un adecuado proceso de cicatrización donde la microbiota cutánea es capaz de inducir diferentes mecanismos de activación del sistema inmunitario, promoviendo o dificultando el proceso de regeneración de tejidos. Actualmente, las nuevas terapias desarrolladas aceleran la cicatrización de una herida superando a los tratamientos que omiten la importancia de la actividad de un microorganismo en el sitio donde la piel ha sido afectada, debido a que mejoran el manejo de heridas en proceso de cicatrización. En este sentido la terapia mitocondrial se perfila como un posible tratamiento ya que podría acelerar el proceso de división celular e influir en la eliminación de patógenos. En esta investigación se evaluó la carga bacteriana presente en biopsias de heridas de piel de ratones tratados con cuatro dosis diferentes de terapia mitocondrial, y otros tratamientos convencionales como hidrogel en una sola dosis y células madre con cuatro dosis diferentes, con el fin de determinar el efecto de estos tratamientos sobre la población bacteriana. El estudio se enfatizó en tres patógenos oportunistas comúnmente presentes en heridas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*). Se evaluó fenotípicamente colonias aisladas mediante técnicas de microbiología para realizar el recuento bacteriano. Conjuntamente, se extrajo ADN bacteriano para comprobar los resultados obtenidos con las técnicas de microbiología; para ello se amplificó genes característicos de los tres patógenos en estudio mediante PCR anidada. En base a la comparación entre: la mejor dosis del tratamiento mitocondrial M1($2,5 \times 10^2$ ng/ μ l), la mejor dosis de células madre CM3($1,0 \times 10^5$ cel/ μ l), hidrogel y los controles con herida y piel sin herida en Agar Nutritivo, se determinó menor crecimiento bacteriano con el tratamiento de hidrogel ($P=0.0002$). Por otro lado, la terapia mitocondrial con la dosis M1 en relación con el control, redujo la presencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Nuestros resultados sugieren que la terapia mitocondrial, en dosis controladas, representa una alternativa que puede modificar la carga microbiana en beneficio de la cicatrización de heridas.

Palabras clave: Heridas, microbiota, cicatrización, terapia mitocondrial, células madre

ABSTRACT

Wounds are traumas that alter the integrity of the skin, causing a state of vulnerability. In this state, the skin is susceptible to contracting infectious diseases due to the invasion of pathogenic microorganisms that modify the healing process. The study of the microbiota present in skin wounds has been an important tool for the development of treatments such as hydrogels, stem cells or gene-based therapies. These treatments focus mainly on an adequate healing process where the skin microbiota is capable of inducing different activation mechanisms of the immune system, promoting or hindering the process of tissue regeneration. Currently, the new therapies developed accelerate the healing of a wound, surpassing treatments that omit the importance of the activity of a microorganism at the site where the skin has been affected, because of improve the management of wounds in the healing process, in this sense, mitochondrial therapy is emerging as a possible treatment because it could accelerate the process of cell division and influence the elimination of pathogens. In this research, the bacterial load present in biopsies of skin wounds of mice treated with four different doses of mitochondrial therapy, and other conventional treatments such as hydrogel in a single dose and stem cells with four different doses, was evaluated in order to determine the effect of these treatments on the bacterial population. The study focused on three opportunistic pathogens commonly present in wounds (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*). Isolated colonies were phenotypically evaluated using microbiology techniques to perform bacterial counts. Together, bacterial DNA was extracted to check the results obtained with the microbiology technique; For this, characteristic genes of the three pathogens under study were amplified through PCR technique. Based on the comparison between: the best doses of the treatment of mitochondria M1($2,5 \times 10^2$ ng/ μ l), the best doses of stem cells CM3($1,0 \times 10^5$ cel/ μ l), hydrogel and the controls with wound and skin without wound in Nutrient Agar, minor bacterial growth will be reduced with hydrogel treatment ($P=0.0002$). On the other hand, mitochondrial therapy with the dose M1 in relation to the control, reduced the presence of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Our results suggest that mitochondrial therapy, in controlled doses, represents an alternative that can modify the microbial load for the benefit of wound healing.

Keywords:

Wounds, microbiota, healing, mitochondrial therapy, stem cells

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La cicatrización de heridas es un proceso complejo, controlado por diferentes tipos celulares y mediados por liberación de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que dirigen el proceso de cicatrización; de esta manera se evitan complicaciones donde la herida puede desarrollarse como crónica. Su objetivo principal es restablecer la función de barrera del tejido afectado y recuperar su tracción normal. El estado de cicatrización de una herida no depende solo del recuento bacteriano o de las especies microbianas presentes, sino también de la respuesta inmunitaria del huésped, el número de especies bacterianas diferentes presentes, la virulencia de los microorganismos patógenos y las interacciones entre el consorcio microbiano (Tomic-Canic et al., 2020).

Chen et al., (2018) describe que la microbiota normal de la piel interactúa con el sistema inmunitario para reconocer y restringir la colonización de patógenos, contribuyendo a una mejor cicatrización de heridas. Por el contrario, los microorganismos patógenos desempeñan un papel importante en el retraso de la cicatrización de heridas, pues se ha descrito que algunos microorganismos como *P. aeruginosa* y *S. aureus* utilizan mecanismos de virulencia y patogenicidad para permanecer en la herida y agravar su estado. Dentro de estos mecanismos se presentan la formación de biopelículas, liberación de toxinas, resistencia a antibióticos, entre otros (Serra et al., 2015).

Las biopelículas dificultan la aplicación de un tratamiento y el diagnóstico de una infección al estar conformada por varias especies bacterianas, y además estas poblaciones bacterianas cooperan entre sí para promover su propia supervivencia. Por ejemplo, se ha probado que *E. coli* produce succinato en presencia de *S. aureus*, lo cual inhibe la fagocitosis de ambas especies bacterianas, demostrando relaciones de cooperación. Por otro lado, *P. aeruginosa* puede suprimir el crecimiento de *S. aureus* al producir metabolitos tóxicos, demostrando relaciones de competencia; esto a su vez provoca daño en el tejido y al mismo tiempo inhibe su fagocitosis (Bessa et al., 2015; Hotterbeekx et al. 2017).

Los microorganismos evolucionan y desarrollan nuevas estrategias para sobrevivir, siendo la resistencia a antibióticos la mayor preocupación en el desarrollo y aplicación de tratamientos para combatir infecciones. Dentro del grupo de bacterias con

potencial patógeno de la piel se ha estudiado con mayor énfasis a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, donde *S. aureus* ha sido el microorganismo más frecuentemente aislado en heridas de piel y de la cual se han registrado cepas resistentes a antibióticos. (Serra et al., 2015; Hogan et al., 2018).

Actualmente los tratamientos convencionales con medicamentos, cada vez son menos eficaces para la eliminación de microorganismos patógenos envueltos en la cicatrización de heridas. Estos microorganismos emplean mecanismos de resistencia que les permite evadir no solo la respuesta del sistema inmune, sino también, la acción de los medicamentos. En vista de esto, se han desarrollado alternativas que unifican diferentes tratamientos para eliminar patógenos y mejorar el proceso de cicatrización. Entre ellos, la utilización de apósitos de hidrogel cargados de células madre, hidrogel compuesto por factores de crecimiento o proteína sin factor de crecimiento e hidrogel compuesto por péptidos antimicrobianos cortos (AMP), entre otros. En general el hidrogel mantiene un ambiente húmedo ideal en la zona de la herida que es complementado por la acción cicatrizante de los tratamientos combinados (Dutta y Das, 2016; Veith et al., 2019).

De los muchos tratamientos emergentes que se han propuesto para la regeneración de heridas, el tratamiento con mitocondrias tiene un potencial prometedor debido a que son una fuente principal de especies reactivas de oxígeno (ROS) y están involucradas en todas las etapas del proceso de reparación de tejidos, además tienen potencial para acelerar la división celular. Aunque no se han probado en ensayos clínicos para la eliminación de patógenos bacterianos, los ensayos *in vitro* son prometedores (Janda et al., 2016).

1.2 Planteamiento del problema

La cicatrización de una herida es un proceso en el cual intervienen varios factores, tanto ambientales como propios de la fisiología del individuo. Algunos de estos factores pueden retrasar el proceso; como, infecciones o alguna patología sistémica que produce dolor y una lenta recuperación. Un proceso de cicatrización retardado a nivel hospitalario y extrahospitalario representa un gran impacto a nivel económico por los desembolsos en los servicios de urgencia, además, afecta a la salud del individuo pudiendo ocasionarle la muerte. La creciente resistencia generada por microorganismos patógenos ha hecho que los tratamientos de cicatrización evolucionen constantemente para abordar posibles barreras, y así promover una rápida regeneración del tejido (García González et al., 2013)

En el Ecuador, la valoración y cicatrización de heridas se realiza mediante técnicas y antisépticos tradicionales. La aplicación de los tratamientos tradicionales tiene como principal objetivo la regeneración del tejido y restablecer la función anatómica de la piel. Su propósito es el correcto pero lamentablemente el manejo del proceso de cicatrización, en muchos casos, no es el adecuado ya que no se tiene como prioridad el estudio del estado de la herida en cuanto a la microbiología, sino solamente de forma histológica (Benavides Cuasapud, 2014).

Las infecciones son una causa importante de morbilidad y mortalidad en individuos sometidos a diferentes tipos de traumatismos en la piel, pese a los grandes avances en el conocimiento médico acerca de la fisiología de la cicatrización y los factores de riesgo de infección. Los costos y recursos utilizados influyen para que el estado de la herida se agrave; incluso, puede generar complicaciones que afectan al individuo, tal es el caso de pérdida de tejido y amputaciones (Zhao et al., 2016; Wilkinson y Hardman, 2020).

En una herida se produce la interacción de múltiples especies bacterianas entre sí y con el sistema inmune del individuo. El objetivo de un tratamiento para la cicatrización es la regeneración del tejido y con ello de manera implícita la eliminación o reducción de posibles patógenos en el área afectada. No obstante, los estudios sobre las especies bacterianas que modifican su comportamiento al ser sometidos a un determinado tratamiento son limitados, tal es el caso de la aplicación de la terapia mitocondrial como agente antimicrobiano. Esta terapia podría modificar la concentración bacteriana promoviendo una adecuada cicatrización por lo que su estudio y posterior aplicación conllevaría un gran avance para la regeneración de un tejido dañado (Mohsina et al., 2020; Brukner et al., 2018).

1.3 Justificación

La aplicación de tratamientos para la cicatrización de heridas influye en la evolución del estado de la herida, y el resultado final puede variar de acuerdo con la etiología, evolución y localización de la misma. Por esta razón, el estudio del proceso de cicatrización sigue siendo tema de constante investigación y análisis. Es así como las investigaciones se han centrado en buscar, probar y mejorar tratamientos enfocados en regeneración de tejidos (Thuenauer et al., 2020), como en el caso del desarrollo de terapias con células madre con fines cicatrizantes (Nourian Dehkordi et al., 2019).

La aplicación de un tratamiento para la cicatrización se basa preferentemente en los resultados de reordenamiento histológicos, no obstante, se han determinado factores que dificultan la culminación del proceso, como la presencia de microorganismos patógenos. Por lo tanto, antes de iniciar un tratamiento se debe realizar un estudio microbiológico y posteriormente iniciar un tratamiento enfocado en la eliminación de tal microorganismo (Wagner et al., 2016).

Las bacterias patógenas son los microorganismos que han presentado mayor incidencia en el fracaso de tratamientos para la cicatrización. Lamentablemente, existe limitada información sobre estos microorganismos y su acción en la herida; y en el caso de la microbiota normal los estudios son aún menores. Por esta razón, es imprescindible realizar investigaciones acerca de la interacción de los tratamientos para la cicatrización con la microbiota presente en heridas. De esta manera se eleva la posibilidad de desarrollar un tratamiento efectivo, por lo cual, es necesario caracterizar las poblaciones bacterianas y cuantificar de la carga bacteriana total (Bukhari y Aleanizy, 2020).

La presente investigación evaluó la concentración microbiana y presencia de bacterias patógenas comunes en heridas como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mediante la identificación de propiedades fenotípicas y la aplicación de técnicas moleculares. Los resultados de presencia y concentración de estas especies bacterianas permitieron tener una perspectiva más clara sobre la influencia de la terapia mitocondrial en un grupo importante de la microbiota de la herida. El aislamiento de cepas cultivables permitió la identificación fenotípica y el análisis molecular de ADN, mediante la amplificación de genes PCR anidada se comprobó la presencia de la especie de bacteriana aislada (Tipton et al., 2019; Sakamoto et al., 2005).

1.4 Pregunta directriz

¿Existe variación en la carga microbiana debido a la aplicación de terapia mitocondrial en heridas de piel de modelos murinos?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general.

Evaluar la carga microbiana presente en biopsias de heridas de piel de ratones previamente tratados con terapia mitocondrial mediante técnicas fenotípicas y moleculares.

1.5.2 Objetivos específicos

- Establecer el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en biopsias de heridas de piel de ratones tratadas con terapia mitocondrial.
- Determinar la presencia de patógenos bacterianos en las biopsias de heridas de piel de ratones, mediante PCR convencional.
- Contrastar el efecto del tratamiento mitocondrial en la carga microbiana en heridas de piel de ratones frente a tratamientos convencionales de cicatrización.
- Elaborar un manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel sometidas a tratamientos para la cicatrización.

1.6 Hipótesis

La terapia con mitocondrias en heridas de piel de modelos murinos modifica la carga bacteriana comensal y patógenas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Microbiota de la piel

La microbiota de la piel es el conjunto de microorganismos que habitan en la piel. Es un marcador individual que se forma desde el nacimiento y que sufre modificaciones por factores como: la edad, el sexo, el sistema inmunitario, el pH, la temperatura, la humedad, entre otros. Está compuesta principalmente por: bacterias, virus, arqueas, hongos, levaduras y protozoos (Tabla 1.). Además, está involucrada en diversos aspectos de la fisiología tisular, como mecanismos de respuesta de la inmunidad innata y adaptativa ante la colonización de microorganismos (Requena y Velasco, 2020; Flowers y Grice, 2020).

Tabla 1.

Microorganismos de la microbiota cutánea.

Microorganismo	Especie/Género	Tipo	Referencia
Bacterias	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Comensal	Linehan et al., 2018
	<i>Cutibacterium acnes</i>	Comensal	Scharschmidt, 2017
	<i>Roseomonas mucosa</i>	Comensal	
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Comensal	Oh et al., 2016
	<i>Corynebacterium accolens</i>	Comensal	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Patógeno	Flowers y Grice, 2020
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patógeno	Flowers y Grice, 2020
	<i>Corynebacterium spp</i>	Patógeno	
Virus	<i>Polyomavirus HPyV6</i>	Comensal	Oh et al., 2016
	<i>Polyomavirus HPyV7</i>	Comensal	

Hongos	<i>Malassezia globosa</i>	Patógeno	Oh et al., 2016
	<i>Malassezia furfur</i>	Patógeno	
	<i>Candida albicans</i>	Comensal	Theelen et al., 2018

La microbiota de la piel está íntimamente relacionada con la salud y la enfermedad cutánea. Debido a que está compuesta por varias interacciones que desempeñan funciones de protección, al mantenerse en constante equilibrio refleja salud. Por otro lado, cuando existe un desequilibrio, estas interacciones cambian y provocan enfermedades (Linehan et al., 2018; Grice y Segre, 2011).

La investigación sobre la microbiota de la piel a menudo se enfoca en los cambios o alteraciones que se producen en enfermedades y trastornos. Por otra parte, cuando existe una alteración o herida en la piel, la investigación se ocupa de las comunidades microbianas en heridas agudas y crónicas, para determinar la conexión entre la herida y el microbioma de la piel (Cho y Blaser, 2012; Daeschlein et al., 2019).

2.2 Tipos de microorganismos de la piel

La piel alberga aproximadamente 1 billón de microorganismos por cm² de piel. La microbiota de la piel está constituida por diferentes grupos de microorganismos. Esta composición es diferente en cada persona y existen muchos factores que influyen en su evolución a lo largo de la vida. Cumplen diversas funciones y al interactuar con las células del hospedero pueden ayudar o afectar sus actividades normales. Además, pueden ser causantes de algunas enfermedades, no solamente infecciosas. A nivel celular los microorganismos se clasifican en procariotas y eucariotas (Johnson et al., 2018).

Los microorganismos de la piel desempeñan una función de protección contra patógenos invasores, la educación del sistema inmunológico y la descomposición de productos naturales. Las alteraciones en la microbiota, como las que generan los cambios ambientales u ocupacionales, los hábitos de higiene inadecuados o la exposición a antibióticos, modifican el ecosistema y alteran la homeostasis cutánea, lo cual favorece la aparición de diferentes enfermedades (Belkaid y Segre, 2014; Hou et al., 2022).

2.2.1 Organismos procariotas

Los organismos procariotas son aquellos que no poseen núcleo definido y su material genético se encuentra suspendido en el citoplasma, en una región denominada nucleoide. Poseen una gran diversidad metabólica que les permite sobrevivir a diferentes condiciones ambientales y presentar una elevada tasa de división celular. Este grupo se compone por los dominios bacteria y arquea. El dominio bacteria es el más abundante en la microbiota cutánea, y con base a la relación de estos microorganismos con el anfitrión se dividen en: comensales y patógenos (Vázquez, 2018; Grice y Segre, 2011).

2.2.1.1 Bacterias comensales

Las bacterias comensales de la piel coexisten con el anfitrión y tienen funciones protectoras, entre las que están: restricción de la colonización de patógenos mediante la producción de bacteriocinas, producción de metabolitos tóxicos, inducción del potencial de oxidación de baja reducción, agotamiento de nutrientes esenciales, prevención de la adherencia, inhibición de la translocación y degradación de toxinas. Además, promueven la tolerancia inmunológica hacia un antígeno extraño, provocan una respuesta proinflamatoria aumentando la resistencia del hospedero ante la presencia de agentes patógenos y ayudan en el mantenimiento de la piel (Leech et al., 2019; Grogan et al., 2019; Chen et al., 2018).

2.2.1.2 Bacterias patógenas

Las bacterias patógenas son aquellas que pueden adherirse, crecer e invadir al anfitrión causando una enfermedad infecciosa. Estos microorganismos se dividen en patógenos primarios y oportunistas. Los patógenos primarios son capaces de iniciar una infección o enfermedad en un hospedero inmunocompetente y los patógenos oportunistas son aquellos que producen infección en los individuos con alteraciones en las barreras protectoras de la piel y las membranas mucosas. Se aprovechan de las deficiencias del sistema inmunitario que les permiten atravesarlas, colonizar y reproducirse en el hospedero. Se ha demostrado que los agentes patógenos predominantes son: *S. aureus* (oportunista), *P. aeruginosa* (oportunista), *Corynebacterium* spp. (oportunista) y *Cutibacterium acnés* (primario). En heridas la predominancia se incrementa, debido a que se proporciona un ambiente idóneo a nivel de competencia y disposición de nutrientes (Tomic-Canic et al., 2020; Ridaura et al., 2018; Dréno et al., 2018).

La masiva presencia de estas bacterias y sus interacciones pueden inducir una infección que interfiere en el proceso de cicatrización, puesto que estos patógenos emplean múltiples mecanismos para inhibir la respuesta del sistema inmune, Algunas especies bacterianas (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp.) se extienden por los espacios intercelulares del huésped y evaden la fagocitosis y otras especies (*Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella* spp.) son capaces de invadir y multiplicarse dentro de las células del huésped para evadir la acción de los anticuerpos (Bukhari y Aleanizy, 2020; Krishna y Miller, 2012; Byrd et al., 2018).

2.2.2 Organismos eucariotas

Los organismos eucariotas son aquellos que poseen un núcleo, en el cual se encuentra su material genético. Está compuesto en su mayoría por organismos pluricelulares como incluido el ser humano organismos microscópicos y unicelulares. Los organismos pluricelulares están formados por la agrupación de varias células diferenciadas que realizan funciones específicas. Dentro de este grupo se encuentra organismos como el ser humano, animales y plantas. Por otro lado, los organismos unicelulares están formados por una sola célula en la cual producen todas las funciones vitales. En este grupo se incluye a los hongos, levaduras y microorganismos microscópicos como protozoos (Scorza et al., 2017; Berg et al., 2008).

