



## **UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO**

### **RED BIBLIOTECARIA MATÍAS**

### **DERECHOS DE PUBLICACIÓN**

#### **DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO**

#### **Capítulo VI, Art. 46**

**“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”**

#### **PUBLICADO BAJO LA LICENCIA CREATIVE COMMONS**

**Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual**

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>



“No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.”

**Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad**

Universidad Dr. José Matías Delgado

Facultad de Ciencias de la Salud Dr. Luis Edmundo Vásquez  
Escuela de Medicina



**Efecto antibacteriano *in vitro* del plasma rico en plaquetas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.**

Presentada para optar al título de Doctorado en Medicina

Por:

José Roberto Gálvez Escobar  
Daysi Lorena Guerrero Ruiz

Asesor:

Lic. María Teresita Bertoli Avella

Enero 2014

Antiguo Cuscatlán, La Libertad, 24 de enero de 2014



Dr. David Escobar Galindo  
**RECTOR**

Dr. José Enrique Sorto Campbell  
**VICERRECTOR**

Dr. José Enrique Sorto Campbell  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

Dr. José Nicolás Astacio Soria  
**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. LUIS  
EDMUNDO VASQUEZ**

Dr. Julio Cesar Ruiz  
**PRESIDENTE DE EL COMITÉ EVALUADOR**

Dra. Claudia Lara  
Lic. Silvia Pecorini  
**COMITÉ EVALUADOR**

Lic. María Teresita Bertoli Avella  
**ASESORA**

**ANTIGUO CUSCATLÁN, LA LIBERTAD, 24 DE ENERO 2014**

### ACTA DE EVALUACION DE TESIS POR EL JURADO N°

En la ESCUELA DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO.  
Elegido a 0 horas con 0 minutos del día 14 del mes de febrero de 2014  
reunidos los señores miembros del jurado examinador de la Tesis de Grado titulada:

**TEMA:**  
Efecto antibacteriano in vitro del plasma rico en plaquetas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas

Presentada por el (los) la (s) egresados(as):

1. JOSÉ ROBERTO GÁLVEZ ESCOBAR
2. DAYSI LORENA GUERRERO RUIZ
- 3.

0

Para optar al Grado de:

DOCTORADO EN MEDICINA

Respectivamente

HACE CONSTAR QUE: Habiendo revisado y evaluado en forma individual su contenido escrito, de conformidad al Art. 41, 42 y 43 del Reglamento de Graduación ACORDARON DECLARARLA:

- APROBADA SIN OBSERVACIONES  
 APROBADA CON OBSERVACIONES  
 REPROBADA

No habiendo más que hacer constar, damos por terminada la presente acta que firmamos, entregando el original a la Secretaría de esta Unidad Académica.

  
Dr. Julio César Ruiz  
Presidente

  
Dra. Claudia Lara de Dehais  
Primer Vocal

  
Licda. Silvia Yolanda Pecorini de Chavarria  
Segundo Vocal

## **Agradecimientos**

Nos hemos tomado este espacio para poder agradecer de manera especial a todas las personas que contribuyeron directamente a poder hacer esta investigación una realidad. Agradecemos a la Lic. María Teresita Bertoli Avella por su asesoría y orientación en la realización de este documento.

De igual manera queremos agradecer al Dr. William Hoyos por haber contribuido con la utilización de la centrifuga en este estudio y por la colaboración en la realización el mismo. Por su orientación y apoyo en lo relacionado al tema investigado. Sabemos que muchas de esas horas fueron un sacrificio que siempre estuvo dispuesto a hacer. Por todo esto gracias.

Así mismo agradecemos de manera muy especial a la Dra. Karla Navarrete por las incontables horas dedicadas en la orientación y apoyo en el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación.

Con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para culminar nuestra carrera, por el apoyo moral, cariño y comprensión, dedicamos este esfuerzo a nuestras familias y a Dios en particular.

A todos ellos, muchas gracias.

## Contenido

Agradecimientos .....	6
Resumen.....	10
Introducción .....	11
Planteamiento del problema.....	12
Objetivo general:.....	13
Objetivos específicos: .....	13
Hipótesis.....	14
Marco teórico .....	15
Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	15
Componentes.....	15
Propiedades.....	18
Clasificación del Sistema PAW .....	18
Efecto antimicrobiano del PRP .....	19
Microorganismos a investigar en el estudio.....	21
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
Generalidades y Crecimiento .....	21
Estructura .....	22
Características para la identificación.....	22
Diagnostico .....	22
Aspectos Epidemiológicos .....	22
<i>Escherichia coli</i> .....	23
Generalidades y Crecimiento .....	23
Estructura .....	23
Diagnóstico .....	23
Aspectos Epidemiológicos .....	23
<i>Pseudomona aeuroginosa</i> .....	24
Generalidades y Crecimiento .....	24
Estructura .....	24
Productos Extracelulares .....	24
Diagnóstico .....	24
Aspectos epidemiológicos.....	25

Materiales y Métodos .....	25
Obtención de PRP.....	25
Método de dilución en tubo. ....	26
Metodología .....	27
Tipo de estudio.....	27
Selección del donante y obtención de la sangre para la obtención de PRP.....	28
Doble centrifugación .....	29
Activación del PRP .....	30
Determinación de la actividad antimicrobiana del PRP .....	30
Diluciones seriadas en tubo .....	30
Inspección visual de la Turbidez y Tinción Gram .....	31
Conteo de colonias viables en placa y determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	31
Análisis Estadístico .....	33
Resultados .....	34
Obtención del PRP.....	34
Medición de la actividad antibacteriana del PRP.....	35
Determinación de la actividad antimicrobiana mediante la inspección visual e la turbidez. ..	35
Determinación de la actividad antibacteriana mediante la determinación de las UFC .....	37
Conteo manual de placas viables.....	40
Tasa antibacteriana.....	44
Tinción Gram .....	46
Discusión.....	47
Conclusión.....	49
Recomendaciones.....	50
Bibliografía .....	51
Anexos.....	53
Anexo 1. Base de datos para <i>S. aureus</i> . Ensayo 1 .....	53
Anexo 2. Base de datos para <i>Staphylococcus sp.</i> Ensayo 1.....	53
Anexo 3. Base de datos para <i>E. coli</i> . Ensayo 1 .....	54
Anexo 4. Base de datos para <i>P. aeruginosa</i> . Ensayo 1.....	55
Anexo 5. Base de datos para <i>S. Aureus</i> . Ensayo 2.....	55

Anexo 6. Base de datos para *Staphylococcus sp.* Ensayo 1..... 56



## **Resumen**

Este trabajo trata acerca de la obtención del Plasma Rico en Plaquetas y su posible efecto antibacteriano estudiado sobre dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp*) así como también en dos bacterias Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). La utilización de materiales fácilmente obtenibles en nuestro medio y las muestras bacterianas proporcionadas por el personal del Departamento de Microbiología de nuestra Facultad, permite la reproducibilidad y continuidad en dicha temática. Dicho estudio permitió observar el comportamiento del Plasma Rico en Plaquetas en contacto con microorganismos patógenos permitiendo realizar diferentes conclusiones y propuestas a tomar en cuenta en investigaciones futuras así como posibles cambios en la metodología para simplificar el proceso de investigación.

## **Introducción**

En los últimos años, el plasma rico en plaquetas (PRP) ha generado interés en los investigadores de diferentes países por su potencial como tratamiento coadyuvante en áreas de la medicina como cirugía por su efecto en la cicatrización, regeneración tisular; así como también en medicina del deporte, ortopedia, odontología, dermatología entre otras, por la capacidad para regenerar cartílagos, hueso y tendones. (1) (2)

Sin embargo, son pocos los estudios que han determinado el efecto antibacteriano que potencialmente puede tener el PRP sobre algunas bacterias Gram positivas y Gram negativas que se encuentran en infecciones de tejidos blandos.

Consideramos de gran importancia poder investigar el efecto antibacteriano del PRP tomando específicamente 4 bacterias: 2 Gram negativas y 2 Gram positivas de importancia clínica, determinando de esta manera si el PRP posee actividad contra dichos microorganismos. Dicho efecto pudiese ser de mucha utilidad como coadyuvante al tratamiento farmacológico, permitiendo así el posible acortamiento de la duración del tratamiento convencional y reducción de costos en tratamiento y tiempo de convalecencia.