Además, este grupo de organismos se dividen en patógenos y comensales de acuerdo con la interacción con el hospedero. Los hongos son los organismos más abundantes en la piel. Dentro de este grupo se encuentra *C. albicans* que es un hongo comensal que coloniza la piel humana sana, las mucosas y el tracto reproductivo. Sin embargo, *C. albicans* también es un patógeno fúngico oportunista causante de enfermedades como candidiasis diseminada y candidiasis mucocutánea crónica (CMC). También, encontramos al género *Malassezia*, el cual es el más numeroso en especies que habitan la piel. Este género es un organismo patógeno causante de enfermedades como pitiriasis versicolor y dermatitis seborreica (Theelen et al., 2018; Grice y Dawson, 2017).

2.3 Heridas

Una herida se define como daño o interrupción en la estructura de la piel que induce alteraciones en su función anatómica. El origen de una herida puede ser por distintos agentes: físicos, químicos y biológicos. El nivel de gravedad de una herida se mide en función de varios aspectos, como el tamaño, profundidad, contaminación e

integridad de la piel. Las heridas leves a menudo son aquellas que afectan la superficie de la piel y su proceso de cicatrización es corto, mientras que las heridas graves afectan a capas más profundas de la piel, incluidos músculos, tendones, ligamentos, vasos sanguíneos, nervios y huesos (Velnar et al., 2009; Coalson et al., 2019).

2.3.1 Tipos de heridas

Las heridas se clasifican en base a diferentes criterios para definir de una forma más exacta su origen, estado y evolución (Figura 1.).

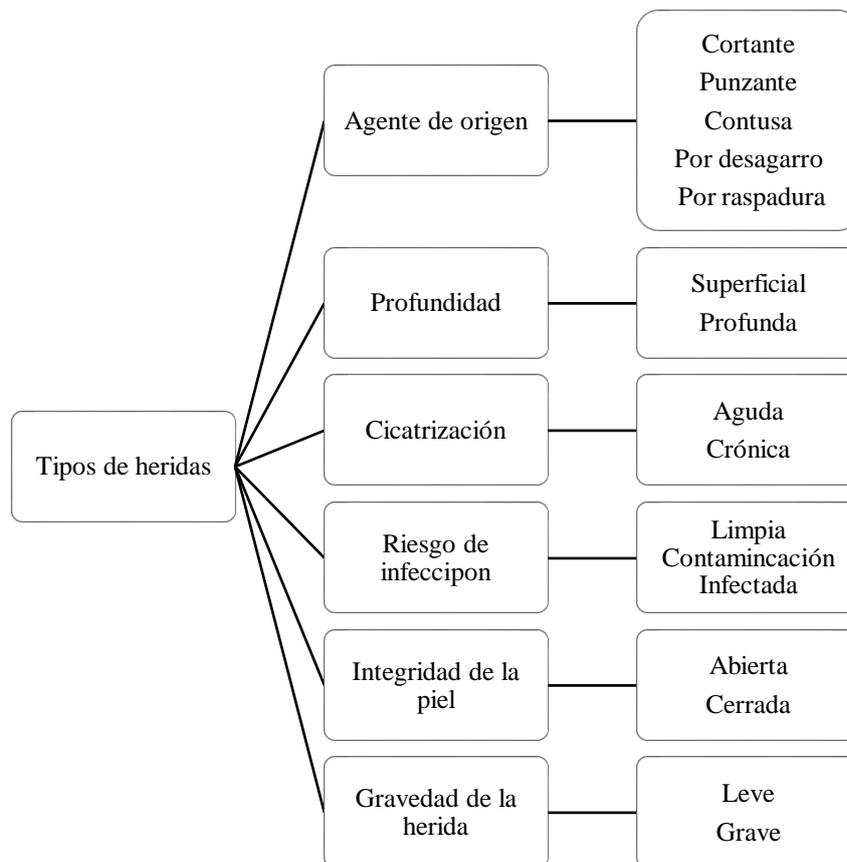


Figura 1. Clasificación de las heridas de la piel (Balsa y Culp, 2015; Flowers y Grice, 2020).

2.3.1.1 Heridas agudas

Las heridas agudas son aquellas que se reparan por sí mismas, siguen una vía de curación oportuna y ordenada. El resultado final de la curación coordinada es la formación de tejido con una estructura similar y funciones comparables a la piel intacta, además mantiene un equilibrio en cuanto a la concentración de bacterias comensales y patógenas (Li et al., 2007).

2.3.1.2 Heridas crónicas

Las heridas crónicas son aquellas que no logran progresar a través de las etapas normales de curación y no se pueden reparar de manera ordenada y oportuna. El proceso de cicatrización es incompleto y perturbado por varios factores que prolongan uno o más etapas. Estos factores incluyen: infección del tejido, hipoxia, necrosis, exudado y niveles excesivos de citocinas inflamatorias (Roy et al., 2020; Wilhelm et al., 2017)

La infección está más comúnmente relacionada con una mala cicatrización de heridas, debido a que prolonga la fase inflamatoria. Esta prolongación provoca la secreción de proteasas que degradan el tejido de granulación recién formado e impide que la herida progrese a la fase de proliferación. La infección puede presentar características como: cicatrización tardía, aumento de exudado, secreción maloliente, bordes debilitados, tejido friable, aumento del tamaño de la herida y mayor dolor (Coalson et al., 2019; Powers et al., 2016).

2.4 Cicatrización de heridas

La cicatrización es un proceso fisiológico esencial que cuenta con la participación de múltiples linajes celulares, cuya presencia y actividad depende de fases que se superponen, con el fin de mantener la homeostasis tisular. La finalidad del proceso de cicatrización es restablecer la función de barrera del tejido afectado y recuperar su tracción normal. En adultos este proceso genera una cicatriz fibrótica que actúa a manera de un parche rápido para la herida. La deficiencia en la respuesta de cicatrización puede conllevar a escenarios complicados, en especial en pacientes que sufren de alguna enfermedad que afecta al sistema inmunitario (Rodrigues et al., 2019).

2.4.1 Fases del proceso de cicatrización

El proceso de cicatrización se divide en cuatro fases: fase de respuesta inmediata, respuesta inflamatoria, proliferación y resolución, en las cuales se desarrollan actividades específicas con la finalidad de obtener una estructura anatómicamente funcional, equivalente a la estructura original de la piel. Aunque las fases que componen a la cicatrización no son mutuamente excluyentes, la resolución exitosa de cada fase es esencial para un adecuado proceso de cicatrización (Shaw y Martin, 2009; Cotran, 2004).

2.4.1.1 Fase de respuesta inmediata

La respuesta inmediata inicia una vez que se produce la lesión, en ese momento las células dañadas activan varias señales de estrés que dan como resultado cambios celulares (alteraciones en la expresión génica, el metabolismo y la supervivencia celular). Una de las primeras respuestas se produce ante el daño a los vasos sanguíneos locales, lo que provoca la formación de un coágulo de red de fibrina. Este coágulo es formado debido a la activación y agregación plaquetaria que obstruye los vasos y actúa como una matriz provisional para la unión de factores de crecimiento, importante para que las células puedan movilizarse (Shaw y Martin, 2009; Nurden et al., 2008).

2.4.1.2 Fase de respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria inicia una vez que los leucocitos circundantes, como los neutrófilos, se dirigen desde los vasos sanguíneos dañados hacia la herida; además, se activan las células inmunes que ya residen en el tejido. La fase de inflamación es determinante para el control de patógenos oportunistas puesto que su presencia activa a los leucocitos y células inmunes que inducen la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y prostaglandinas. Estos mediadores promueven el arribo de neutrófilos que, en conjunto con los mastocitos y macrófagos, emplean mecanismos de eliminación (liberación de óxido nítrico y ROS), evitando infecciones (Medzhitov, 2010).

Varios estudios han enfocado su análisis en la fase inflamatoria debido a que estas poblaciones celulares ejercen una marcada influencia sobre las demás células dentro de la herida y en el tejido circundante (Schäfer y Werner, 2008; Dovi et al., 2004).

2.4.1.3 Fase de proliferación

La reposición del tejido y el cierre permanente de una herida depende de la fase de proliferación, este se lleva a cabo en dos capas de la piel, la epidermis y la dermis. En la epidermis es necesaria la proliferación y migración de queratinocitos periféricos a la herida para lograr una reepitelización adecuada. Las células emplean mecanismos de movilización, como alterar la adherencia célula-célula o célula-matriz, y ensamblan protuberancias laminares ricas en actina que les permite moverse. La regeneración de la epidermis depende de células madre, las cuales cambian de fenotipo para su posterior migración (Shaw y Martin, 2009; Nguyen et al., 2000; Ito et al., 2005).

La reparación de la dermis ocurre en mayor medida por la acción de fibroblastos, miofibroblastos y otras células, que se encargan del cierre de la herida al mismo tiempo

que contribuyen a la síntesis, agrupación y alineación de fibras de colágeno. Las células de la dermis en conjunto forman un nuevo estroma que reemplaza al coágulo de fibrina formado en la respuesta inflamatoria con el tejido de granulación (Hinz, 2007; Shaw y Martin, 2009).

2.4.1.4 Fase de resolución

En la última fase de la cicatrización ocurren eventos de remodelación en la dermis que dependen del correcto equilibrio en la síntesis, agrupamiento y degradación de colágeno, además de la apoptosis de miofibroblastos. En este punto, la inflamación se resuelve debido a la eliminación de neutrófilos por mecanismos de apoptosis, fagocitosis, y desactivación de macrófagos en mayor parte por moléculas antiinflamatorias endógenas como resolvina E y anexina I. Esta fase es importante para la recuperación completa de la funcionalidad y para conferir una apariencia normal al tejido lesionado (Hinz, 2007; Schwab et al., 2007; Shaw y Martin, 2009).

2.4.2 Influencia de las bacterias durante la cicatrización

2.4.2.1 Influencia positiva

En estado planctónico ciertos microorganismos poseen una relación comensal que beneficia el proceso de cicatrización. Cuando se produce una herida, las células inmunitarias son capaces de reconocer bacterias comunes de la piel como *Staphylococcus epidermidis*, el cual libera péptidos con N- formil metionina que son reconocidos por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I no clásicas. Una vez reconocidos los péptidos, se induce una forma de inmunidad adaptativa caracterizada por la producción de células T. Las células producidas expresan genes asociados a la curación de tejidos y defensa antimicrobiana por medio de citocinas IL-17A o IFN- γ (Linehan et al., 2018; Scharschmidt, 2017).

Por otra parte, *Cutibacterium acnes*, descompone los lípidos del sebo, permitiendo utilizar los ácidos grasos como nutrientes e inhibidores de la colonización por microorganismos exógenos. La comprensión de la interacción de microorganismos comensales con la piel y su influencia en la cicatrización de una herida puede ser un punto clave para evitar complicaciones relacionadas con la reparación de tejidos (Flowers y Grice, 2020).

2.4.2.2 Influencia negativa

La microbiota normal de la piel actúa negativamente al prolongar el periodo de inflamación y propiciar una infección. Los microorganismos presentes en la piel a menudo se encuentran en su fenotipo planctónico, pero al enfrentar condiciones de estrés forman biopelículas retrasando la reepitelización. La biopelícula está compuesta por exopolisacáridos y, representa una barrera física contra la fagocitosis patrocinada por células inflamatorias, inhibe la cascada del complemento y la penetración de antibióticos en la herida (Wei et al., 2019; Schierle et al., 2009).

Un biofilm formado por *S. aureus* conduce a una cicatrización deteriorada, al inhibir el movimiento de los queratinocitos y promover la apoptosis. *P. aeruginosa* por su parte inhibe el movimiento de neutrófilos gracias a un mecanismo de necrosis rápida, inducida por la producción de ramnolípidos, dando como resultado la agregación y posterior muerte de neutrófilos cerca de la biopelícula y con ellos la evasión de la respuesta inmunitaria. *P. aeruginosa*, además, posee la capacidad de exportar del biofilm bacterias individuales con potencial para crear nuevas colonias (Mendoza et al., 2019).

2.5 Tratamientos para la cicatrización de heridas

2.5.1 Hidrogel

Los hidrogeles son redes hidrófilas compuestas principalmente de armazones poliméricos mediante varios mecanismos de reticulación, sus propiedades han permitido la cicatrización de heridas debido a que mantiene un ambiente hidratado en el tejido dañado. En tiempos recientes se han realizado múltiples modificaciones a los hidrogeles con la finalidad de mejorar su acción, especialmente se ha trabajado en que se adapten a las distintas etapas de la cicatrización (Fan et al., 2021).

Los hidrogeles pueden acelerar la cicatrización de heridas al ser usados para administrar moléculas bioactivas, es por ello que el enfoque sobre la fabricación y efecto en el tejido afectado es importante para evaluar su efectividad. El hidrogel debe cumplir algunos requisitos como ser biocompatible, degradable y removible, puesto que actúa como un sustituto temporal de la piel. La fabricación de hidrogeles a base de distintas células ha llevado a la investigación con células madre, debido a que estas células presentan dificultades en cuanto al tiempo de retención en el lugar de la herida; desventaja que los hidrogeles pueden superar ya que actúan como una matriz adecuada para prolongar el tiempo de retención. Por otro lado, se han buscado opciones más rápidas

como la combinación con células endoteliales para inducir la rápida formación de vasos sanguíneos. Además, se han enfocado en la reparación nerviosa del tejido afectado al combinar el hidrogel con células de Schwann las cuales que han mostrado resultados prometedores (Fan et al., 2021; Shen et al., 2016).

2.5.2 Células madre

En los últimos años el tratamiento con células madre para la regeneración de tejidos ha sido una opción terapéutica con mucho potencial debido a que estas células poseen una capacidad de autorrenovación y diferenciación celular. Por otro lado, encontrar una fuente óptima y un método de administración adecuado ha sido el desafío principal para que esta terapia funcione (Nourian Dehkordi et al., 2019).

Entre las principales fuentes de células madre que tienen un potencial para la regeneración de tejidos están las células madre embrionarias, las células madre pluripotentes inducidas y las células madre adultas. Se ha demostrado que las células madre embrionarias pueden diferenciarse entre queratinocitos basales que pueden ser utilizadas para la reconstrucción de la epidermis, pero el tratamiento con este tipo de células se torna complicado debido a su potencial de inmunogenicidad y tumorigenicidad, además de que se ve envuelto en discusiones de la índole ética (Dash et al., 2018; Guenou et al., 2009).

Las células madre pluripotentes inducidas combinan muchas ventajas de otros tipos de células madre que les permiten diferenciarse en todos los tipos de células, desde la piel hasta los nervios y se evita las preocupaciones éticas y el posible rechazo inmunológico. En estudios recientes el tratamiento con estas células permitió una cicatrización de heridas cutáneas en ratones puesto que promovió la síntesis de colágeno y la angiogénesis (Zhang et al., 2015).

Por último, las células madre adultas son las más utilizadas en el campo de regeneración de tejidos debido a su capacidad proliferativa, potencial de autorrenovación y capacidad para diferenciarse en otros linajes, en adición, se encuentra en varios tejidos (Nourian Dehkordi et al., 2019)

2.5.3 Terapia mitocondrial

A bajas concentraciones las mitocondrias son participantes esenciales en la señalización celular, la inducción de la respuesta miogénica y la defensa contra agentes infecciosos (Janda et al., 2016). El sistema NADPH oxidasa leucocitaria (Nox) es una de

las principales fuentes de ROS implicadas en la destrucción de patógenos, en la señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y en la respuesta del TNF (Demyanenko et al., 2017).

Por otro lado, el estudio de Demyanenko et al., (2017) menciona que el estrés oxidativo es ampliamente reconocido como un factor importante en el retraso en la cicatrización de heridas en la diabetes. El estrés oxidativo excesivo e incontrolado provoca la prolongación y el deterioro del proceso de inflamación, que juega un papel clave en la patogénesis de las heridas. También altera significativamente el microbioma bacteriano, disminuyendo la diversidad y promoviendo la colonización de bacterias de la microbiota de la piel para formar biopelículas (Bilgen et al., 2019; Kim et al., 2020)

2.5.4 Perspectivas actuales en tratamientos para la cicatrización de heridas

La cicatrización de heridas ha sido un tema de importancia en el ámbito de la salud. Una herida que no cicatriza está propensa a una infección incrementando el riesgo de muerte del paciente, además del aumento de gastos. En vista de los riesgos de una cicatrización no adecuada, la investigación se ha centrado en mejorar la angiogénesis puesto que la generación de vasos es reducida en heridas cuya cicatrización es retardada.

Entre los principales tratamientos para mejorar la angiogénesis están las terapias proteicas donde se administran factores de crecimiento que intervienen el proceso de cicatrización de manera natural (Tabla 2.), pero que esta vez serán exógenos.

Tabla 2.

Factores de crecimiento involucrados en el proceso de cicatrización de heridas.

Factores de crecimiento	Función	Modelo experimental	Referencia
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Son importantes quimioatrayentes. Se han reportado resultados alentadores probablemente debido a la capacidad de PDGF para reclutar células en la herida y de estimular una respuesta angiogénica.	Humanos	Veith et al., 2019
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Es un conocido mediador de angiogénesis, en algunos ensayos	Ratones	Mehta y Besner, 2007

clínicos ha reducido el tiempo de curación y aumentado de reepitelización.

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	Son capaces de promover la angiogénesis y la proliferación o migración de células endoteliales; en injertos de piel su acción ha acelerado la cicatrización estimulando la angiogénesis.	Ratones	Veith et al., 2019
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Estos factores son los principales responsables de la regulación de angiogénesis y la linfangiogénesis, se ha demostrado que su acción incrementa el número de células endoteliales alrededor de la lesión.	Ratones	Losi et al., 2010

Entre otros tratamientos que han presentado resultados prometedores se encuentran la entrega de proteínas sin factor de crecimiento, la administración de péptidos antimicrobianos cortos, factores derivados de la sangre terapias basadas en genes y ácidos nucleicos, o la mejora de fármacos para la angiogénesis. Todos los tratamientos deben ser sometidos a un profundo estudio con la finalidad de posicionarlos como una alternativa para la mejora del proceso de cicatrización de heridas.

2.6 Estudio del proceso de cicatrización de heridas

El proceso de cicatrización de las heridas es diferente en cada tipo de herida. Este proceso está influenciado por diferentes factores que determinan su evolución hasta obtener una cicatriz o estructura anatómicamente funcional. El diagnóstico microbiológico en estos casos se realiza para determinar la etiología de una infección o enfermedad producida por microorganismos. Un correcto diagnóstico evita que se generen complicaciones graves causadas por la evolución de la infección y la aplicación de tratamientos innecesarios (Böer-Auer, 2018; Stevenson y Rodins, 2018).

2.6.1 Muestreo en heridas

El muestreo es un punto crítico para el análisis de tejidos, puesto que, se debe tomar la muestra de una zona representativa de la infección evitando áreas propensas a causar daños en el paciente y manejar técnicas adecuadas para la conservación de la muestra.

Las técnicas de muestreo como cepillado, hisopado y biopsias son utilizadas de acuerdo con el objetivo de la investigación. Sin embargo, la biopsia de piel es la más recomendada para diagnóstico microbiológico, ya que se puede realizar cultivos cuantitativos que brindan información acerca de la densidad o carga bacteriana de la herida con una menor posibilidad de contaminación por el manejo de los instrumentos de muestro (Prast-Nielsen et al., 2019; Kim et al., 2019).