## Planteamiento del problema

En nuestro país hay estudios preliminares, en los cuales se ha investigado como PRP puede contribuir en la mejoría de lesiones de tejidos blandos, mediante su capacidad de regeneración tisular y cicatrización. La primera de estas investigaciones realizada en un modelo animal, demostró que el PRP era capaz de ejercer efecto positivo en la epitelización y disminución en la brecha de lesión persistente en quemaduras de segundo grado. En una segunda investigación en pacientes con úlceras venosas, se estudió el proceso de granulación y regeneración logrando curación de las úlceras en menor cantidad de tiempo que con tratamientos convencionales. (3) (4)

Una limitación de los estudios antes mencionados es que ninguno de ellos evaluó la actividad antimicrobiana. Por esta razón el presente estudio pretende evaluar si el PRP posee actividad antibacteriana *in vitro* frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* y Gram negativas: *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*, que son de importancia clínica en nuestro medio. Utilizando un método estandarizado a nivel internacional para la obtención de esta fracción del plasma, y la valoración de su actividad por medio de métodos de dilución seriada y valoración de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) viables, y a su vez determinar si dicha inhibición media en cambios en la morfología de dichas bacterias, una vez haya ejercido su efecto.

**Objetivo general:**

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del plasma rico en plaquetas (PRP) contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

**Objetivos específicos:**

- Obtener una fracción de PRP por medio del método de doble centrifugación.
- Clasificar la fracción obtenida del PRP según el Sistema PAW.
- Determinar el efecto antibacteriano del PRP por medio del método de dilución en tubo y viabilidad bacteriana.
- Verificar si el posible efecto antibacteriano del PRP produce cambios morfológicos en la pared bacteriana por medio de cambios en la tinción Gram.

**Hipótesis**

El PRP posee propiedades antibacterianas *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*.

## **Marco teórico**

Las plaquetas son células en forma de disco con un diámetro de 1 a 4 micrómetros, formados en la médula ósea a partir de los megacariocitos, los cuales se fragmentan al entrar en contacto con el torrente sanguíneo. A pesar de tener funciones celulares similares a células completas, estas no poseen núcleo ni tienen la capacidad de reproducción, sin embargo, según algunos estudios proteómicos, poseen alrededor de 1500 factores bioactivos con base proteica. De todos estos, son pocos los factores que se han logrado estudiar y determinar su función fisiológica, siendo los más importantes los factores de crecimiento (GF por sus siglas en inglés), hormonas y sustancias químico atrayentes para macrófagos, neutrófilos y células madres. (5)(6)

Las plaquetas tienen una vida media que oscila entre los 8 y 12 días en el torrente sanguíneo, posterior a lo cual son fagocitadas por los macrófagos, principalmente en el bazo. Las funciones de las plaquetas no solo se limitan al contenido celular de cada una como se mencionaba anteriormente, sino que estructuras como la membrana celular plaquetaria que está compuesta en su superficie por una capa de glicoproteínas que cumple funciones tales como evitar la adherencia al tejido endotelial sano y permitir la adherencia a zonas endoteliales dañadas. Además de glicoproteínas, poseen fosfolípidos que juegan un rol importante en la activación de múltiples fases en el proceso de coagulación. (6)

Al ser activadas las plaquetas, presentan proteínas adhesivas, liberan una gran cantidad de citocinas y hacen contacto directo con el endotelio, granulocitos, linfocitos y monocitos estimulando o inhibiendo de esta manera patrones en el proceso de inflamación celular.(5)

Las plaquetas tienen características que le permiten interactuar con diferentes microorganismos y el sistema inmune. Interactúan de manera directa con microorganismos Gram positivos y Gram negativos a través de 4 fases: Contacto directo, morfogénesis, agregación reversible y agregación irreversible. Al completar las 4 fases de la interacción con microorganismos se produce liberación de tres tipos de gránulos citoplasmáticos:

1. Gránulos alfa: son ricos en proteínas especializadas en funciones hemostáticas y proteínas con funciones antibacterianas como la trombocidina (TC).
2. Gránulos delta: ricos en mediadores del tono vascular como serotonina, adenosina, ADP, calcio y fosfato.
3. Gránulos lambda o gránulos lisosomales que son ricos en enzimas moduladoras de la disolución del trombo. (7)

## **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**

### **Componentes**

El plasma rico en plaquetas es un término genérico que se refiere a cualquier muestra de plasma autólogo con un concentrado de plaquetas arriba de la línea basal. Se define como un componente sanguíneo producto de la centrifugación de sangre entera, obteniendo concentraciones elevadas en plaquetas con un mínimo de 200 mil plaquetas/ $\mu$ L. (8)