2.6.1.1 Cepillado

Es un procedimiento que consiste en cepillar el área de estudio aplicando una presión moderada en sola una dirección para evitar contaminación en la muestra. Se realiza para tomar muestras superficiales en la piel que no presente heridas abiertas y cuero cabelludo. Se emplea un cepillo para microbiología de un solo uso o con una hoja de bisturí. Después del muestreo se introduce el cepillo o muestra en una solución de conservación líquida con un volumen de 1 a 10ml. Se recomienda que en el caso de utilizar un cepillo el volumen debe cubrir hasta la última cerda. Esta técnica permite realizar cultivos cualitativos y semicualitativos (Santosh et al., 2018; Alexeyev y Jahns, 2012; Bunyaratavej et al., 2016)

2.6.1.2 Hisopado

La técnica consiste en frotar con un hisopo estéril la superficie o área de muestreo. El hisopo es de un solo uso, cuenta con una cubierta de algodón y un mango rígido. Presionar el hisopo sobre la superficie girando 360° o realizar un zigzag durante 30 segundos. Esta técnica se emplea para la toma de muestras superficiales como heridas, piel y abscesos (Drinka et al., 2012).

En superficies internas del cuerpo como mejillas se debe impregnar un hisopo estéril en un medio diluyente y frotarlo en las áreas de muestreo. En superficies externas como la piel no es necesario humedecer el hisopo. Esta técnica permite realizar cultivos cualitativos y semicualitativos. Después del muestreo para cultivos cualitativos el hisopo debe ser almacenado en una solución de conservación y para cultivos semicualitativos se debe realizar el cultivo directamente en una placa mediante estriado (Bjerre et al., 2019; Prast-Nielsen et al., 2019).

2.6.1.3 Biopsia

La biopsia es un procedimiento de diagnóstico que consiste en la remoción de una parte representativa de una lesión en un tejido. Se realizan para diagnosticar cánceres de

piel, infecciones y desórdenes autoinmunes e inflamatorios. Las biopsias más comunes para la obtención de muestras de tejido son por incisión, escisión y punción (Tabla 3.). La selección del tipo de biopsia depende de la patología de la enfermedad sospechada y la ubicación de la lesión (Ramsey y Rostami, 2021; Böer-Auer, 2018).

Tabla 3.

Clasificación de las biopsias para análisis microbiológico.

Tipo de biopsia	Descripción	Referencia
Biopsia por incisión	Es un procedimiento en el que solo se toma la muestra de una parte de una lesión con ayuda de un bisturí. La forma de la incisión es fusiforme, con ángulos de 30 ° en las puntas de la herida.	Ramsey y Rostami, 2021 Kilic et al., 2020
Biopsia por escisión	Es un procedimiento en el que se extrae una muestra de espesor total con ayuda de un bisturí. El tamaño de la muestra varía de 0.5 a 1 cm.	Prast-Nielsen et al., 2019 Kilic et al., 2020
Biopsia por punción	Es un procedimiento en el que se toma una muestra de piel de espesor total con ayuda de un instrumento de cuchilla circular o sacabocados. El tamaño de la muestra varía de 2 a 8 mm de diámetro.	Breslavets y Lapa, 2019 Kilic et al., 2020

2.6.2 Caracterización e identificación de microorganismos en tejidos

La identificación de microorganismos en tejidos se puede realizar mediante técnicas de microbiología convencional y técnicas de biología molecular. Actualmente, se utiliza en un mayor porcentaje los métodos de biología molecular, puesto que se obtienen diagnósticos sensibles y específicos en menor tiempo. Aunque estos métodos no sustituyen a los convencionales, complementan los procedimientos para obtener resultados más fiables y eficaces (Grogan et al., 2019).

2.6.2.1 Técnicas de microbiología convencional

El cultivo microbiano es el estándar de oro para el diagnóstico de infecciones. Todas las heridas sospechosas de tener una infección deben tener un cultivo y una prueba de sensibilidad antes del tratamiento con antimicrobianos. Existen varios métodos que permiten cultivar los microorganismos bajo condiciones experimentales (Figura 2.). Sin embargo, es importante tomar en cuenta que, en muchos casos, la concentración de microorganismos en una muestra puede cambiar hasta su procesamiento o cultivo. Por lo cual es importante desarrollar metodologías que disminuyan los riesgos de contaminación y errores de manipulación (Richardson y Ahern, 2012).

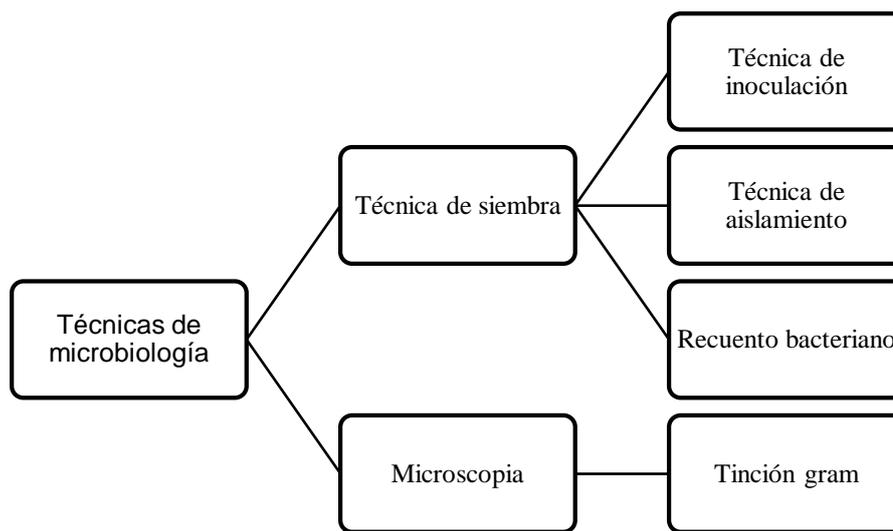


Figura 2. Tipos de técnicas de microbiología convencional para el análisis de muestras de tejidos (Ferrés et al., 2019; Lopardo, 2016).

La aplicación de estos procedimientos ha permitido propagar a los microorganismos en medios de cultivos para su aislamiento y la obtención de cultivos puros, facilitando, de este modo, el estudio, caracterización, aplicación y control de estos. La técnica de análisis depende del tipo de microorganismo y propósito específico del estudio. En el estudio de cultivos bacterianos algunos de los criterios que se emplean para su caracterización incluyen: tamaño, morfología celular, forma de agrupación, reacción a la tinción de Gram, formación de esporas, movilidad y características fenotípicas y bioquímicas en medios líquidos o sólidos en los que presentan patrones de crecimiento en cuanto a la forma, tamaño, elevación y color de las colonias (Schubert et al., 2017)

2.6.2.2 Técnicas de biología molecular

Son técnicas útiles para el estudio de la estructura química y física de macromoléculas biológicas como ácidos nucleicos y proteínas. Sus resultados permiten comprender la función biológica de un gen o determinar la presencia de microorganismos en una muestra. En el campo de la identificación de microorganismos este tipo de técnicas permitieron obtener avances en el conocimiento de los procesos biológicos normales y patológicos (Lai, 2001).

Además, las técnicas de biología molecular han permitido el desarrollo de terapias dirigidas a vías moleculares celulares específicas, así como el diagnóstico más preciso y cada vez menos invasivo de las enfermedades. Por ejemplo, los métodos genotípicos han permitido la identificación de una gran diversidad de taxones previamente desconocidos, la caracterización de bacterias no cultivables y han facilitado los estudios de metagenómica en comunidades bacterianas grandes y diversas (Franco-Duarte et al., 2019).

A. Lisis celular

La lisis celular es una operación unitaria donde se destruye la membrana externa de la célula con la finalidad de liberar materiales intercelulares como ADN, ARN, proteínas u otros orgánulos para su posterior análisis mediante técnicas específicas. Este método es utilizado para el diagnóstico molecular de patógenos, inmunoensayos, purificación de proteínas, diagnóstico de cáncer, detección de drogas y análisis de la composición de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Shehadul Islam et al., 2017).

B. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica que se utiliza para amplificar segmentos específicos de ADN, ampliamente utilizada en el campo clínico y de laboratorio. Sus componentes principales son un templado inicial, cebadores, bases de nucleótidos libres y la enzima ADN polimerasa. Este proceso aprovecha el apareamiento de bases complementarias, la naturaleza bicatenaria y la temperatura de fusión de las moléculas de ADN y se realiza por tres procesos secuenciales que se repiten de acuerdo con los ciclos: fusión del ADN (desnaturalización), hibridación y replicación del ADN (elongación) (Ghannam y Varacallo, 2021).

Una variante de la PCR clásica es la PCR anidada que se utiliza en situaciones en las que es necesario aumentar la sensibilidad o especificidad de la PCR. Esta técnica

generalmente hace uso de dos reacciones de amplificación secuencial, cada una de las cuales usa un par diferente de cebadores. El producto de la primera reacción de amplificación se usa como molde para la segunda PCR, que está cebada por oligonucleótidos que se colocan en el interior del primer par de cebadores. El uso de dos pares de oligonucleótidos permite realizar un mayor número de ciclos, lo cual aumenta la sensibilidad de la PCR (Green y Sambrook, 2019).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Delimitación del sitio de estudio

El estudio formó parte del proyecto de investigación: "Trasplante de mitocondrias como una nueva terapia para mejorar la regeneración de tejido en heridas quirúrgicas: ensayo preclínico en ratones" – Proyecto CEDIA XIV-2019-04. En este proyecto participaron las instituciones Universidad San Francisco de Quito, que fue la encargada del mantenimiento de los modelos murinos, así como la aplicación de los diferentes tratamientos de cicatrización; Universidad Politécnica Salesiana encargada de análisis de expresión génica y Universidad Técnica del Norte encargada del análisis microbiológico mediante cultivo y análisis molecular a partir de biopsias de piel.

El componente desarrollado por la Universidad Técnica del norte se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte, ubicado en el campus del antiguo hospital San Vicente de Paúl (17N 821320.17 38359.9), parroquia El Sagrario, cantón Ibarra, provincia Imbabura, Ecuador.

3.2 Origen de las muestras

Previo a realizar el estudio microbiológico en las biopsias de tejido de ratones, se obtuvo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito. La herida quirúrgica y aplicación de los tratamientos para la cicatrización como hidrogel, células madre y terapia mitocondrial, fueron realizadas por miembros capacitados del proyecto de investigación; en los laboratorios de veterinaria de la Universidad San Francisco de Quito (9978214 785423 17M), ubicado en el campus Cumbayá, provincia Pichincha, Ecuador. La herida se realizó en la zona dorsal del ratón previamente rasurado y se aplicaron los tratamientos.

El tratamiento con hidrogel fue el único que no se aplicó por dosis, para el tratamiento con células madre se aplicaron cuatro dosis CM0 (0 cel/ μ l), CM1(2,5 x10⁴ cel/ μ l), CM2 (5,0 x10⁴ cel/ μ l) y CM3 (1,0 x10⁵ cel/ μ l) y para la terapia mitocondria se aplicaron cuatro dosis M0 (0 ng/ μ l), M1 (2,5 x10² ng/ μ l), M2 (5,0 x10² ng/ μ l) y M3 (1,0 x10³ ng/ μ l). Los códigos de las muestras fueron establecidos de acuerdo con el tratamiento como se muestra en la Tabla 4. Después de 72 horas de la aplicación del tratamiento los ratones fueron enviados a las instalaciones de los laboratorios de

Biotecnología de la Universidad Técnica del Norte para continuar con el análisis microbiológico.

Tabla 4.

Codificación de las biopsias de heridas de piel de ratones.

Terapia	Dosis	Código	N° de muestras
Piel sana	-	PS	3
Control	-	CTRL	18
Hidrogel	-	TRT	4
Células madre	0 cel/ μ l	CM0	5
	2,5 x10 ⁴ cel/ μ l	CM1	7
	5,0 x10 ⁴ cel/ μ l	CM2	7
	1,0 x10 ⁵ cel/ μ l	CM3	6
Terapia mitocondrial	0 ng/ μ l	M0	6
	2,5 x10 ² ng/ μ l	M1	8
	5,0 x10 ² ng/ μ l	M2	8
	1,0 x10 ³ ng/ μ l	M3	8

La obtención de biopsias se realizó durante un periodo de 3 meses, el estudio de los tratamientos se dividió para el mes de enero el tratamiento con hidrogel, el mes de febrero el tratamiento con células madre y el mes de marzo la terapia mitocondrial. Cada semana se recibió una tanda de modelos murinos sometidos al tratamiento para la cicatrización. La tanda estaba compuesta por ratones con heridas suturadas que no fueron sometidas a ningún tratamiento, denominados control y ratones sometidos a un tratamiento para la cicatrización. Se tomaron muestras de heridas de piel de 80 ratones, una muestra por ratón (Figura 3).

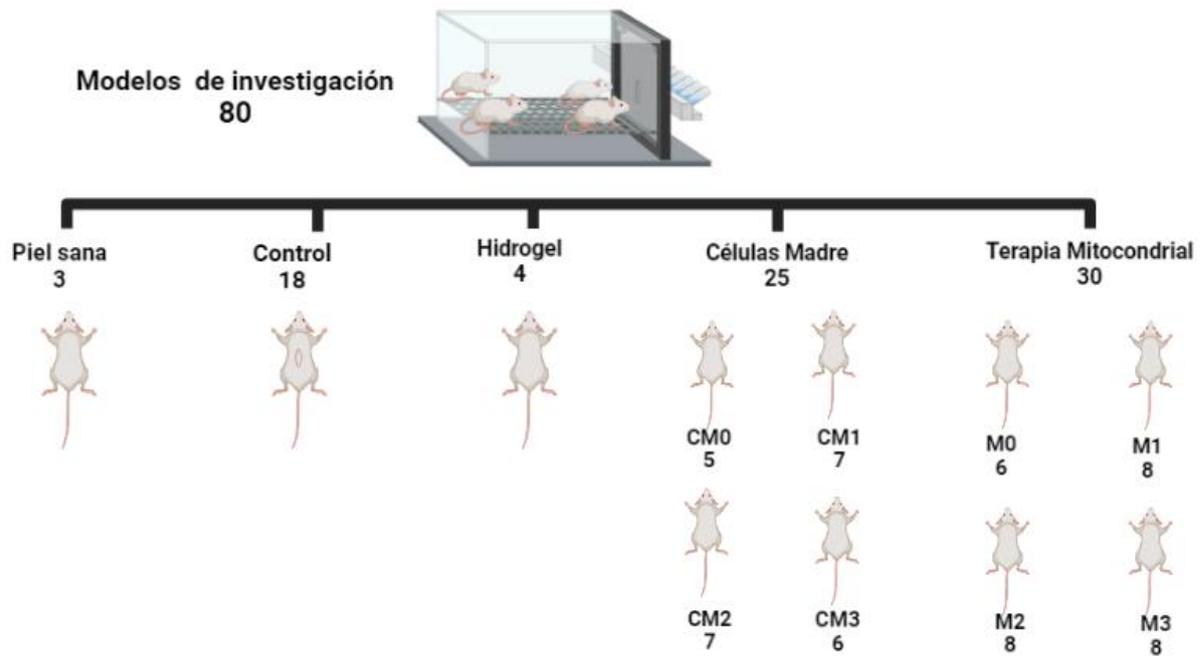


Figura 3. Distribución de los modelos de investigación.

Se inició con la eutanasia de los ratones mediante la técnica de dislocación cervical. Posteriormente, se extrajo la muestra mediante la técnica de biopsia por escisión. Se obtuvo un área aproximada de 5mm^2 formando un cuadrado, como se muestra en la Figura 4 (Prast-Nielsen et al., 2019). Luego, se almacenaron las biopsias en microtubos estériles con 1.5ml de caldo de cultivo TSB (Ikeda et al., 2020; INDOT, 2015; Hernández et al., 2013).

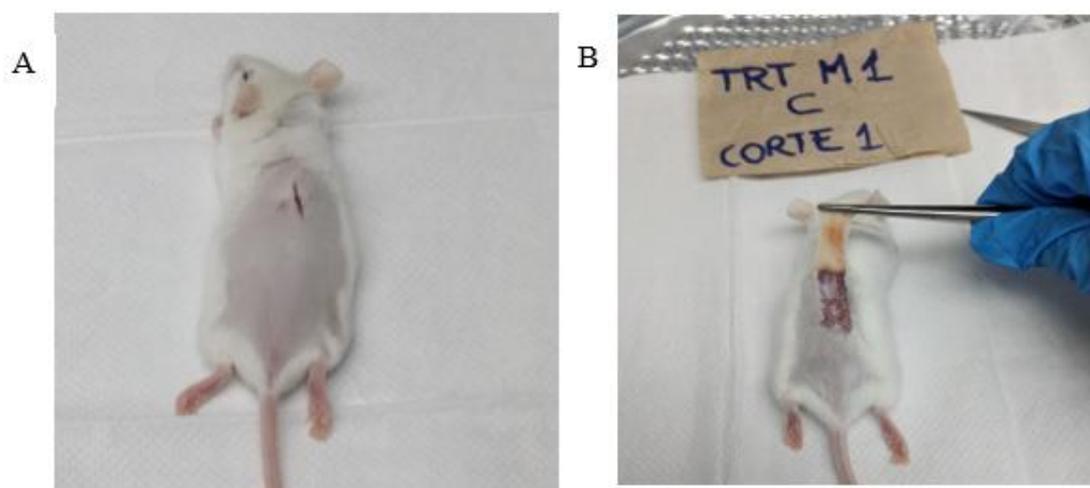


Figura 4. Biopsia por escisión en modelos murinos

Nota* A=eutanasia ratón con herida; B=biopsia de la herida

3.3 Almacenamiento y conservación de las biopsias

Las biopsias se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta 24 horas después de la extracción (Straube y Juen, 2013).

3.4 Preparación del inóculo

Las biopsias se aclimataron por 10 minutos. Luego, se homogenizaron mediante agitación en un vórtex durante 30 segundos, para suspender las células bacterianas (Prast-Nielsen et al., 2019). Después, se retiraron las biopsias del caldo de cultivo con ayuda de pinzas metálicas estériles, procurando eliminar el exceso de caldo de cultivo TSB presionando contra las paredes del microtubo. Se colocaron las biopsias en una caja Petri para medir sus áreas. Se cerró cuidadosamente el microtubo que contenía la suspensión bacteriana (solución madre). Este proceso se realizó cerca del mechero y en una cabina de flujo laminar para evitar contaminación. Finalmente, se inactivó las biopsias mediante calor húmedo en una autoclave a 121 °C (Hillen et al., 2015).

3.5 Establecimiento de la concentración

Se realizó una dilución 10^{-1} de las muestras originales (Esposito et al., 2017), para lo cual se homogenizó el microtubo de la solución madre para suspender las células bacterianas mediante agitación en un vórtex por 30 segundos. Posteriormente, se transfirieron 150µl de la solución madre al tubo correspondiente a la dilución 10^{-1} que contiene 1350µl de caldo TSB estéril y se homogenizó por 30 segundos mediante agitación en un vórtex, para la posterior siembra (Elbing y Brent, 2019). El volumen sobrante de la solución madre se incubó a 37°C por 24 horas para la extracción de ADN.

3.6 Cultivo y caracterización morfológica de especies

Se realizó una siembra por extensión con ayuda de un asa de Drigalski estéril en un medio general (Agar Nutritivo) y tres medios selectivos (Agar Pseudomonas, Agar Bilis Rojo Violeta con MUG y Agar Manitol Salado). Se transfirió un inóculo de 100µl de la dilución al centro de la caja de Petri. Se extendió el inóculo con el asa de Drigalski estéril por toda la superficie de la placa, sin dejar espacios libres de inóculo como se muestra en la Figura 5 (Esposito et al., 2017).

Se realizaron dos repeticiones de la dilución 10^{-1} en los 4 medios de cultivo sólidos, obteniéndose un total de 640 placas sembradas. Se selló con parafilm y rotuló el

código de la muestra, factor de dilución y nombre del medio de cultivo. Finalmente, se incubó a 37 °C por 48 horas.

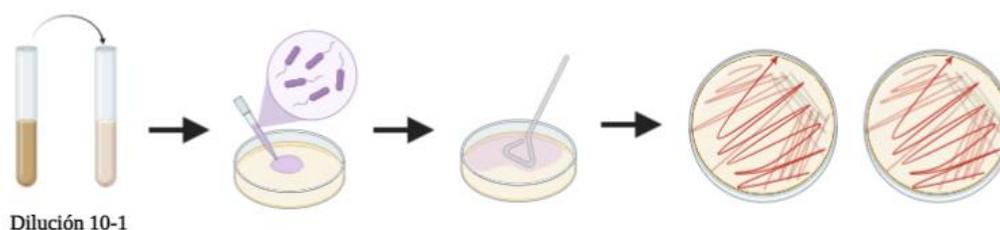


Figura 5. Métodos de microbiología para el análisis de morfología colonial.

3.7 Cuantificación de UFC

El conteo de colonias se realizó a las 48 horas después de la siembra. Posteriormente, se registraron los datos requeridos en las fichas de lectura (Anexo 1.), y finalmente se calculó la concentración de UFC/ml*mm² (Ec.1) (Osante y Ruiz, 2018, p.69; Esposito et al.,2017).

$$\frac{UFC}{ml \times mm^2} = \frac{N^{\circ} UFC * factor\ de\ dilución}{ml\ de\ la\ muestra\ sembrada * mm^2} \times 10 \quad (Ec. 1)$$

Nota* El factor de dilución = inversa de la dilución, N° UFC = número de colonias contabilizadas, ml = volumen de la dilución mm² = área de la biopsia.

Para la identificación de la morfología colonial en los medios de cultivo específicos para cada especie bacteriana, se determinó que las colonias de forma circular y de coloración rojo/violeta son positivas para *E. coli* en medio de cultivo agar bilis rojo violeta con MUG (Acton, 2013); colonias de forma circular y de coloración amarilla son positivas para *S. aureus* en el medio agar manitol salado (Hamdan-Partida et al., 2015); colonias de forma circular y de coloración blanca, que emitan fluorescencia al ser observadas bajo luz UV son positivas para *P. aeruginosa* en el medio agar Pseudomonas (Callicó et al., 2004)

3.8 Identificación molecular

Para la identificación molecular de las especies bacterianas se extrajo el ADN de la solución madre cultivada a 37 °C por 24 horas, empleando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® (Promega). La identificación se realizó mediante PCR anidada. Se emplearon primers específicos para el gen *uidA* en la especie *E. coli*, el gen *nucA* para la especie *S. aureus* y el gen *lasR* para la especie *P. aeruginosa* (Tabla 5.).

Tabla 5.

Secuencia de los primers para la identificación de las especies bacterianas en estudio.

Especie	Gen	Primer	Secuencia	Referencia
<i>E. coli</i>	<i>uidA</i>	UAL-754	5'-AAAACGGCAAGAAAAAGCAG-3'	Bej et al., 1991
		UAR-900	5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3'	
<i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	nucR	5'-GCCTTGACGAACTAAAGCTTCG-3'	KrishnanNair Geetha et al., 2020
		nucF	5'-GACTATTATTGGTTGATCCACCTG-3'	
<i>P. aeruginosa</i>	<i>lasR</i>	PA-LASR	5'-AACTCGTGCTGCTTTCGC-3'	KrishnanNair Geetha et al., 2020
		PA-LASF	5'-GTTCGGCCTGTTGCCTAAG-3'	

Para estandarizar la temperatura de melting y anilling se aplicó la (Ec.2) y (Ec.3), se calculó el promedio del resultado de la temperatura de melting con el resultado de la temperatura de anilling y se probó dos opciones adicionales; la primera al sumar 5 °C al resultado y la segunda al restar 5 °C grados al resultado, obteniendo las temperaturas mostradas en la Tabla 6.

$$Tm = 4(C + G) + 2(A + T) \quad (\text{Ec. 2})$$

$$Tanill = Tm - 5 \quad (\text{Ec. 3})$$

Nota* C= Citocina; G= Guanina; A= Adenina; T=Timina; Tm = temperatura de melting

Tabla 6.

Temperatura de melting y anilling para *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Bacteria	Primer	T. primer		T. calculada		T. estandarizada (°C)
		T. de melting (°C)	T. de melting (°C)	T. de anilling (°C)	Promedio (°C)	
<i>E. coli</i>	VAL-754	56,3	6	51	53,5	50
	VAR-900	64,4	0	65	67,5	

<i>S. aureus</i>	nucR	62,7	6	61	52	45
	nucF	61,2	8	63	65,5	
<i>P. aeruginosa</i>	Pa-lasR-R	59,9	6	51	53	51
	Pa-lasR-F	62,3	0	55	57,5	

Para la PCR se utilizó la polimerasa comercial GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega). El volumen de la reacción PCR fue de 15µl (1x), contenía: 7.5µl de Master Mix GoTaq® Green Master Mix, 0.3µl de primer forward (1x), 0.3µl de primer reverse (1x), 1µl de cloruro de magnesio MgCl₂ (Promega®), 1µl de ADN bacteriano y 4.9 µl de agua destilada estéril. El programa de amplificación del termociclador (SimpliAmp®) se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7.

Programación de PCR para los genes de estudio.

Gen uidA		
Ciclo	Temperatura	Tiempo
Desnaturación inicial	95°C	1 minuto
Anillamiento	50°C	30 segundos
Extensión final	72°C	30 segundos
N° de repetición de ciclos	30	
Conservación	4°C	Tiempo indefinido
Gen nucA		
Ciclo	Temperatura	Tiempo
Desnaturación inicial	94°C	30 segundos
Anillamiento	45°C	45 segundos

Extensión final	45°C	45 segundos
N° de repetición de ciclos	30	
Conservación	4°C	Tiempo indefinido
<i>Gen lasR</i>		
Ciclo	Temperatura	Tiempo
Desnaturación inicial	95°C	1 minuto
Anillamiento	51°C	30 segundos
Extensión final	72°C	30 segundos
N° de repetición de ciclos	30	
Conservación	4°C	Tiempo indefinido

Se utilizaron cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* del cepario de la Universidad Técnica del Norte como controles positivos. La evaluación de fragmentos se realizó sobre gel de agarosa, utilizando un marcador de peso molecular “Invitrogen” estándar de ADN (1Kb). El tamaño de las bandas de ADN esperado para *E. coli* fue de 147 pb, para *S. aureus* de 154 pb y para *P. aeruginosa* de 195 pb (KrishnanNair Geetha et al., 202; Bej et al., 1991).

3.9 Elaboración del manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel

El contenido del manual está constituido por conceptos claves, protocolos y gráficos ilustrativos de las metodologías para el análisis de tejidos a nivel microbiológico y molecular, los cuales fueron probados para la estandarización de protocolos para la evaluación de la carga microbiana presente en biopsias de heridas de piel de ratones.

3.10 Análisis estadístico

En el estudio se empleó un diseño de bloques completos al azar (DBCA) usando como factor de estudio el tipo de terapia, con el fin de determinar la efectividad del

tratamiento mitocondrial frente a otros tratamientos convencionales (células madre e hidrogel). Se analizó la reducción de la concentración bacteriana en la herida mediante recuento de UFC en el medio Agar Nutritivo. El criterio para la selección de la mejor dosis fue la mayor reducción en la carga microbiana presente en la herida.

Se realizó una transformación logarítmica de los datos con la finalidad de reducir el coeficiente de variación. Se compararon tratamientos con células madre y mitocondrias para obtener la mejor dosis de cada tratamiento y se empleó un ANOVA con $\alpha=0,05$ para el análisis de datos y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. Finalmente, se compararon todas las terapias. Los datos analizados tuvieron al menos tres repeticiones para mantener la confiabilidad de los datos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Se determinó los valores de recuentos de UFC en el medio de cultivo Agar Nutritivo detallados en la Tabla 8., los cuales sirvieron para el análisis de evaluación de carga microbiana total presente en la herida, además estas colonias fueron identificadas con morfología circular y morfología irregular de colores blancos y amarillos. Los datos obtenidos en los medios de cultivo selectivos (Agar Manitol Salado, Agar Pseudomonas y Agar Bilis Rojo Violeta con MUG) (Tabla 8.), advierten la presencia de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, basándonos en sus características fenotípicas cuando son cultivadas en laboratorio (Feng y Lampel, 1994; Acton, 2013; Karimzadeh y Ghassab, 2022).

Tabla 8.

Medias de la cuantificación de UFC.ml⁻¹.mm⁻² de las muestras sometidas a los tratamientos de cicatrización en los diferentes medios de cultivo sólidos.

Terapia	Dosis	Medio de Cultivo			
		AN	AP	MS	MUG
Hidrogel		0.05±0.08	0,00	0,00	0,00
CM0	0 cel/ul	1.27±0.97	0,00	0.42±0.64	0,00
CM1	2,5x10 ⁴ cel/μl	2.09±0.85	0,00	0.64±0.88	0,00
CM2	5,0x10 ⁴ cel/μl	1.29±1.03	0.15±0.24	0.57±0.64	0.28±0.44
CM3	1,0x10 ⁵ cel/μl	0.47±0.12	0,00	0.46±0.88	0,00
M0	0 ng/μl	0.56±0.18	0,00	0.36±0.33	0,00
M1	2,5x10 ² ng/μl	1.45±0.26	0,00	0.34±0.42	0.04±0.07
M2	5,0x10 ² ng/μl	2.23±0.22	0.07±0.13	0.68±0.71	0.27±0.50
M3	1,0x10 ³ ng/μl	2.46±0.14	0.20±0.37	1.13±0.88	0.75±0.90

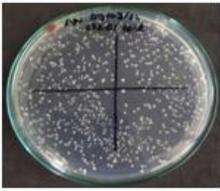
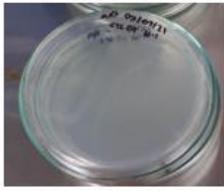
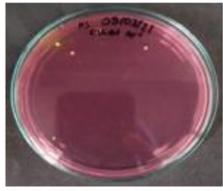
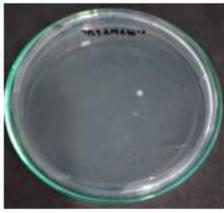
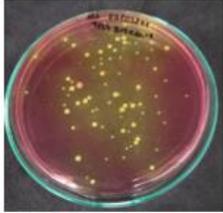
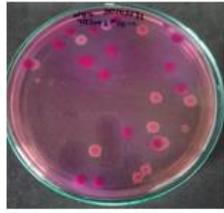
Control	1.03±0.82	0.11±0.36	0.38±0.58	0.31±0.58
Piel sana	0.54±0.78	0,00	0.41±0.62	0.02±0.05

Nota* AN = Agar Nutritivo; AP = Agar Pseudomonas; MS = Agar Manitol Salado y MUG = Agar Bilis Rojo Violeta con MUG; CM0 = Células Madre dosis 0; CM1 = Células Madre dosis 1; CM2 = Células Madre dosis 2; CM3 = Células Madre dosis 3; M0 = Terapia Mitocondrial dosis 0; M1 = Terapia Mitocondrial dosis 1; M2 = Terapia Mitocondrial dosis 2; M3 = Terapia Mitocondrial dosis 3.

De acuerdo con las características fenotípicas en los tres medios de cultivo selectivos se identificaron morfologías circulares e irregulares cuyos colores cambian según el medio de cultivo empleado: en Agar Manitol Salado se observaron colonias rosadas y amarillas, en Agar Pseudomonas colonias blancas y en Agar Bilis Rojo Violeta con MUG colonias rojo violetas y café (Tabla 9.). El análisis morfológico sugiere la presencia de los tres patógenos en estudio y que la carga microbiana por especie puede estar cambiando de acuerdo al tratamiento o dosis aplicado (Tabla 8.) (Bilgen et al., 2019; Kim et al., 2020).

Tabla 9.

Identificación fenotípica de las UFC de las especies bacterianas patógenas en estudio

Muestra	Medio de cultivo			
	AN	AP	MS	MUG
CTRL				
M2				

Nota* Crecimiento de UFC de las muestras control (CTRL) y tratamiento con $5,0 \times 10^2$ ng/ul de mitocondrias (M2) de acuerdo a su morfología y color en medio de cultivo general agar nutritivo (AN), y en medios selectivos: agar pseudomonas (AP), agar manitol salado (MS) y agar Bilis Rojo Violeta con MUG (MUG).

4.1.1 Hidrogel

Con el tratamiento de hidrogel no se observó crecimiento de las especies bacterianas en estudio (Tabla 8.), posiblemente porque estos hidrogeles estaban compuestos por polihexametileno biguanida (PHBM); que actúa como un potente agente antimicrobiano. Este agente puede eliminar células bacterianas presentes en la herida formando así una especie de barrera antibacteriana, que evita que el proceso de cicatrización sea interrumpido por la invasión de patógenos (Griffin et al., 2021).

4.1.2 Células Madre

Se reportó escasas colonias de *E. coli* con el tratamiento de células madre (Tabla 8.), esto podría deberse a que las células madre poseen actividad antimicrobiana directa contra *E. coli* al secretar el péptido antimicrobiano del grupo de catelicidina LL-37, que inhibe la activación del lipopolisacárido (LPS) de su membrana externa (Yagi et al., 2020). Estos resultados se relacionan con el estudio de Choi et al. (2017) en donde concluyó que la actividad antimicrobiana de LL-37 depende de la concentración de células bacterianas y de células madre, ya que si la concentración bacteriana es superior a la concentración de LL-37 secretada por las células madre disminuye su eficacia antimicrobiana. Se observó un comportamiento similar con lo reportado por Choi et al. (2017) con la especie bacteriana *P. aeruginosa* (Tabla 8.), que también es Gram negativa, debido a que los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, como el QS y la secreción de proteasas, disminuyen el efecto de LL-37 (Sol et al., 2014; Stempel et al., 2013).

La presencia y crecimiento de *S. aureus* obtenido de las muestras sometidas al tratamiento de células madre tuvo una influencia dosis dependiente. En la dosis CM1 se observó crecimiento con una media de $0.64 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, en la dosis CM2 de $0.57 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ y en la dosis CM3 de $0.46 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$. *S. aureus* aprovecha los estados inflamatorios prolongados para generar patogenicidad por lo que al aplicar células madre para disminuir este estado también se reduce la probabilidad de que sus colonias proliferen. Además, LL-37 es más retardada en bacterias Gram positivas, debido a la diferencia en la estructura de su pared celular (Nagaoka et al., 2020).

4.1.3 Mitocondrias

Con la terapia mitocondrial se observó crecimiento de *E. coli* en la dosis M1 con una media de $0.04 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$, en la dosis M2 de $0.27 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ y en la dosis M3 de $0.75 \log\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$. La dosis con menor crecimiento fue la dosis que

llevó menor concentración mitocondrial (M1), este efecto del tratamiento se produce posiblemente porque las mitocondrias secretan ROS para promover la proliferación celular, con fines de regeneración de tejidos. Estas moléculas tienen efectos antibacterianos directos en Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Kawano et al., 2020), tal como ocurre con los resultados obtenidos con la dosis de $2,5 \times 10^2$ ng/ μ l.

Sin embargo, al duplicar la dosis (M2) se observó un aumento de colonias (Tabla 8.). Debido a que al elevar la concentración de mitocondrias se producen daños en los queratinocitos, fibroblastos y las células de Langerhans, lo cual evita que la fase de proliferación culmine y beneficia el crecimiento de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, al triplicar la dosis (M3) se observó que el número de colonias fue mayor posiblemente porque tanto *E. coli* y *P. aeruginosa* poseen mecanismos de control de estrés oxidativo para resistir el ataque de las ROS. Aunque, *E. coli* posee mayor ventaja para mantener su crecimiento debido a que en la piel existe mayor concentración bacteriana al ser parte de las especies más representativas de la microbiota comensal (Kim y Park, 2019; Janda et al., 2016; Kawano et al., 2020; Da Cruz Nizer et al., 2021).

La actividad antibacteriana mitocondrial fue menos eficaz con *S. aureus*, en donde con la dosis M1 se produjo un crecimiento con una media de $0.34 \log\text{UFC.ml}^{-1}.\text{mm}^{-2}$, en la dosis M2 de $0.68 \log\text{UFC.ml}^{-1}.\text{mm}^{-2}$ y en la dosis M3 de $1.13 \log\text{UFC.ml}^{-1}.\text{mm}^{-2}$. Esto pudo ocurrir debido a que *S. aureus* utiliza un mecanismo de control de estrés oxidativo que es la modulación de la tasa de crecimiento bacteriana. En donde detiene su crecimiento y pasa desapercibido por el ataque de las células inmunitarias y ROS (Buvelot et al., 2021).

4.1.4 Control Herida

En las muestras control (herida sin tratamiento) se aislaron las tres especies bacterianas patógenas en estudio (Tabla 8.). Los resultados concuerdan con investigaciones sobre especies bacterianas patógenas presentes en ratones, las cuáles son *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Proteobacterias* spp. y *Corinebacterium* spp., siendo *S. aureus* y *P. aeruginosa* los grupos bacterianos más representativos. Estas bacterias aprovechan ambientes idóneos donde la integridad de la piel se ve comprometida e inducen infecciones que retrasan la cicatrización (Tavakkol et al., 2010).

4.1.5 Piel Sana

Los resultados obtenidos al realizar el cultivo de piel sana sin herida ni tratamientos indican una media de crecimiento de $0.41 \log\text{UFC.ml}^{-1}.\text{mm}^{-2}$ para *S. aureus* y $0.02 \log\text{UFC.ml}^{-1}.\text{mm}^{-2}$ para *E. coli*. La presencia de *P. aeruginosa* en piel sana fue nula, lo cual concuerda con los datos obtenidos por Tavakkol et al., (2010) en donde no se detectó la presencia de *Pseudomonas* spp., probablemente por la ubicación geográfica o anatómica de la biopsia de piel.

4.2 Detección molecular de especies bacterianas

4.2.1 Detección de la presencia de *E. coli*

Al analizar 77 biopsias de herida de piel obtenidas del lomo de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización, se identificaron presuntamente en 13 biopsias la presencia de *E. coli* mediante métodos microbiológicos en base a la morfología colonial en agar de bilis rojo violeta con MUG (Tabla 10.). La presencia de *E. coli* en las biopsias se confirmó mediante la amplificación con PCR del gen *uidA*. Las biopsias que reportaron bandas de 147 pb en el proceso de electroforesis fueron registradas como positivas para la presencia de *E. coli*.

Lasalde et al. (2005) expone la importancia de la utilización del gen *uidA* para la identificación de *E. coli*, ya que es la única especie bacteriana dentro de las enterobacterias que posee dicho gen. Además, posee estabilidad enzimática y la alta sensibilidad para la detección cualitativa y cuantitativa. De igual manera, Feng y Lampel (1994), y Acton (2013) expresan que el método de detección por PCR del gen *uidA* detecta presencia de *E. coli* que no pudo ser observada mediante la morfología colonial en el medio de cultivo con el sustrato definido basado en MUG.

Tabla 10.

Presencia de S. aureus en muestras de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.

Terapia	N° de muestras	N° de muestras positivas en placa	N° de muestras positivas PCR
M0(0 ng/μl)	6	1	1

M1(2,5 x10² ng/μl)	8	1	1
M2(5,0 x10² ng/μl)	8	3	3
M3(1,0 x10³ ng/μl)	8	2	2
CM0(0 cel/μl)	5	0	0
CM1 (2,5 x10⁴ cel/μl)	7	2	2
CM2 (5,0 x10⁴ cel/μl)	7	0	0
CM3 (1,0 x10⁵ cel/μl)	6	0	0
Hidrogel	4	0	0
Control	18	4	4

Nota* *Las muestras que resultaron positivas en crecimiento sobre agar, fueron confirmadas por mecanismos moleculares.*

Como se observa en la Figura 6., la presencia de bandas con un tamaño de 147pb confirma que el crecimiento en placa fue positivo para *E. coli* en: biopsias sometidas a la terapia mitocondrial en las dosis M0(carril 11), M1(carril 10), M2(carril 6,7,12), y M3 (carril 13,14); en biopsias sometidas al tratamiento de células madre en las dosis CM1 (carril 4) y en biopsias control (carril 15,16). Además, se confirma ausencia de bandas de ADN en biopsias sometidas al tratamiento de células madre en la dosis CM0 (carril 1,2), CM2 (carril 3), CM3 (carril 5) y en biopsias sometidas al tratamiento de hidrogel (carril 8,9).