Para que se considere que el PRP pueda ejercer un efecto terapéutico sobre los tejidos, la concentración de plaquetas debe oscilar entre  $200 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  hasta  $1000 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , mientras que, conteos más altos parecen no ser favorable biológicamente. (9)

Bioquímicamente, el PRP se compone de suero, leucocitos, plaquetas y GF, la presencia conjunta de todos estos elementos favorece la acción del PRP. Los elementos fundamentales son los GF, que ejercen la función de regeneración tisular y de cicatrización, generalmente almacenados de forma inactiva como gránulos alfa entre los cuales se encuentran: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés), Factor Transformador de Crecimiento beta (TGF- $\beta$ 1), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) y Factor de Crecimiento a la Insulina (IGF). (7) (10) Ver **Tabla 1**.

Otro componente importante del PRP son los leucocitos, los cuales pueden encontrarse en diferentes cantidades de acuerdo al método utilizado para la obtención del PRP. Estos se pueden clasificar en células mono nucleares y granulocitos, sin embargo su presencia se ha relacionado más con procesos pro inflamatorio que regenerativo, por lo que no es aconsejable utilizar un PRP con leucocitos si el fin de su uso es el coadyuvante a la regeneración tisular. Sin embargo, si se desea utilizar para lesiones dérmicas infectadas su utilidad puede ser mayor que aquel PRP sin leucocitos así como para prevenir infecciones en dichas lesiones. La acción antimicrobiana de los leucocitos se realiza por medio de gránulos primarios, secundarios y terciarios, proteasas, moléculas oxigenadas y otras sustancias, que son liberadas como respuesta a la activación de dichas células. Los gránulos primarios poseen hasta 10 péptidos antimicrobianos, los gránulos secundarios poseen péptidos similares a los gránulos primarios pero adicionalmente contienen lactoferrina que a través de unión con el hierro ejerce un efecto contra bacterias, virus y parásitos. (8)

**Tabla 1** Factores de Crecimiento presentes en el PRP.

<b>PDGF</b>	<b>TGF-B</b>	<b>FGF</b>	<b>IGF</b>	<b>VEGF</b>	<b>EGF</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimio taxis.</li> <li>▪ Activador de los macrófagos.</li> <li>▪ Mitogeno de células mesenquimales.</li> <li>▪ Facilita la formación de colágeno tipo I.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quimiotaxis.</li> <li>▪ Proliferación y diferenciación de las células mesenquimales.</li> <li>▪ Síntesis de colágeno por lo osteoblastos.</li> <li>▪ Síntesis de colágeno por los osteoblastos.</li> <li>▪ Pro-angiogénesis.</li> <li>▪ Inhibe la formación de osteoclastos.</li> <li>▪ Inhibe la proliferación de células epiteliales en presencia de otros factores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferación y diferenciación de los osteoblastos.</li> <li>▪ Inhibe los osteoclastos.</li> <li>▪ Proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos.</li> <li>▪ Pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento.</li> <li>▪ Síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno I por los osteoblastos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quimiotaxis y proliferación de células endoteliales.</li> <li>▪ Hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mitógeno, pro-apoptotico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos.</li> </ul>

Citado de: Platelet-Rich Plasma: A Milieu of Bioactive Factors.



## Propiedades

No se conoce específicamente el mecanismo preciso mediante el cual el PRP pudiera ejercer el efecto antimicrobiano. Se sabe que existe interacción de mediadores como los factores de crecimiento, radicales libres de oxígeno, citosinas, entre otros.

Las plaquetas son las primeras y más abundantes células que se acumulan en el sitio de injuria o colonización del endotelio, por esto pueden interceder como células de defensa antimicrobiana contra la evolución de la infección. (7)

Las plaquetas expresan receptores tipo TOLL, lo que les permite desarrollar una función centinela detectando de forma temprana la presencia de microorganismos potencialmente dañinos. Las plaquetas interactúan con microorganismos de manera directa e indirecta causando agregación y degranulación plaquetaria, interaccionando de esta manera con factores de complemento y fibrinógeno potenciando aún más su efecto antimicrobiano. (5) Típicamente la secuencia de dicha interacción es la siguiente: contacto directo, morfogénesis, agregación inicial y agregación irreversible. (7)

## Clasificación del Sistema PAW

El sistema de clasificación conocida por “Plaquetas-Activación-Células blancas” (PAW) por sus siglas en inglés, se desarrolló con el objetivo de poder estandarizar la manera en que se clasificaría el PRP. Esto responde a la necesidad de poder reproducir los resultados obtenidos por diferentes investigadores a nivel mundial que de una u otra manera habían utilizado el PRP para probar sus diferentes beneficios. Al no tener una clasificación estandarizada, se volvía difícil poder comprender a ciencia cierta que componentes estaban en el PRP y cuál de todos ellos había influenciado más en los resultados obtenidos.