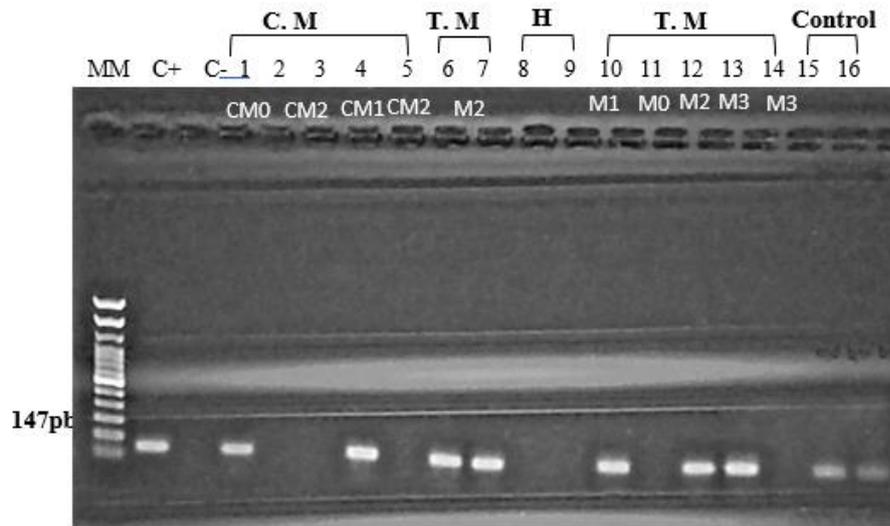


Figura 6. Amplificación del gen *uidA* de la especie bacteriana *E. coli* en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.

Nota* T.M = Terapia mitocondrial; CM = Células madre; H = hidrogel.

4.2.2 Detección de *S. aureus*

Al analizar 77 biopsias de herida de piel obtenidas del lomo de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización, se identificaron presuntivamente en 42 biopsias la presencia de *S. aureus* mediante métodos morfológicos en base a la morfología colonial en agar manitol salado (Tabla 11.). La presencia de *S. aureus* en las biopsias se confirmó mediante la amplificación con PCR del gen *nucA*. Las biopsias que reportaron una banda de ADN de 154pb en el proceso de electroforesis fueron registradas como positivas para la presencia *S. aureus*. El gen *nucA* es utilizado como un gen reportero y como criterio de diagnóstico de esta especie, ya que codifica a la enzima termonucleasa (TNase), que es producida por todas las cepas de *S. aureus* (Hamdan-Partida et al., 2015).

Parlet et al.(2019) afirma que la utilización del gen *nucA* permite la detección directa de *S. aureus* en bajas concentraciones de bacterias o productos bacterianos. Puesto que el gen *nucA* fue sensible y específico para la identificación de *S. aureus* en comparación con el cultivo tuvo una concordancia global del 93,1% y una sensibilidad y especificidad del 93,5% y 93,0%, respectivamente.

Tabla 11.

Presencia de S. aureus en biopsias de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.

Terapia	N° de muestras	N° de muestras positivas en placa	N° de muestras positivas en PCR
M0(0 ng/μl)	6	5	5
M1(2,5 x10² ng/μl)	8	3	3
M2(5,0 x10² ng/μl)	8	6	6
M3(1,0 x10³ ng/μl)	8	5	5
CM0((0 cel/μl)	5	1	1
CM1 (2,5 x10⁴ cel/μl)	7	6	6
CM2 (5,0 x10⁴ cel/μl)	7	2	2
CM3 (1,0 x10⁵ cel/μl)	6	0	0
Hidrogel	4	1	1
Control	18	13	13

Nota* *Las muestras que resultaron positivas en crecimiento sobre agar, fueron confirmadas por mecanismos moleculares.*

Como se observa en la Figura 7., la presencia de bandas con un tamaño de 154pb confirma que el crecimiento en placa fue positivo para *S. aureus* en: biopsias sometidas a la terapia mitocondrial en las dosis M0, M1, M2, y M3 (carril 4 ,5,6,7, respectivamente); en biopsias sometidas al tratamiento de células madre en las dosis CM0, CM1 (carril 11), CM2 (carril 9); en biopsias sometidas al tratamiento de hidrogel (carril 3) y en biopsias control (carril 1,2). Además, se confirma ausencia de bandas de ADN en biopsias sometidas al tratamiento de células madre en la dosis CM3 (carril 8,10).

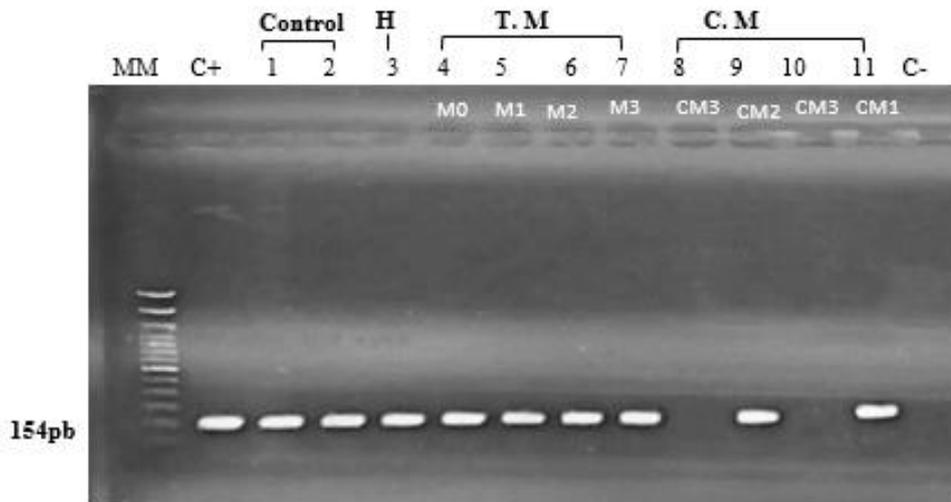


Figura 7. Amplificación del gen *nuA* de la especie bacteriana *S. aureus* en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.

Nota* T.M = Terapia mitocondrial; CM = Células madre; H = hidrogel.

4.2.3 Detección molecular de *P. aeruginosa*

Al analizar 77 biopsias de herida de piel obtenidas del lomo de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización, se determinó presuntivamente en 7 biopsias la presencia de *P. aeruginosa* mediante métodos morfológicos en base a la morfología colonial en agar *Pseudomonas* (Tabla 12.). La presencia de *P. aeruginosa* en las biopsias se confirmó mediante la amplificación del gen *lasR*. Las biopsias que reportaron bandas de 195pb en el proceso de electroforesis fueron registradas como positivas para la presencia de *P. aeruginosa*. El gen *lasR* representa una de las regiones altamente conservadas en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* y actúa como un regulador maestro que activa la expresión del sistema Rhl y señal de quinolonas de *Pseudomonas* (PQS). El patógeno oportunista *P. aeruginosa* contiene dos sistemas quorum sensing (QS), *las* y *rhl*, siendo el primero el sistema QS mejor caracterizado en este microorganismo (Venturi, 2006; Elnegery et al., 2021).

Después, de la identificación molecular el número de biopsias positivas aumentó, dando como resultado un total de 36 biopsias positivas para la presencia de *P. aeruginosa*. Deschaght et al. (2011) en su estudio presentó resultados de muestras positivas para PCR y negativas para cultivo, llegando a la conclusión de considerar los resultados de los dos métodos de identificación para dar un diagnóstico; puesto que en concentraciones bajas de células bacteriana el método de microbiología de identificación morfológica colonial

presenta falsos negativos. Así mismo, Spilker et al. (2004) en su estudio evidenció que las pruebas fenotípicas habían identificado erróneamente varios aislamientos y sugiere determinar cuáles son los costos-beneficios de realizar tanto el cultivo como la PCR para la utilización de los métodos de identificación y maximizar la sensibilidad de la detección temprana de *P. aeruginosa*.

Tabla 12.

Presencia de S. aureus en biopsias de piel de ratones sometidas a diferentes tratamientos de cicatrización.

Terapia	N° de muestras	N° de muestras positivas en placa	N° de muestras positivas PCR
M0(0 ng/μl)	6	0	1
M1(2,5 x10² ng/μl)	8	0	1
M2(5,0 x10² ng/μl)	8	1	2
M3(1,0 x10³ ng/μl)	8	0	0
CM0((0 cel/μl)	5	0	4
CM1 (2,5 x10⁴ cel/μl)	7	1	6
CM2 (5,0 x10⁴ cel/μl)	7	0	4
CM3 (1,0 x10⁵ cel/μl)	6	0	1
Hidrogel	4	1	3
Control	18	4	14

Como se observa en la Figura 8., la presencia de bandas con un tamaño de 195pb confirma que el crecimiento en placa fue positivo para *P. aeruginosa* en: biopsias sometidas a la terapia mitocondrial en las dosis M0 (carril 6), M1 (carril 7,8), M2(carril 9); en biopsias sometidas al tratamiento de células madre en las dosis CM0 (carril 10,11), CM1 (carril 12,13), CM2 (carril 14,15), CM3 (carril 16); en biopsias sometidas al tratamiento de hidrogel (carril 4,5) y en biopsias control (carril 1,2,3). Además, se confirma ausencia de bandas de ADN en biopsias sometidas a la terapia mitocondrial en la dosis M3.

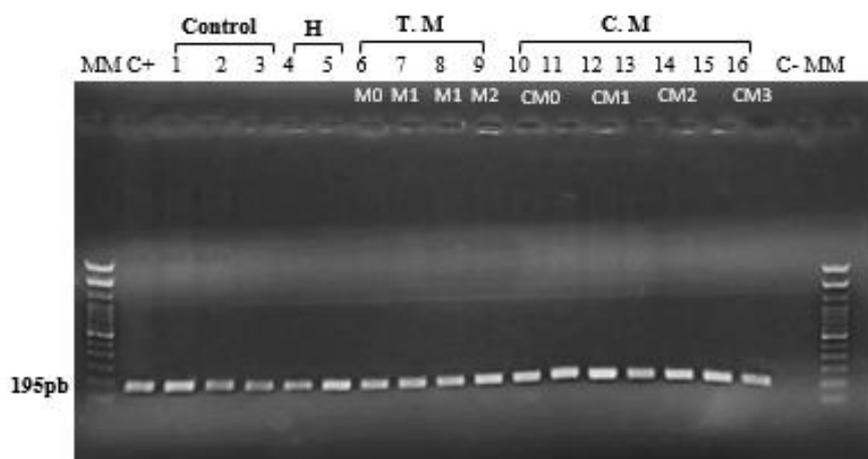


Figura 8. Amplificación del gen *lasR* de la especie bacteriana *P. aeruginosa* en biopsias de heridas de piel de ratones sometidos a tratamientos para la cicatrización.

Nota* T.M = Terapia mitocondrial; CM = Células Madre; H corresponde a hidrogel.

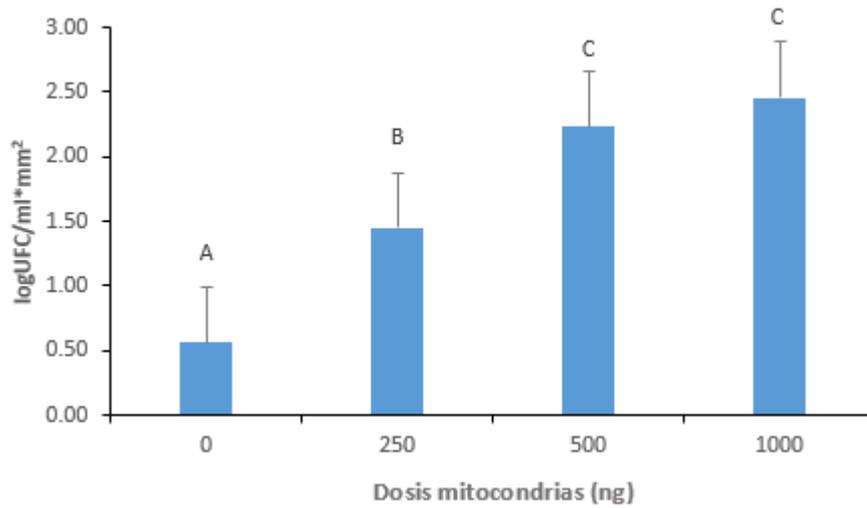
4.3 Contraste del tratamiento mitocondrial con otros tratamientos convencionales

4.3.1 Dosis más efectiva del tratamiento mitocondrial y de células madre

Al contrastar mediante prueba de Tukey únicamente las dosis del tratamiento mitocondrial, se obtuvo en el medio Agar Nutritivo ($P < 0.0001$) que la dosis con menor crecimiento bacteriano fue M1, (Figura 9A.). Al analizar las tres dosis M1, M2 y M3 se obtuvo también que, con una concentración de $1,0 \times 10^2$ ng/ul la proliferación tanto de microorganismos patógenos como comensales que intervienen en el proceso de cicatrización incrementa (Figura 9A.).

Los resultados obtenidos del contraste con tratamiento de células madre en Agar Nutritivo ($P = 0.016$). Indican que, con una concentración mayor el número de microorganismos presentes en la herida disminuye y, al contrario, si la dosis aplicada es baja, el recuento de UFC aumenta (Figura 10B.). La dosis que presentó menor crecimiento fue CM3.

A



B

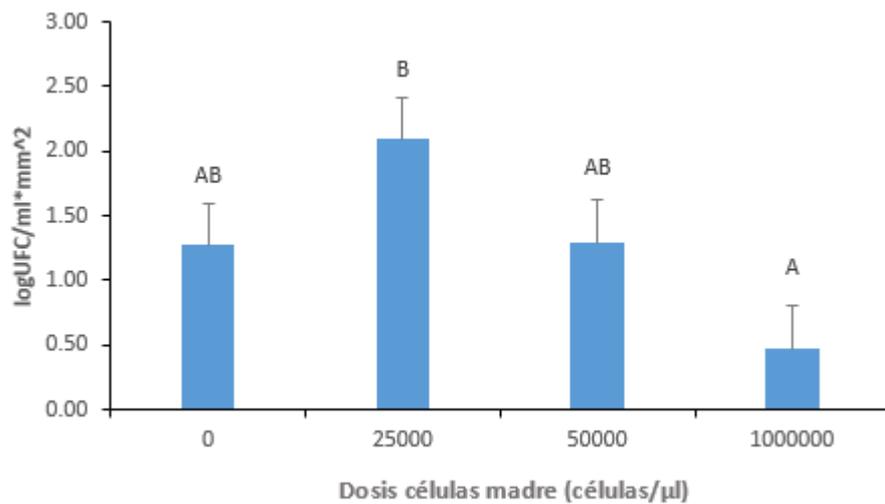


Figura 9. Efectividad de distintas dosis del tratamiento mitocondrial y células madre en el medio Agar Nutritivo.

Nota* (A) Terapia mitocondrial = Dosis 0 (M0), Dosis 250 ng/µl (M1); Dosis (M2) 500 ng/µl y Dosis 1000 ng/µl(M3); (B) Células madre = Dosis 0 (CM0), Dosis 25000 cel/µl (CM1); Dosis (CM2) 50000 cel /µl y Dosis 1000000 cel /µl(CM3)

4.3.2 Comparación de terapias de cicatrización de heridas

En base a la comparación de las mejores dosis del tratamiento de mitocondrias (M1) y de células madre (CM3) con el tratamiento de hidrogel y los controles (piel con herida y piel sin herida) en Agar Nutritivo, con un valor de $P=0.0002$, se determinó que la mejor terapia para reducción de microorganismos fue el hidrogel (Figura 10.).

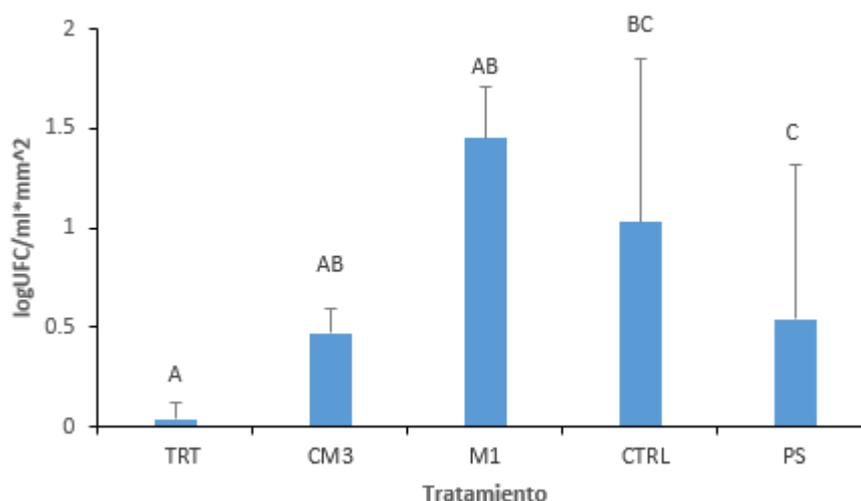


Figura 10. Contraste de la efectividad de la mejor dosis de los tratamientos para la cicatrización en el medio Agar Nutritivo.

*Nota**Mejor dosis de Tratamiento mitocondrial (M1) contra la mejor dosis de células madre (CM3), tratamiento con hidrogel (TRT), control de la herida (CTRL) y control de piel sin herida (PS).

En nuestro estudio la terapia con hidrogel disminuye el crecimiento bacteriano en la zona de la herida. Esto puede ocurrir debido a la acción del hidrogel, ya que, dependiendo de sus propiedades, actúa como antiséptico o antibiótico, reduciendo la posibilidad de una infección (Fan et al., 2021). Además, gracias a su actividad en la herida ayuda a resolver la inflamación, que es un punto crítico en el proceso de cicatrización. La acción del hidrogel debe ser evaluada tomando en cuenta su composición pues ofrece grandes ventajas, al tener la capacidad de incorporar agentes bioactivos, como células madre (Rice et al., 2013). Se compone también por agentes antimicrobianos como el polihexametileno biguanida (PHBM) cuyo mecanismo de acción se basa en generar lisis al alterar los sitios de unión de la pared bacteriana, como se muestra en la Figura 11.(Oulé et al., 2008).

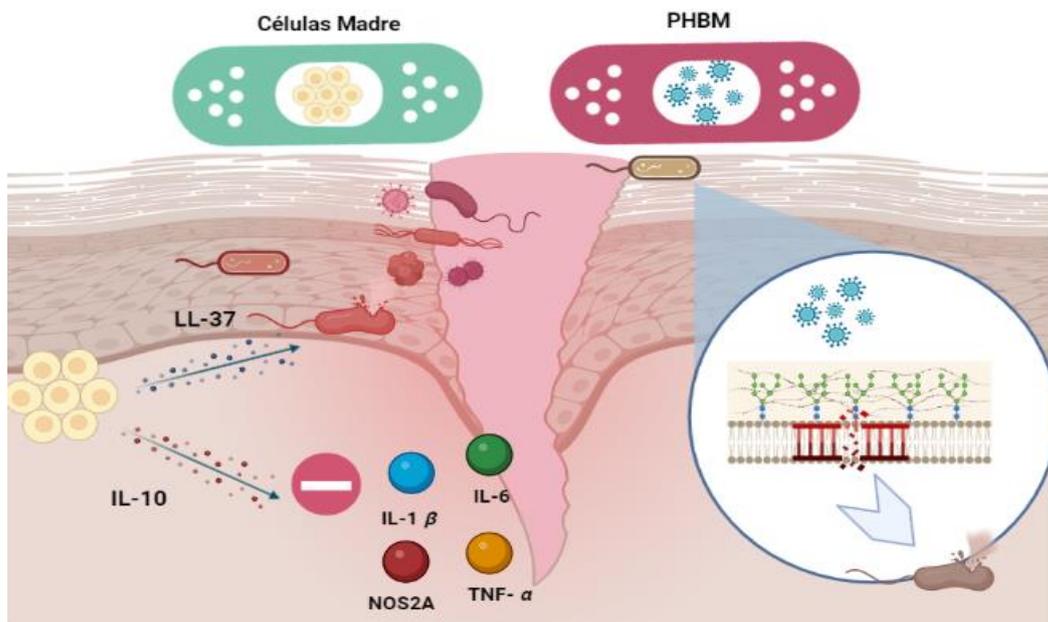


Figura 11. Mecanismo de acción de hidrogel cargado con células madre y con PHBM.