El sistema PAW toma en cuenta la necesidad de identificar 4 factores esenciales para la comprensión del efecto del PRP. (10)

Estos son:

- Cantidad exacta de plaquetas contenidas en el PRP para poder validar y evitar sesgos en el resultado.
- Presencia o ausencia de sustancias activadores de plaquetas.
- Presencia de leucocitos en el PRP ya sea sobre o por debajo de los valores base.
- La manera en cómo se utilizó y administro el PRP en el tejido.

De manera que a través de estos factores se puede estandarizar el uso y el efecto esperado del PRP. (Ver **Tabla 1**).

En base a toda esa información, la clasificación PAW se realiza en base a tres componentes:

- El número absoluto de plaquetas.
- La manera en que ocurre la activación de las plaquetas.
- La presencia o ausencia de células blancas. (Ver **Figura 1**)

El conteo absoluto de plaquetas debe de ser representado en plaquetas por micro litros de la siguiente manera:

**P1:** número total de plaquetas menor a los niveles basales normales.

**P2:** número total de plaquetas abajo de 750 mil plaquetas/ $\mu$ L pero mayor a niveles basales normales.

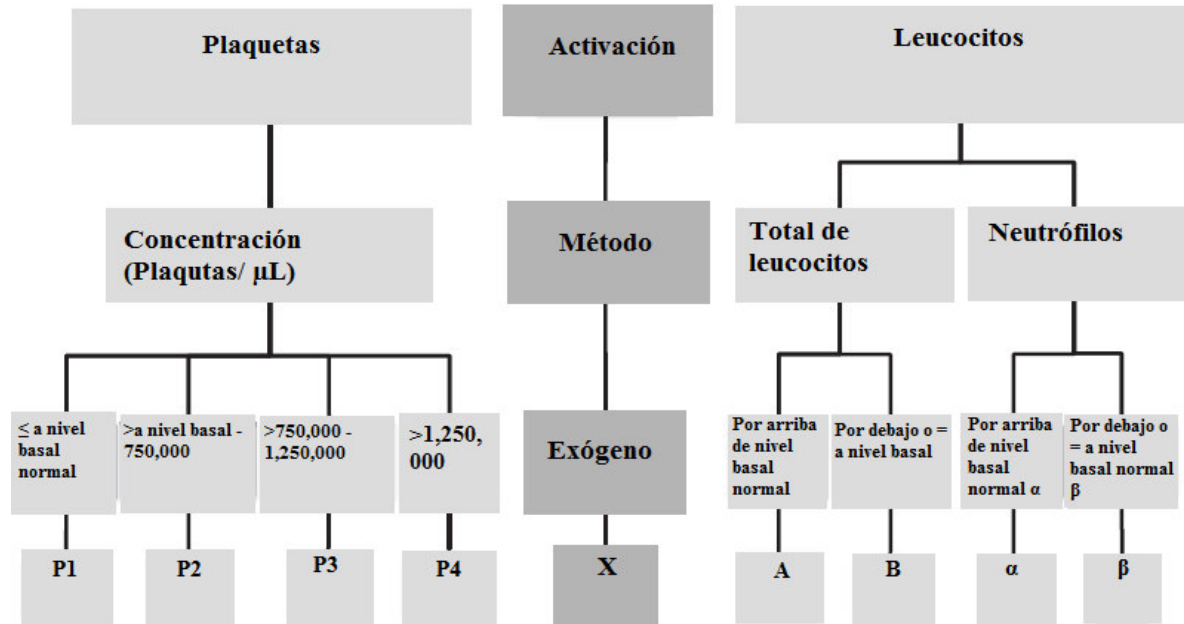
**P3:** número total de plaquetas entre 750 mil y 1.25 millones de plaquetas/ $\mu$ L.

**P4:** número total de plaquetas superior a 1.25 millones de plaquetas/ $\mu$ L.  
De igual manera, los leucocitos se deben de clasificar dependiendo del número encontrado en el PRP:

**A:** número de leucocitos superior a valores basales normales.

**B:** número de leucocitos por debajo o igual a los valores basales normales.

La manera en que se activara el PRP se deberá de simbolizar con una "x" si el sistema fue activado de manera exógena de lo contrario, se dejará en blanco. (10).



**Figura 1** Sistema de Clasificación PAW. Citado de PAW System.

### Efecto antimicrobiano del PRP

En los últimos años, en diferentes países se ha comenzado a estudiar los posibles efectos antimicrobianos del PRP adicional al efecto cicatrizante. Poco se conoce acerca del mecanismo a través del cual, los diferentes preparados de plasma ricos en plaquetas logran inhibición de crecimiento microbiano o que tipos de microorganismo son sensibles ha dicho efecto, sin embargo se han intentado hacer avances en dicha área realizando investigaciones *in vitro*.

En el año 2007 en Holanda, Moojen et al, realizaron un estudio utilizando Gel Leuco-Plaquetario (PLG por sus siglas en ingles) para observar la posible actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*. Para la obtención de PLG, obtuvieron PRP de 6 pacientes mediante centrifugación única a 3200 RPM por 19 minutos. Posteriormente, se agregó trombina autóloga al volumen obtenido de PRP para activación plaquetaria y formación del gel. Muestras de *S. aureus* fueron colocadas en tubos con Tryptone Soya Broth (TSB) y 1 ml de solución salina buferizada como control, 1ml de PLG, PRP y PPP en tubos distintos

para su posterior incubación y sembrado encontrando una fuerte actividad antibacteriana del PLG y en menor medida del PRP y PPP en comparación con el control. Sin embargo, uno de los problemas con el diseño del estudio, es que tanto el PRP como el PLG contenían 17900 leucocitos, los cuales pudieran contribuir a la inhibición bacteriana por lo que los autores sugerían más investigaciones para determinar su verdadero potencial antibacteriano. (11)

Ese mismo año, *el British Editorial Society of Bone and Joint Surgery* publicó un estudio realizado por Bielecki et al en la que utilizaron PRP de 20 voluntarios para determinar el efecto antibacteriano en detrimento del *S. aureus* meticilino sensible, *S. aureus* meticilino resistente, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. faecalis*. Utilizando el método de Kirby-Bauer, impregnaron discos de papel filtro con 10µL de PRP y 2µL de trombina en cloruro de calcio para activación plaquetaria. (2)

Los halos de inhibición fueron posteriormente medidos y comparados con el control negativo (discos con 12µL de trombina) encontrando un fuerte efecto inhibitorio contra ambas muestras de *S. aureus* (meticilino sensible y resistente) y contra *E. coli*. Por otra parte, no se encontró efecto alguno contra *K. pneumoniae*, *E. faecalis* ni *P. aeruginosa*, encontrando en esta última, datos que sugieren que el PRP puede potenciar la infección por dicha bacteria por lo que consideran que se debe contraindicar la utilización de PRP para pacientes con úlceras infectadas con *P. aeruginosa*. (2)

El siguiente año en Perú, se publicó un estudio realizado por Huapaya y Noriega, en el que se pretendía encontrar si el PRP de manera pura y/o combinada con 500 mg de ampicilina lograba inhibir el crecimiento del *S. aureus in vitro* y potenciar el efecto del antibiótico, para lo cual se utilizó el método de Kirby-Bauer. En una placa con agar Müller Hinton se realizó un sembrado con la bacteria en estudio y se colocaron 4 porciones de papel filtro, una con suero fisiológico como control negativo, una con PRP, una con Ampicilina 500mg como control positivo y la última con una combinación de PRP y Ampicilina 500mg para su posterior observación y medición de halos de inhibición. (12)

El resultado obtenido contrasta con los estudios antes mencionados. En este caso, no se encontró inhibición del PRP contra *S. aureus* con respecto al control negativo ni se encontró mayor efecto inhibitorio en la muestra del PRP con Ampicilina por lo que concluyen que el PRP carece efecto antibacteriano contra *S. aureus*. (12)

Sin embargo, el estudio tiene la limitante de no mencionar la concentración de plaquetas logradas en la muestra de PRP utilizada ni la presencia o no de leucocitos por lo que se dificulta la posible comparación con los estudios antes mencionados.