*Nota** Células madre liberan LL-37 para eliminar patógenos, además secretan IL-10 reduciendo la expresión de genes inflamatorios (IL-1 β , TNF- α , IL-6 y NOS2A). Por otro lado, PHBM genera lisis celular por alteración de la pared bacteriana.

Con el tratamiento con células madre se notó una ligera disminución del crecimiento bacteriano con la dosis CM3. Sin embargo, este tratamiento sigue siendo complejo debido a que ha sido un desafío determinar una fuente óptima, un método de procesamiento y administración desde el punto de vista clínico. Se ha visto que las células madre tienen una escasa capacidad de supervivencia en un microambiente propiciado por una herida (Veith et al., 2019; Butler et al., 2010),

Es importante tomar en cuenta que la concentración bacteriana pudo ser baja incluso en la herida, por lo que el aplicar una dosis mayor a la requerida no genera diferencias pese al potencial para la resolución del proceso de cicatrización que se atribuye a las células madre. Estas células tienen la capacidad de interactuar con el entorno de la herida y modular su actividad para secretar citosinas pro-regenerativas o péptidos antimicrobianos como LL-37; cuyo principal mecanismo es de ruptura de membrana (Nourian Dehkordi et al., 2019). En adición, las proteínas de señalización extracelular liberadas por las células madre son muy importantes durante el proceso de regeneración de tejidos ya que afectan en la actividad de otras células, acelerando o

retardando fases de la cicatrización. En una inflamación sostenida donde se inhibe la angiogénesis, las células madre secretan interleucina-10 (IL-10) que suprime la activación del factor nuclear kB (NF-kB); un regulador de la respuesta inmune, reduciendo así la expresión de genes inflamatorios como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y NOS2A. (Kanji & Das, 2017) (Figura 9.).

Al comparar la dosis M1 de mitocondrias con la dosis CM3 de células madre y TRT de hidrogel se obtuvo que M1 presenta mayor concentración presencia bacteriana (Figura 10.), además el crecimiento bacteriano aumentó cuanto mayor era la dosis mitocondrial (Figura 9A.). Tal cinética pudo ocurrir debido a que las mitocondrias en un principio actúan como una fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bilgen et al., 2019). Estas ROS en conjunto con las liberadas en el proceso de cicatrización influyen en la modificación de la concentración bacteriana, eliminando bacterias patógenas. Las ROS producen citotoxicidad gracias a su capacidad de difundirse libremente a través de la membrana microbiana (Figura 12.)(Dunnill et al., 2015).

Por otro lado, la excesiva presencia de ROS en la herida puede provocar estrés oxidativo retrasando el proceso de cicatrización, debido a que estas moléculas actúan como quimioatrayentes de fagocitos. Tal es el caso del H₂O₂ de las células epiteliales que se liberan inmediatamente después del daño tisular provocando reclutamiento de neutrófilos en la herida (Paiva y Bozza, 2014). Las ROS interactúan también con los macrófagos cuando las células moribundas finalmente pierden su membrana y liberan una gran cantidad de estas moléculas en el área extracelular, lo cual funciona como un quimioatrayente de macrófagos (Figura 12.) (Tan et al., 2016).

En esta etapa los macrófagos activados clásicamente denominados (M1) y los neutrófilos, actúan como microbicidas y proinflamatorios que expresan moléculas como TNF- α e interleucinas (IL)-6 e IL-1 β . Estas células inmunitarias engullen bacterias dentro de un fagosoma para destruirlas al generar niveles letales de ROS mediante la captación intensa de O₂ y su posterior reducción a H₂O₂ por NADPH, las ROS producidas son liberadas al medio extracelular (Figura 12.) (Tan et al., 2016). Además, los macrófagos activados clásicamente digieren fragmentos de matriz extracelular que funcionan como estimuladores de los patrones moleculares asociados al daño DAMPs, lo que exagera el estado inflamatorio de la herida (Rodrigues et al., 2019). Los macrófagos también realizan fagocitosis, que es fundamental para eliminar neutrófilos, que ya cumplieron con su

función por lo que la depuración inadecuada de neutrófilos conduce a una degradación tisular inespecífica y a un estado inflamatorio persistente (Rodrigues et al., 2019).

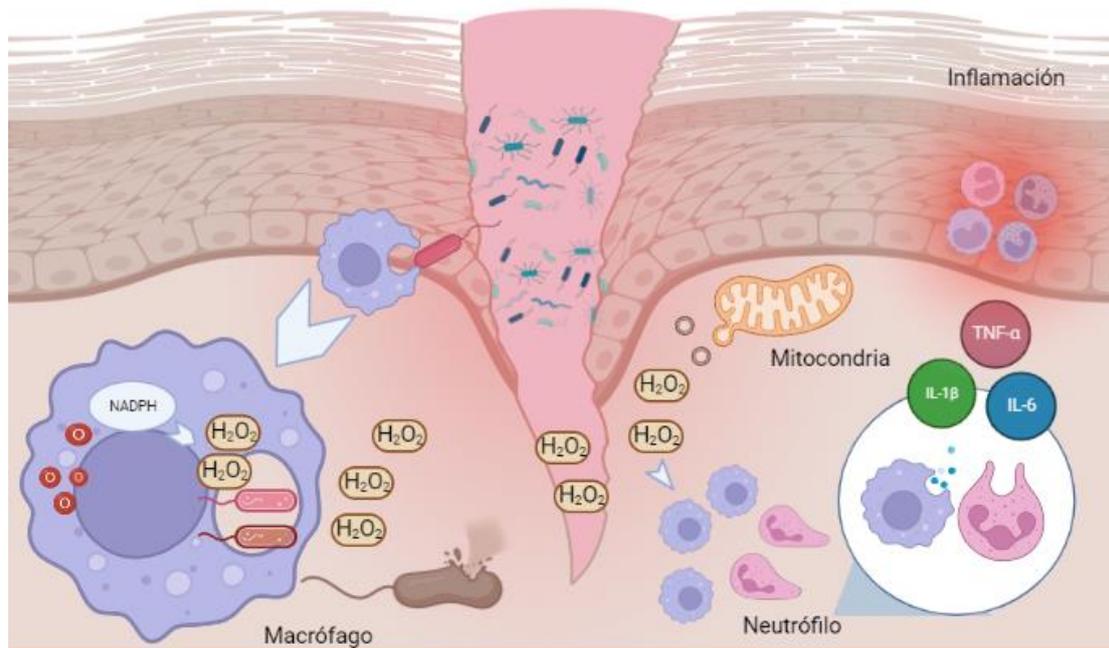


Figura 12. Mecanismo de acción de células inmunitarias y mitocondrias en la herida.

*Nota** Macrófago engulle bacterias por generación letal de ROS liberando estas moléculas al área extracelular que, en conjunto con las generadas por las mitocondrias, actúan como quimioatrayentes de células inmunitarias (macrófagos y neutrófilos). Las células inmunitarias liberan $TNF-\alpha$ e interleucinas ($IL-6$ e $IL-1\beta$) prolongando el estado inflamatorio.

La producción excesiva de ROS disminuye la diversidad del microbioma de la herida lo cual proporciona un microambiente adecuado para que las bacterias formadoras de biopelículas, como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, prosperen (Kim et al., 2020; Dunnill et al., 2017). En el caso de *S. aureus*, que fue la bacteria que mayor crecimiento presentó, se ha demostrado una alta capacidad de adquirir mutaciones que le permite la supervivencia en el tejido del huésped, especialmente en respuesta a las ROS producidas por los neutrófilos.

Las mutaciones de *S. aureus*, conocidas como variantes de colonias pequeñas deficientes en la cadena de transporte de electrones como respuesta al estrés oxidativo, parecen ser beneficiosas para este patógeno, debido a su resistencia al estrés oxidativo y a una mayor producción de catalasa, esto puede mejorar la supervivencia y la replicación de bacterias a través de desintoxicación de H_2O_2 (Painter et al., 2015).

A pesar de que en nuestro estudio el tratamiento mitocondrial no redujo la concentración microbiana, posiblemente por las dosis manejadas. Se halló que las mitocondrias participan activamente en el proceso de cicatrización, por lo que el encontrar una dosis adecuada que asegure que la generación de ROS en la herida sea ideal para el control de microorganismos patógenos; permitirá evitar infecciones y resolver de manera adecuada el proceso de cicatrización.

4.4 Manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel sometidas a tratamientos para la cicatrización.

El manual contiene metodologías, técnicas y conceptos claves para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel; información generada durante la presente investigación. El enfoque principal es la identificación de bacterias patógenas en una herida, puesto que una detección temprana es fundamental para evitar enfermedades infecciosas que compliquen la salud del paciente y el correcto proceso de cicatrización.

El contenido general de este documento se presenta a continuación en la Figura 13.

1.	INTRODUCCIÓN	5
2.	OBJETIVO	6
3.	JUSTIFICACIÓN	6
4.	SECCION 1: ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES.....	7
4.1	ESTERILIZACIÓN CALOR SECO	7
4.1.1	HORNO.....	7
4.1.2	LLAMA DIRECTA	8
4.1.3	FLAMEAR	9
4.2	ESTERILIZACIÓN CALOR HÚMEDO	10
4.2.1	ESTERILIZACIÓN MATERIAL DE VIDRIO	10
4.2.2	ESTERILIZACIÓN MEDIOS DE CULTIVO	12
4.3	ESTERILIZACIÓN POR RADIACION ULTRAVIOLETA (UV)	14
5.	SECCION 2: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	16
5.1	TIPOS DE MEDIO DE CULTIVO.....	16
5.2	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS	17

5.3	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SEMISÓLIDOS	18
5.4	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS	19
6.	SECCIÓN 3: TÉCNICAS DE MUESTREO PARA CULTIVO MICROBIANO	20
6.1	TÉCNICAS DE MUESTREO	20
6.1.1	CEPILLADO	20
6.1.2	HISOPADO	22
6.1.3	BIOPSIA	23
7.	SECCIÓN 4: MANEJO DE LA MUESTRA	26
7.1	CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	26
7.1.1	CONSERVACION A CORTO PLAZO	26
7.1.2	CONSERVACION A LARGO PLAZO	27
7.2	TRANSPORTE	28
8.	SECCIÓN 5: CULTIVO MICROBIANO	31
8.1	DILUCIONES SERIADAS	31
8.2	TIPOS DE CULTIVO EN PLACA	32
8.2.1	RECUENTO MICROBIANO	34
9.	SECCIÓN 6: TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	36
9.1	RECCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	36
9.2	ELECTROFORÉISIS EN GEL.....	38
10.	BIBLIOGRAFÍA41	

Figura 13. Contenido del manual para el análisis de bacterias patógenas en heridas de piel sometidas a tratamientos para la cicatrización.

El vínculo de acceso al documento digital es el siguiente:

[MANUAL DE CUANTIFICACIÓN BACTERIANA EN TRATAMIENTOS QUIRÚRGICOS TESIS BIO.pdf](#)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- En la terapia mitocondrial se registró una media de $1.45 \log\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$ en la dosis M1, siendo la dosis con concentración de mitocondrias con menor crecimiento con relación a las dosis M2 y M3. Mientras que la dosis sin concentración de mitocondrias M0 registró una media de $0.56 \log\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mm}^{-2}$, en la cual el crecimiento bacteriano fue menor al de la dosis M1.
- Mediante PCR convencional se comprobó que los resultados obtenidos por recuento bacteriano fueron precisos para las bacterias patógenas *E. coli* y *S. aureus*. Mientras que para la especie bacteriana patógena *P. aeruginosa* se identificó mayor presencia con los mecanismos moleculares.
- En el presente estudio se determinó que el efecto antibacteriano del tratamiento mitocondrial en especies bacterianas patógenas frente a tratamientos convencionales como el hidrogel y células madre es menos eficaz en la disminución de la concentración microbiana y de patógenos bacterianos.
- El estudio de especies bacterianas en heridas debe ser realizado como un paso previo en la aplicación de tratamientos para la cicatrización. Por lo tanto, es necesario determinar factores y situaciones que pueden interferir en el proceso. En esta investigación se aplicaron diferentes métodos y técnicas de microbiología y biología molecular para la selección de aquellos que se ajustaban a las condiciones del estudio en el manejo de tejidos en laboratorio, los cuales se encuentran plasmados en el manual.

5.2 Recomendaciones

- Continuar con los estudios de identificación y cuantificación bacteriana, para determinar la relación en la concentración de las bacterias comensales frente a bacterias patógenas.

- Realizar investigaciones sobre la influencia de los tratamientos celulares para la cicatrización de heridas (terapia mitocondrial y células madre) en bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- Evaluar otros métodos de cuantificación, como qPCR, con el fin de determinar con mayor precisión la carga bacteriana
- Utilizar métodos de identificación molecular en la rutina clínica para determinar la presencia o ausencia de especies bacterianas en heridas de piel. Con el propósito de obtener una detección más rápida, sensible y específica de las especies bacterianas que se encuentren en concentraciones bajas para ser detectadas en el cultivo en placa.
- Emplear un enfoque metagenómico para determinar grupos filogenéticos presentes en la herida y determinar la relación de la microbiota comensal con la patógena.

REFERENCIAS

- Acton, Q. A. (2013). Bastoncillos anaerobios facultativos gramnegativos; avances en investigaciones y aplicación. Tercera Edición, ScholarlyEditions™.
- Alexeyev, O. A., y Jahns, A. C. (2012). Sampling and detection of skin *Propionibacterium* acnes: Status. *Anaerobe*, 18(5), 479-483. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.07.001>
- Balsa, I. M., y Culp, W. T. N. (2015). Wound Care. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice, 45(5), 1049–1065. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009>
- Baron, J. M., Glatz, M., y Proksch, E. (2020). Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology*. <https://doi.org/10.1159/000505291>
- Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L., y Atlas, R. M. (1991). Detection of Escherichia coli and Shigella spp. In water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1013-1017.
- Belkaid, Y., y Segre, J. A. (2014). Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6212), 954–959. <https://doi.org/10.1126/science.1260144>
- Benavides Cuasapud, M. Y. (2014). *Valoración Y Curación De Heridas De Acuerdo a Hospital Marco Vinicio Iza , De La Ciudad De Lago.*
- Berg, J., Tymoczko, J., y Stryer, L. (2008). *Biochemistry*. España: Reverté S.A.
- Bessa, L., J, Pa., Mara Di Giulio, y Luigina C. (2015). “Bacterial Isolates from Infected Wounds and Their Antibiotic Susceptibility Pattern: Some Remarks about Wound Infection.” *International Wound Journal* 12 (1): 47–52. <https://doi.org/10.1111/iwj.12049>.
- Bilgen, F., Ural, A., Kurutas, E. B., y Bekerecioglu, M. (2019). The effect of oxidative stress and Raftlin levels on wound healing. *International Wound Journal*, 16(5), 1178–1184. <https://doi.org/10.1111/iwj.13177>
- Böer-Auer, A. (2018). [Relevance of biopsies for the diagnostics of infectious skin diseases]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 69(7), 550–562. <https://doi.org/10.1007/s00105-018-4202-x>

- Breslavets, M., y Lapa, T. (2019). The tangential punch biopsy. In *Dermatology online journal* (Vol. 25, Issue 12).
- Brukner, I., Longtin, Y., Oughton, M., Forgetta, V., y Dascal, A. (2015). Assay for estimating total bacterial load: relative qPCR normalisation of bacterial load with associated clinical implications. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 83(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.005>
- Buharro, S. I., y Aleanizy, F. S. (2020). Association of OprF mutant and disturbance of biofilm and pyocyanin virulence in pseudomonas aeruginosa. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ*, 28(2), 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.021>
- Bukhari, S. I., y Aleanizy, F. S. (2020). Association of OprF mutant and disturbance of biofilm and pyocyanin virulence in pseudomonas aeruginosa. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 28(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.11.021>
- Bunyaratavej, S., Pattanaprichakul, P., Leeyaphan, C., Rujitharanawong, C., Muanprasart, C., Matthapan, L., y Bunyaratavej, S. (2016). The Use of Adhesive Tapes to Transfer Skin-scrappings for Sequential Laboratory Diagnosis of Dermatophytosis. *Medical Mycology Journal*, 57(1), E9-13. <https://doi.org/10.3314/mmj.57.E9>
- Butler, K. L., Goverman, J., Ma, H., Fischman, A., Yu, Y.-M., Bilodeau, M., Rad, A. M., Bonab, A. A., Tompkins, R. G., y Fagan, S. P. (2010). Stem cells and burns: Review and therapeutic implications. *Journal of Burn Care & Research: Official Publication of the American Burn Association*, 31(6), 874-881. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181f9353a>
- Buvelot, H., Roth, M., Jaquet, V., Lozkhin, A., Renzoni, A., Bonetti, E.-J., Gaia, N., Laumay, F., Mollin, M., Stasia, M.-J., Schrenzel, J., François, P., y Krause, K.-H. (2021). Hydrogen Peroxide Affects Growth of *S. aureus* Through Downregulation of Genes Involved in Pyrimidine Biosynthesis. *Frontiers in Immunology*, 12, 673985. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.673985>
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., y Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(3), 143–155. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>

- Canesso, M. C., Vieira, A. T., Castro, T. B., Schirmer, B. G., Cisalpino, D., Martins, F. S., Rachid, M. A., Nicoli, J. R., Teixeira, M. M., y Barcelos, L. S. (2014). Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *193*(10), 5171–5180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>
- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callís, A. H., y Esnard, S. C. (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Phenotypical and Serological Characterizations of Pseudomonas Aeruginosa Clinical Isolates.*, *13*(3), 1–9. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=23130937&lang=es&site=ehost-live>
- Chen, Y. E., y Tsao, H. (2013). The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *69*(1), 143–155.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.01.016>
- Chen, Y. E., Fischbach, M. A., y Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota–host interactions. *Nature*, *553*(7689), 427–436. <https://doi.org/10.1038/nature25177>
- Chiller, K., Selkin, B. A., y Murakawa, G. J. (2001). Skin microflora and bacterial infections of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings*, *6*(3), 170–174. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>
- Cho, I., y Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Choi, H., Yang, Z., y Weisshaar, J. C. (2017). Oxidative stress induced in *E. coli* by the human antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathogens*, *13*(6), e1006481. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006481>
- Coalson, E., Bishop, E., Liu, W., Feng, Y., Spezia, M., Liu, B., Shen, Y., Wu, D., Du, S., Li, A. J., Ye, Z., Zhao, L., Cao, D., Li, A., Hagag, O., Deng, A., Liu, W., Li, M., Haydon, R. C., y Reid, R. R. (2019). Stem cell therapy for chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside. *Genes & Diseases*, *6*(4), 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.09.008>
- Cotran, R. S. (2004). *Robbins Pathologic Basis of Disease, 5th Edition*. W.B. Saunders

CompHny, Philadelphia, USA. http://dspace.agu.edu.vn:8080/handle/AGU_Library/11194

- Da Cruz Nizer, W. S., Inkovskiy, V., Versey, Z., Stempel, N., Cassol, E., y Overhage, J. (2021). Oxidative Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens10091187>
- Daeschlein, G., Napp, M., Lutze, S., von Podewils, S., Jukema, G., Fleischmann, W., Haase, H., Leitgeb, J., Ekkernkamp, A., y Assadian, O. (2016). Comparison of the effect of negative pressure wound therapy with and without installation of polyhexanide on the bacterial kinetic in chronic wounds. *Wound Medicine*, 13. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2016.02.001>
- Dash, B. C., Xu, Z., Lin, L., Koo, A., Ndon, S., Berthiaume, F., Dardik, A., y Hsia, H. (2018). Stem Cells and Engineered Scaffolds for Regenerative Wound Healing. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 5(1), E23. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5010023>
- Demyanenko, I. A., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V, Fedorov, A. V, Manskikh, V. N., ... Popova, E. N. (2017). Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Improves Dermal Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 6408278. <https://doi.org/10.1155/2017/6408278>
- Deschaght, P., Van daele, S., De Baets, F., y Vaneechoutte, M. (2011). PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *Journal of Cystic Fibrosis*, 10(5), 293–297. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.05.004>
- Dréno, B., Pécastaings, S., Corvec, S., Veraldi, S., Khammari, A., y Roques, C. (2018). *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and *acne vulgaris*: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 32 Suppl 2, 5–14. <https://doi.org/10.1111/jdv.15043>
- Drinka, P., Bonham, P., y Crnich, C. J. (2012). Swab culture of purulent skin infection to detect infection or colonization with antibiotic-resistant bacteria. *Journal of the American Medical Directors Association*, 13(1), 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2011.04.012>

- Dovi, J. V., Szpaderska, A. M., y DiPietro, L. A. (2004). Neutrophil function in the healing wound: Adding insult to injury? *Thrombosis and Haemostasis*, 92(2), 275-280. <https://doi.org/10.1160/TH03-11-0720>
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., y Georgopoulos, N. T. (2015). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: The functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89-96. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>
- Dutta, P., y Das, S. (2016). Mammalian Antimicrobial Peptides: Promising Therapeutic Targets Against Infection and Chronic Inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1), 99–129. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150703121819>
- Elbing, K. L., y Brent, R. (2019). Growth of *E. coli* on Solid Media. *Current Protocols in Molecular Biology*, 125(1), e82. <https://doi.org/10.1002/cpmb.82>
- Elnegery, A. A., Mowafy, W. K., Zahra, T. A., y Abou El-Khier, N. T. (2021). Study of quorum-sensing LasR and RhlR genes and their dependent virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from infected burn wounds. *Access Microbiology*, 3(3), 211. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000211>
- Esposito, S., Simone, G. De, Gioia, R., Noviello, S., Pagliara, D., Campitiello, N., ... Ascione, T. (2017). Deep tissue biopsy vs. superficial swab culture, including microbial loading determination, in the microbiological assessment of Skin and Soft Tissue Infections (SSTIs). *Journal of Chemotherapy*, 29(3), 154–158. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2016.1205309>
- Fan, Y., Lüchow, M., Zhang, Y., Lin, J., Fortuin, L., Mohanty, S., Brauner, A., y Malkoch, M. (2021). Nanogel Encapsulated Hydrogels As Advanced Wound Dressings for the Controlled Delivery of Antibiotics. *Advanced Functional Materials*, 31(7). <https://doi.org/10.1002/adfm.202006453>
- Feng, P., y Lampel, K. A. (1994). Genetic analysis of uidA expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology*, 140(8), 2101–2107. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-8-2101>

- Flowers, L., y Grice, E. A. (2020). The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. *Cell Host & Microbe*, 28(2), 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Śtepień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., y Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Ghannam, M. G., y Varacallo, M. (2021). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535453/>
- García González, R. F., Gago Fornell, M., Chumilla López, S., y Gaztelu Valdés, V. (2013). Abordaje de enfermería en heridas de urgencias. *Gerokomos*, 24(3), 132–138. <https://doi.org/10.4321/s1134-928x2013000300007>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1). <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>
- Grice, E. A., y Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 244-253. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>
- Grice, E. A., y Dawson, T. L. 23*Jr. (2017). Host-microbe interactions: Malassezia and human skin. *Current Opinion in Microbiology*, 40, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.024>
- Griffin, D. R., Archang, M. M., Kuan, C.-H., Weaver, W. M., Weinstein, J. S., Feng, A. C., Ruccia, A., Sideris, E., Ragkousis, V., Koh, J., Plikus, M. V., Di Carlo, D., Segura, T., y Scumpia, P. O. (2021). Activating an adaptive immune response from a hydrogel scaffold imparts regenerative wound healing. *Nature Materials*, 20(4), 560–569. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00844-w>
- Grogan, M. D., Bartow-McKenney, C., Flowers, L., Knight, S. A. B., Uberoi, A., y Grice, E. A. (2019). Research Techniques Made Simple: Profiling the Skin Microbiota. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(4), 747-752.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.01.024>

- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C. C., Bernard, F.-X., Peschanski, M., Baldeschi, C., y Waksman, G. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: A preclinical study. *Lancet (London, England)*, 374(9703), 1745-1753. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61496-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61496-3)
- Guo, S., y DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89(3), 219-229. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
- Hamdan-Partida, A., González García, S., y Bustos-Martínez, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes nucA y femB. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>
- Hernández-Navarrete, M.-J., Celorrio-Pascual, J.-M., Lapresta Moros, C., y Solano Bernad, V.-M. (2014). [Principles of antisepsis, disinfection and sterilization]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 32(10), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003>
- Hillen, U., Häusermann, P., Massi, D., Janin, A., Wolff, D., Lawitschka, A., Greinix, H., Meyer, R., y Ziemer, M. (2015). Consensus on performing skin biopsies, laboratory workup, evaluation of tissue samples and reporting of the results in patients with suspected cutaneous graft-versus-host disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(5), 948–954. <https://doi.org/10.1111/jdv.12737>
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L., y Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *The American Journal of Pathology*, 170(6), 1807–1816. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070112>
- Hogan, P. G., Rodriguez, M., Spenner, A. M., Brenneisen, J. M., Boyle, M. G., Sullivan, M. L., y Fritz, S. A. (2018). Impact of Systemic Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Colonization and Recurrent Skin Infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(2), 191–197. <https://doi.org/10.1093/cid/cix754>
- Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H., y Malhotra-Kumar, S. (2017). In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00106>

- Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., y Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Ikedda, K., Sato, S., Chigira, H., Shibuki, Y., y Hiraoka, N. (2020). Effects of the Storage Solution Type and Prolonged Storage on the Immunoreactivity of Cells. *Acta Cytologica*, 64(4), 352–359. <https://doi.org/10.1159/000503268>
- INDOT. *Protocolo de embalaje y transporte de organos, tejidos, celulas.* , Pub. L. No. Resolución 33, 1 1 (2015).
- Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R. J., y Cotsarelis, G. (2005). Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nature Medicine*, 11(12), 1351–1354. <https://doi.org/10.1038/nm1328>
- Janda, J., Nfonsam, V., Calienes, F., Sligh, J. E., y Jandova, J. (2016). Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing. *Archives of Dermatological Research*, 308(4), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1628-9>
- Johnson, T. R., Gómez, B. I., McIntyre, M. K., Dubick, M. A., Christy, R. J., Nicholson, S. E., y Burmeister, D. M. (2018). The Cutaneous Microbiome and Wounds: New Molecular Targets
- Kanji, S., y Das, H. (2017). Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. *Mediators of Inflammation*, 2017, 5217967. <https://doi.org/10.1155/2017/5217967>
- Karimzadeh, R., y Ghassab, R. K. (2022). Identification of nuc nuclease and sea enterotoxin genes in Staphylococcus aureus isolates from nasal mucosa of burn hospital staff: a cross-sectional study. *New Microbes and New Infections*, 47, 100992. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2022.100992>
- Kawano, A., Yamasaki, R., Sakakura, T., Takatsuji, Y., Haruyama, T., Yoshioka, Y., y Ariyoshi, W. (2020). Reactive Oxygen Species Penetrate Persister Cell Membranes of Escherichia coli for Effective Cell Killing. *Frontiers in Cellular*

and Infection Microbiology, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00496>

- Kilic, A., Kilic, A., Kivanc, A. E., y Sisik, A. (2020). Biopsy Techniques for Skin Disease and Skin Cancer: A New Approach. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 13(3), 251–254. https://doi.org/10.4103/JCAS.JCAS_173_19
- Kim, B. E., Goleva, E., Kim, P. S., Norquest, K., Bronchick, C., Taylor, P., y Leung, D. Y. M. (2019). Side-by-Side Comparison of Skin Biopsies and Skin Tape Stripping Highlights Abnormal Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. In *The Journal of investigative dermatology* (Vol. 139, Issue 11, pp. 2387-2389.e1). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.03.1160>
- Kim, J. H., Ruegger, P. R., Lebig, E. G., VanSchalkwyk, S., Jeske, D. R., Hsiao, A., ... Martins-Green, M. (2020). High Levels of Oxidative Stress Create a Microenvironment That Significantly Decreases the Diversity of the Microbiota in Diabetic Chronic Wounds and Promotes Biofilm Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 259. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00259>
- Knox, K. R., Datiashvili, R. O., y Granick, M. S. (2007). Surgical Wound Bed Preparation of Chronic and Acute Wounds. *Wound Surgery*, 34(4), 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2007.07.006>
- Krishna, S., y Miller, L. S. (2012). Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Microbiology*, 15(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.003>
- KrishnanNair Geetha, D., Sivaraman, B., Rammohan, R., Venkatapathy, N., y Solai Ramatchandirane, P. (2020). A SYBR Green based multiplex Real-Time PCR assay for rapid detection and differentiation of ocular bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 171, 105875. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105875>
- Krizek, T. J., y Robson, M. C. (1975). Evolution of quantitative bacteriology in wound management. *American Journal of Surgery*, 130(5), 579–584. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(75\)90516-4](https://doi.org/10.1016/0002-9610(75)90516-4)
- Lai, C. M. (2001). Basic molecular biology techniques. *Methods in Molecular Medicine*, 47, 1-30. <https://doi.org/10.1385/1-59259-085-3:1>

- Lasalde, C., Rodriguez, R., Toranzos, G. A., y Smith, H. H. (2005). Heterogeneity of uidA gene in environmental Escherichia coli populations. *Journal of Water and Health*, 3(3), 297–304. <https://doi.org/10.2166/wh.2005.041>
- Leech, J. M., Dhariwala, M. O., Lowe, M. M., Chu, K., Merana, G. R., Cornuot, C., Weckel, A., Ma, J. M., Leitner, E. G., Gonzalez, J. R., Vasquez, K. S., Diep, B. A., y Scharschmidt, T. C. (2019). Toxin-Triggered Interleukin-1 Receptor Signaling Enables Early-Life Discrimination of Pathogenic versus Commensal Skin Bacteria. *Cell Host & Microbe*, 26(6), 795-809.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.007>
- Leshem, A., Liwinski, T., y Elinav, E. (2020). Immune-Microbiota Interplay and Colonization Resistance in Infection. *Molecular Cell*, 78(4), 597-613. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.001>
- Li, J., Chen, J., y Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, 25(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>
- Linehan, J. L., Harrison, O. J., Han, S.-J., Byrd, A. L., Vujkovic-Cvijin, I., Villarino, A. V., Sen, S. K., Shaik, J., Smelkinson, M., Tamoutounour, S., Collins, N., Bouladoux, N., Dzutsev, A., Rosshart, S. P., Arbuckle, J. H., Wang, C.-R., Kristie, T. M., Rehermann, B., Trinchieri, G., y Belkaid, Y. (2018). Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. *Cell*, 172(4), 784-796.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.033>
- Losi, P., Briganti, E., Magera, A., Spiller, D., Ristori, C., Battolla, B., Balderi, M., Kull, S., Balbarini, A., Di Stefano, R., y Soldani, G. (2010). Tissue response to poly(ether)urethane-polydimethylsiloxane-fibrin composite scaffolds for controlled delivery of pro-angiogenic growth factors. *Biomaterials*, 31(20), 5336-5344. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.033>
- Lu, G., Li, T., Zhou, Z., Wang, N., Liu, S., Zhang, P., y Wang, W. (2020). Diagnostic accuracy of serum test, tissue culture, and histopathology for shoulder prosthetic joint infections: A systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthroplasty: JSES*, 30(2), 139–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.sart.2020.07.001>
- Mann-Salinas, E. A., Joyner, D. D., Guymon, C. H., Ward, C. L., Rathbone, C. R., Jones, J. A., y Akers, K. S. (2015). Comparison of Decontamination Methods for Human

- Skin Grafts. *Journal of Burn Care & Research : Official Publication of the American Burn Association*, 36(6), 636–640. <https://doi.org/10.1097/BCR.0000000000000188>
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771-776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Mendoza, R. A., Hsieh, J.-C., y Galiano, R. D. (2019). The Impact of Biofilm Formation on Wound Healing. *Wound Healing - Current Perspectives*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85020>
- Mehta, V. B., y Besner, G. E. (2007). HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 25(4), 253-263. <https://doi.org/10.1080/08977190701773070>
- Misic, A. M., Gardner, S. E., y Grice, E. A. (2014). The Wound Microbiome: Modern Approaches to Examining the Role of Microorganisms in Impaired Chronic Wound Healing. In *Advances in wound care* (Vol. 3, Issue 7, pp. 502–510). <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0397>
- Mirzadegan, E., Golshahi, H., y Kazemnejad, S. (2020). Current evidence on immunological and regenerative effects of menstrual blood stem cells seeded on scaffold consisting of amniotic membrane and silk fibroin in chronic wound. *International Immunopharmacology*, 85, 106595. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106595>
- Mohsina, K., Kaur, M., Bowman, J. P., Powell, S., y Tamplin, M. L. (2020). QPCR quantification of *Carnobacterium maltaromaticum*, *Brochothrix thermosphacta*, and *Serratia liquefaciens* growth kinetics in mixed culture. *Journal of Microbiological Methods*, 175, 105961. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105961>
- Nagaoka, I., Tamura, H., y Reich, J. (2020). Therapeutic Potential of Cathelicidin Peptide LL-37, an Antimicrobial Agent, in a Murine Sepsis Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 5973. <https://doi.org/10.3390/ijms21175973>
- Neff, J. A., Bayramov, D. F., Patel, E. A., y Miao, J. (2020). Novel Antimicrobial Peptides Formulated in Chitosan Matrices are Effective Against Biofilms of Multidrug-

- Resistant Wound Pathogens. *Military Medicine*, 185(Suppl 1), 637-643. <https://doi.org/10.1093/milmed/usz222>
- Negut, I., Grumezescu, V., y Grumezescu, A. M. (2018). Treatment Strategies for Infected Wounds. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092392>
- Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J., y Saier, M. H. J. (2000). Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 125–144.
- Nourian Dehkordi, A., Mirahmadi Babaheydari, F., Chehelgerdi, M., y Raeisi Dehkordi, S. (2019). Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 111. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>
- Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I., y Anitua, E. (2008). Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 13, 3532-3548.
- Oladeinde, B., Omoregie, R., Olley, M., Anunibe, J., y Onifade, A. (2013). A 5—Year surveillance of wound infections at a rural tertiary hospital in Nigeria. *African Health Sciences*, 13(2), 351-356. <https://doi.org/10.4314/ahs.v13i2.22>
- Oulé, M. K., Azinwi, R., Bernier, A.-M., Kablan, T., Maupertuis, A.-M., Mauler, S., Nevry, R. K., Dembélé, K., Forbes, L., y Diop, L. (2008). Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: A novel tool to fight meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and nosocomial infections. *Journal of Medical Microbiology*, 57(Pt 12), 1523-1528. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003350-0>
- Painter, K. L., Strange, E., Parkhill, J., Bamford, K. B., Armstrong-James, D., y Edwards, A. M. (2015). *Staphylococcus aureus* Adapts to Oxidative Stress by Producing H₂O₂-Resistant Small-Colony Variants via the SOS Response. *Infection and Immunity*, 83(5), 1830-1844. <https://doi.org/10.1128/IAI.03016-14>
- Parlet, C. P., Brown, M. M., y Horswill, A. R. (2019). Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends in Microbiology*, 27(6), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>

- Peterson, J. W. (1996). Bacterial Pathogenesis. En S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8526/>
- Petkovšek, Ž., Eleršič, K., Gubina, M., Žgur-Bertok, D., y Starčič Erjavec, M. (2009). Virulence Potential of Escherichia coli Isolates from Skin and Soft Tissue Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1811-1817. <https://doi.org/10.1128/JCM.01421-08>
- Powers, J. G., Higham, C., Broussard, K., y Phillips, T. J. (2016). Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 607–626. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.070>
- Prast-Nielsen, S., Tobin, A.-M., Adamzik, K., Powles, A., Hugerth, L. W., Sweeney, C., Kirby, B., Engstrand, L., y Fry, L. (2019). Investigation of the skin microbiome: Swabs vs. Biopsies. *The British Journal of Dermatology*, 181(3), 572-579. <https://doi.org/10.1111/bjd.17691>
- Requena, T., y Velasco, M. (2020). The human microbiome in sickness and in health. *Revista Clínica Española (English Edition)*. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2019.07.018>
- Ramsey, M. L., y Rostami, S. (2021). Skin Biopsy. May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29262109.
- Rice, J. J., Martino, M. M., De Laporte, L., Tortelli, F., Briquez, P. S., y Hubbell, J. A. (2013). Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), 57-71. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200197>
- Richardson, D. W., y Ahern, B. J. (2012). Chapter 85—Synovial and Osseous Infections. En J. A. Auer & J. A. Stick (Eds.), *Equine Surgery (Fourth Edition)* (pp. 1189-1201). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0867-7.00085-5>
- Ridaura, V. K., Bouladoux, N., Claesen, J., Chen, Y. E., Byrd, A. L., Constantinides, M. G., Merrill, E. D., Tamoutounour, S., Fischbach, M. A., y Belkaid, Y. (2018). Contextual control of skin immunity and inflammation by Corynebacterium. *The Journal of Experimental Medicine*, 215(3), 785–799.

<https://doi.org/10.1084/jem.20171079>

- Robson, M. C., Steed, D. L., y Franz, M. G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery*, 38(2), 72–140. <https://doi.org/10.1067/msg.2001.111167>
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., y Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Rogers, R. S., y Bhattacharya, J. (2013). When cells become organelle donors. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 28(6), 414-422. <https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2013>
- Roy, S., Santra, S., Das, A., Dixith, S., Sinha, M., Ghatak, S., ... Sen, C. K. (2020). Staphylococcus aureus Biofilm Infection Compromises Wound Healing by Causing Deficiencies in Granulation Tissue Collagen. *Annals of Surgery*, 271(6), 1174–1185. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000003053>
- Sakamoto, C., Yamaguchi, N., y Nasu, M. (2005). Rapid and Simple Quantification of Bacterial Cells by Using a Microfluidic Device. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1117-1121. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1117-1121.2005>
- Santosh, T., Kothari, K., Singhal, S. S., Shah, V. V, y Patil, R. (2018). Disseminated histoplasmosis in an immunocompetent patient - utility of skin scrape cytology in diagnosis: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13256-017-1543-5>
- Schäfer, M., y Werner, S. (2008). Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*, 58(2), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.004>
- Scharschmidt, T. C. (2017). Establishing Tolerance to Commensal Skin Bacteria: Timing Is Everything. *Basic Science Insights into Clinical Puzzles*, 35(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.07.007>
- Schierle, C. F., De la Garza, M., Mustoe, T. A., y Galiano, R. D. (2009). Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication*

- of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(3), 354-359. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00489.x>
- Schubert, S., Wieser, A., y Bonkat, G. (2017). [New microbiological techniques]. *Der Urologe. Ausg. A*, 56(6), 711–719. <https://doi.org/10.1007/s00120-017-0395-3>
- Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., y Serhan, C. N. (2007). Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*, 447(7146), 869–874. <https://doi.org/10.1038/nature05877>
- Scorza, B. M., Carvalho, E. M., y Wilson, M. E. (2017). Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>
- Serra, R., Grande, R., Butrico, L., Rossi, A., Settimio, U. F., Caroleo, B., Amato, B., Gallelli, L., y de Franciscis, S. (2015). Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(5), 605–613. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>
- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., y Selvaganapathy, P. R. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Shen, Y.-I., Cho, H., Papa, A. E., Burke, J. A., Chan, X. Y., Duh, E. J., y Gerecht, S. (2016). Engineered human vascularized constructs accelerate diabetic wound healing. *Biomaterials*, 102, 107-119. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.009>
- Shaw, T. J., y Martin, P. (2009). Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(18), 3209-3213. <https://doi.org/10.1242/jcs.031187>
- Sideris, E., Ragkousis, V., Koh, J., Plikus, M. V, Di Carlo, D., Segura, T., y Scumpia, P. O. (2021). Activating an adaptive immune response from a hydrogel scaffold imparts regenerative wound healing. *Nature Materials*, 20(4), 560–569. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00844-w>
- Sol, A., Skvirsky, Y., Nashef, R., Zelentsova, K., Burstyn-Cohen, T., Blotnick, E., Muhlrach, A., y Bachrach, G. (2014). Actin enables the antimicrobial action of LL-37 peptide in the presence of microbial proteases. *The Journal of Biological*

Chemistry, 289(33), 22926–22941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579672>

- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., y LiPuma, J. J. (2004). PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2074–2079. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2074-2079.2004>
- Stevenson, P., y Rodins, K. (2018). Improving diagnostic accuracy of skin biopsies. *Australian Journal of General Practice*, 47(4), 216–220. <https://doi.org/10.31128/AFP-10-17-4376>
- Strepel, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O., Brenner-Weiss, G., y Overhage, J. (2013). Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, 8(12), e82240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082240>
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., y Feng, Y. (2016). The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2795090. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090>
- Tavakkol, Z., Samuelson, D., deLancey Pulcini, E., Underwood, R. A., Usui, M. L., Costerton, J. W., James, G. A., Olerud, J. E., y Fleckman, P. (2010). Resident Bacterial Flora in the Skin of C57BL/6 Mice Housed under SPF Conditions. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 49(5), 588-591.
- Theelen, B., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Bassukas, I. D., Boekhout, T., y Dawson, T. L. J. (2018). *Malassezia* ecology, pathophysiology, and treatment. *Medical Mycology*, 56(suppl_1), S10–S25. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx134>
- Thuenauer, R., Landi, A., Trefzer, A., Altmann, S., Wehrum, S., Eierhoff, T., Diedrich, B., Dengjel, J., Nyström, A., Imberty, A., y Römer, W. (2020). The *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecB Causes Integrin Internalization and Inhibits Epithelial Wound Healing. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.03260-19>
- Tipton, C. D., Sanford, N. E., Everett, J. A., Gabriliska, R. A., Wolcott, R. D., Rumbaugh, K. P., y Phillips, C. D. (2019). Chronic wound microbiome colonization on mouse

- model following cryogenic preservation. *PLoS ONE*, *14*(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221565>
- Tomic-Canic, M., Burgess, J. L., O'Neill, K. E., Strbo, N., & Pastar, I. (2020). Skin Microbiota and its Interplay with Wound Healing. *American Journal of Clinical Dermatology*, *21*(Suppl 1), 36–43. <https://doi.org/10.1007/s40257-020-00536-w>
- Veith, A. P., Henderson, K., Spencer, A., Sligar, A. D., & Baker, A. B. (2019). Therapeutic Strategies for Enhancing Angiogenesis in Wound Healing. *Advanced drug delivery reviews*, *146*, 97-125. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.010>
- Velnar, T., Bailey, T., y Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research*, *37*(5), 1528–1542. <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in Pseudomonas. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 274–291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012>
- Wagner, S., Sommer, R., Hinsberger, S., Lu, C., Hartmann, R. W., Empting, M., y Titz, A. (2016). Novel Strategies for the Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*(13), 5929-5969. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01698>
- Wei, Q., Zhang, Z., Luo, J., Kong, J., Ding, Y., Chen, Y., y Wang, K. (2019). Insulin treatment enhances pseudomonas aeruginosa biofilm formation by increasing intracellular cyclic di-GMP levels, leading to chronic wound infection and delayed wound healing. *American Journal of Translational Research*, *11*(6), 3261-3279.
- Wilhelm, K.-P., Wilhelm, D., y Bielfeldt, S. (2017). Models of wound healing: an emphasis on clinical studies. *Skin Research and Technology : Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, *23*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1111/srt.12317>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, *10*(9), 200223. <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Yagi, H., Chen, A. F., Hirsch, D., Rothenberg, A. C., Tan, J., Alexander, P. G., y Tuan, S. H. (2019). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, *9*(12), 190223. <https://doi.org/10.1098/rsob.190223>

- R. S. (2020). Antimicrobial activity of mesenchymal stem cells against *Staphylococcus aureus*. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), 293. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01807-3>
- Zhang, J., Guan, J., Niu, X., Hu, G., Guo, S., Li, Q., Xie, Z., Zhang, C., y Wang, Y. (2015). Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of Translational Medicine*, *13*, 49. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0417-0>
- Zhao, R., Liang, H., Clarke, E., Jackson, C., y Xue, M. (2016). Inflammation in Chronic Wounds. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17122085>
- Zomer, H. D., y Trentin, A. G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of dermatological science*, *90*(1), 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de lectura de placas microbiana.

Código	Área	Conteo de colonias		Morfología
		N.º UFC	UFC/ml*mm ²	

Anexo 2. Identificación de las especies bacterianas del cultivo en placa y PCR.

Muestras	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	Positivas en cultivo en placa	Positivas en PCR	Positivas en cultivo en placa	Positivas en PCR	Positivas en cultivo en placa	Positivas en PCR
CTRL C1	-	-	+	+	+	-
CTRL D1	-	-	+	+	-	+
CTRL E1	-	-	-	-	-	+
CTRL F1	-	-	-	-	-	-
CTRL G1	-	-	-	-	-	-
CTRL CM A1	+	+	+	+	-	+
CTRL CM B1	+	+	+	+	-	+
CTRL CM C	-	-	+	+	-	+
CTRL CM D	-	-	+	+	-	+
CTRL CM E	-	-	-	-	-	+
CTRL CM F	-	-	+	+	-	+
CTRL M A	-	-	+	+	-	-
CTRL M B	-	-	+	+	-	+
CTRL M C	-	-	+	+	-	+
CTRL M D	-	-	+	+	+	+
CTRL M E	+	+	+	+	+	+
CTRL M F	+	+	+	+	+	+

TRT C1	-	-	+	+	-	+
TRT D1	-	-	-	-	-	+
TRT E1	-	-	-	-	-	-
TRT F1	-	-	-	-	-	+
CM0 A 1	-	-	+	+	-	+
CM0 B 1	-	-	-	-	-	-
CM0 C	-	-	-	-	-	+
CM0 D	-	-	-	-	-	+
CM0 E	-	-	-	-	-	+
CM1 A1	-	-	+	+	-	+
CM1 B1	-	-	+	+	-	+
CM1 C	-	-	+	+	-	+
CM1 D	-	-	+	+	-	+
CM1 E	-	-	+	+	-	+
CM1 F	-	-	-	-	-	+
CM2 A1	+	+	+	+	+	+
CM2 B1	-	-	+	+	-	+
CM2 C	-	-	-	-	-	-
CM2 D	+	+	-	-	-	+
CM2 E	-	-	-	-	-	-
CM 3A1	-	-	-	-	-	-
CM3 B	-	-	-	-	-	+
CM3 C	-	-	+	+	-	+
CM3 D	-	-	+	+	-	-
M0 A	-	-	-	-	-	-
M0 B	-	-	+	+	-	-
M0 C	+	+	+	+	-	-
M0 D	-	-	+	+	-	-
M0 E	-	-	+	+	-	+

M0 F	-	-	+	+	-	-
M1 A	-	-	-	-	-	+
M1 B	-	-	+	+	-	-
M1 C	-	-	-	-	-	-
M1 D	-	-	-	-	-	-
M1 E	-	-	+	+	-	-
M1 F	+	+	+	+	-	-
M2 A	-	-	+	+	-	-
M2 B	-	-	+	+	-	-
M2 C	+	+	+	+	+	+
M2 D	-	-	+	+	-	-
M2 E	+	+	+	+	-	+
M2 F	+	+	+	+	-	-
M3 A	+	+	+	+	-	-
M3 B	-	-	-	-	-	-
M3 C	-	-	+	+	-	-
M3 D	-	-	+	+	-	-
M3 E	-	-	+	+	-	-
M3 F	+	+	+	+	-	-

Anexo 3. Resultados de la prueba de Tukey para las dosis de la terapia mitocondrial en el medio Agar Nutritivo.

Dosis	Media	n	E. E	
0	0.56	8	0.07	A
250	1.45	8	0.07	B
500	2.23	8	0.07	C
1000	2.46	8	0.07	C

Anexo 4. Resultados de la prueba de Tukey para las dosis de la terapia mitocondrial en el medio Agar Pseudomonas.

Dosis	Media	n	E.E.
0	0.00	8	0.07 A
250	0.00	8	0.07 A
500	0.07	8	0.07 A
1000	0.20	8	0.07 A

Anexo 5. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia mitocondrial en el medio Manitol Salado.

Dosis	Media	n	E.E.
250	0.34	8	0.22 A
0	0.36	8	0.22 A
500	0.68	8	0.22 A
1000	1.13	8	0.22 A

Anexo 6. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia mitocondrial en el medio MUG.

Dosis	Media	n	E.E.
0	0.00	8	0.19 A
250	0.04	8	0.19 A B
500	0.27	8	0.19 A B
1000	0.75	8	0.19 B

Anexo 7. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Agar Nutriente.

Dosis	Medias	n	E.E.
1000000	0.47	6	0.34 A
0	1.27	6	0.34 A B
50000	1.29	6	0.34 A B
25000	2.09	6	0.30 B

Anexo 8. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Agar Pseudomonas.

Dosis	Medias	n	E.E.
0	0.00	6	0.05 A
25000	0.00	8	0.04 A
1000000	0.00	6	0.05 A
50000	0.15	6	0.05 A

Anexo 9. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio Manitol Salado.

Dosis	Medias	n	E.E.
0	0.42	6	0.31 A
1000000	0.46	6	0.31 A
50000	0.57	6	0.31 A
25000	0.64	8	0.27 A

Anexo 10. Resultados de la prueba de Tukey para las distintas dosis de la terapia con células madre en el medio MUG.

Dosis	Medias	n	E.E.
1000000	0.00	6	0.09 A
0	0.00	6	0.09 A
25000	0.00	8	0.08 A
50000	0.29	6	0.09 A

Anexo 11. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Nutriente.

Terapia	Medias	n	E.E.
1	0.04	10	0.21 A
11	0.40	9	0.27 A B

5	0.47	6	0.27	A B
10	1.03	28	0.12	B C
7	1.45	8	0.23	C

Nota* Terapia (1): Hidrogel, Terapia (11): Piel Sana, Terapia (5): Células Madre con dosis CM3, Terapia (10): Control con herida, Terapia (7): Mitocondrias con la dosis M1.

Anexo 12. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Pseudomonas.

Terapia	Medias	n	E.E.
7	0.00	8	0.09 A
3	0.00	8	0.09 A
1	0.00	10	0.08 A
11	0.00	9	0.10 A
10	0.11	28	0.05 A

Nota* Terapia (1): Hidrogel, Terapia (11): Piel Sana, Terapia (5): Células Madre con dosis CM3, Terapia (10): Control con herida, Terapia (7): Mitocondrias con la dosis M1.

Anexo 13. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Manitol Salado.

Terapia	Medias	n	E.E.
1	0.00	10	0.18 A
11	0.30	9	0.23 A
7	0.34	8	0.20 A
10	0.39	28	0.11 A
5	0.46	6	0.23 A

Nota* Terapia (1): Hidrogel, Terapia (11): Piel Sana, Terapia (5): Células Madre con dosis CM3, Terapia (10): Control con herida, Terapia (7): Mitocondrias con la dosis M1.

Anexo 14. Resultados de la prueba de Tukey para la comparación de las mejores dosis de cada tratamiento en el medio Agar Bilis Rojo Violeta con MUG.

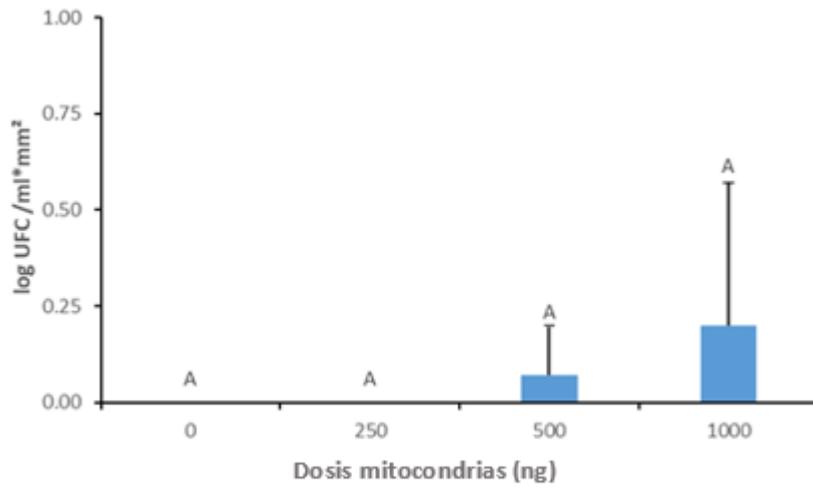
Terapia	Medias	n	E.E.
5	0.00	6	0.17 A
1	0.00	10	0.13 A
11	0.01	9	0.17 A

7	0.04	8	0.14 A
10	0.31	28	0.08 A

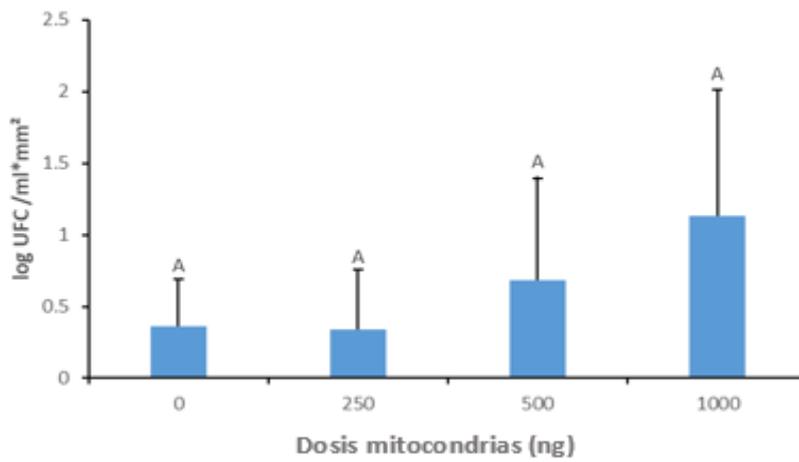
Nota* Terapia (1): Hidrogel, Terapia (11): Piel Sana, Terapia (5): Células Madre con dosis CM3, Terapia (10): Control con herida, Terapia (7): Mitocondrias con la dosis M1.

Anexo 15. Efectividad de distintas dosis del tratamiento mitocondrial

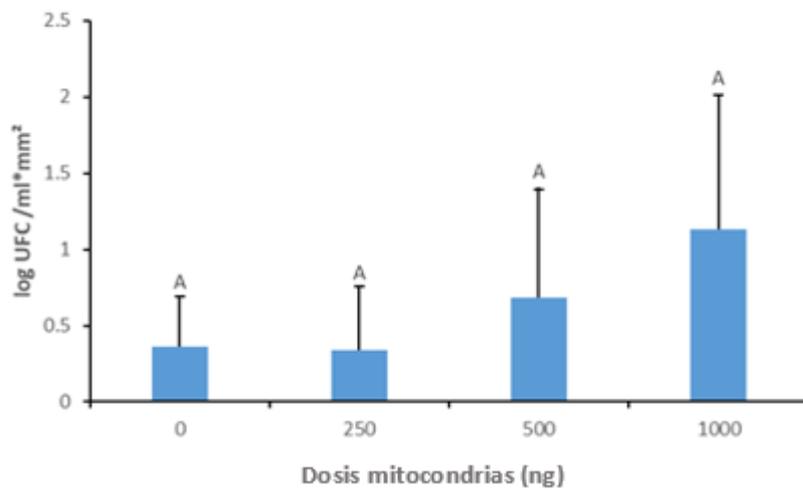
A



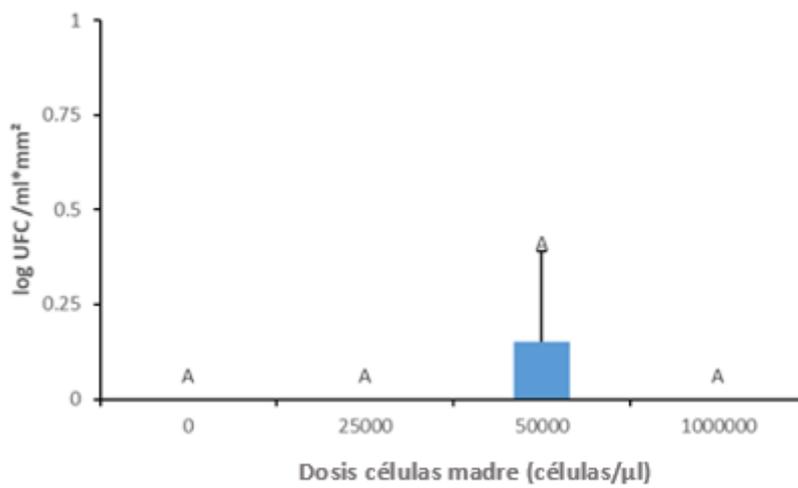
B



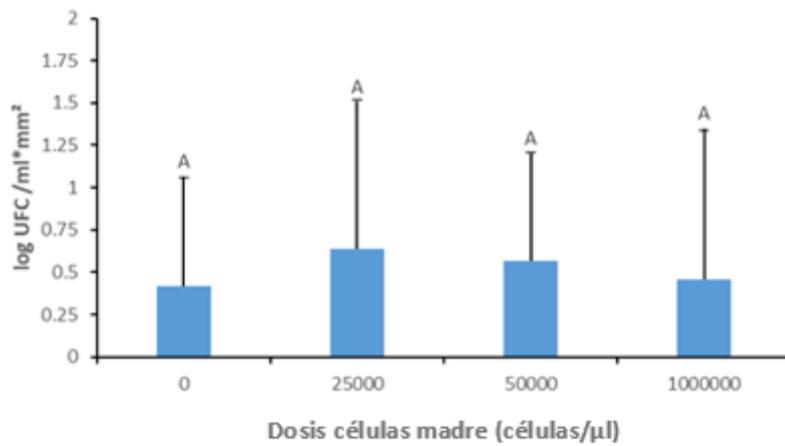
C



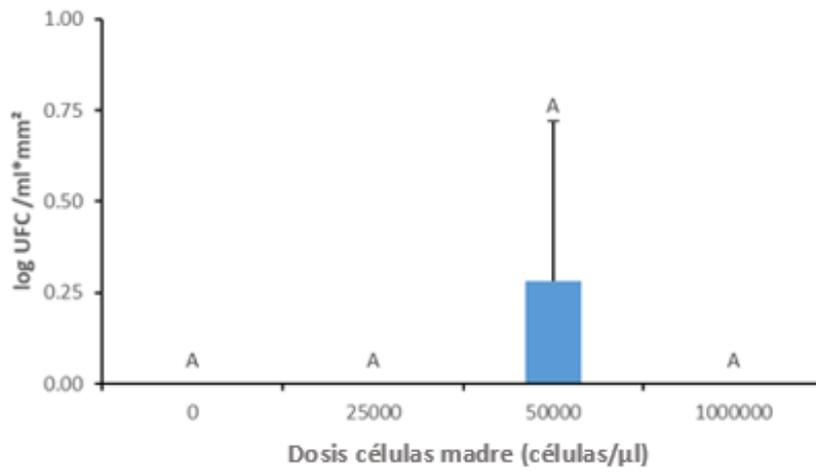
D



E



F



Nota* Medio Agar Pseudomonas (A), Agar Manitol Salado (B) y MUG (C), y células madre en el medio Agar Pseudomonas (D), Agar Manitol Salado (E) y MUG (F).