Otros estudios como el realizado por Cheng et al publicado en el *Journal of Diabetes Research* pretendían corroborar el efecto antibacteriano del PRP. Utilizando sangre de 16 pacientes diabéticos con úlceras dérmicas cumpliendo tratamiento antibiótico en ese momento. Se obtuvo PPP, Gel Rico en Plaquetas Autólogo (APG) y PRP con un conteo plaquetario de 1.9 millones de plaquetas y 5,700 leucocitos. Para evitar que los leucocitos pudieran ejercer efecto antibacteriano, se utilizó Apocinina, de manera que se realizaron 6

grupos por cada bacteria en estudio (*S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*) en los cuales se agregaba APG, APG con Apocinina (previamente activados con trombina y calcio) PRP (sin activar) PPP como control positivo (por los antibióticos con los que estaban medicados) y solución salina buferizada como doble control negativo. (13)

En este caso, el APG y el APG con Apocinina, tuvieron efecto antibacteriano contra las 3 bacterias en estudio, principalmente contra el *S. aureus*, sugiriendo que el efecto era ejercido principalmente por las plaquetas. En menor medida se encontró efecto antibacteriano del PRP, el cual no había sido activado, sugiriendo que la activación plaquetaria juega un papel importante para su posible efecto bactericida. Sin embargo al no encontrar diferencias amplias en la tasa de inhibición de *E. coli* y *P. aeruginosa* entre los diferentes grupos, consideran que dicho efecto se puede atribuir a los antibióticos y no a las plaquetas, siendo este uno de los mayores limitantes del estudio.(13)

Diferentes estudios fueron publicados entre el año 2012 y 2013, encontrando efectos similares a los estudios antes mencionados y agregando otros microorganismos al posible espectro antibacteriano del PRP como el estudio publicado por Drago et al en el que se encontró inhibición al crecimiento de *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* y el estudio publicado por Journal of Visualized Experiments con el *Streptococcus* del grupo A y *N. gonorrhoeae*.(14)

Hay por lo tanto evidencia del efecto antibacteriano del PRP. Sin embargo, esta tiende a ser confusa y en ocasiones contradictoria con respecto a su verdadero espectro antibacteriano y el mecanismo mediante el cual se alcanza dicho efecto, siendo uno de los problemas principales la falta de estandarización de la obtención del PRP, la cantidad de plaquetas concentradas, la presencia de leucocitos y la manera de activación o no de dicho concentrado para la realización de una comparación objetiva entre los diferentes estudios. (10)

## **Microorganismos a investigar en el estudio**

### ***Staphylococcus aureus***

#### **Generalidades y Crecimiento**

El termino Staphylococcus deriva de la raíz griega *staphyle*, "racimo de uvas", debido a su patrón de crecimiento, pero generalmente en muestras clínicas se observa en forma de células únicas. (15)

*Staphylococcus aureus* es una de las causas frecuentes y virulentas de infecciones purulentas agudas en la piel.

Los estafilococos crecen mejor en condiciones aerobias, pero son anaerobios facultativos. Carecen de flagelos, no tienen movilidad y no forman esporas. (13)

El género comprende alrededor de 35 especies y 17 subespecies, las cuales en su mayoría colonizan el ser humano. Adicionalmente se pueden dividir en 2 grupos, dependiendo de la presencia de la enzima coagulasa, siendo el *Staphylococcus aureus* la única especie que posee dicha enzima, por lo que nos referiremos a la bacteria como *Staphylococcus* coagulasa positivo y al resto de los *Staphylococcus* como coagulasa negativo. El *Staphylococcus* coagulasa positivo se le denominó *aureus* por formar pigmentos carotenoides durante su crecimiento dando un aspecto dorado. (15)

### **Estructura**

Son uniformemente Gram positivas y de tamaño regular. En cultivos viejos, lesiones en proceso de mejoría y en presencia de algunos antibióticos a menudo se vuelven de tamaño variable y muchas pierden su positividad al Gram. (16)

De su capsula de polisacárido se sabe que el serotipo 5 y 7 se asocian a patologías infecciosas en humanos. Dicha capsula, además de conferir protección contra la fagocitosis por PMN; permite la producción de una biopelícula hidrosoluble laxa que les permite adherirse a tejidos y en forma de biofilm.

Su composición está dada principalmente por peptidoglucanos que actúa como una endotoxina promoviendo la formación de IL-1 y la agregación leucocitaria, ácido teicoico que contribuyen a la adhesión de las mucosas y proteína A, ausente en los estafilococos coagulasa negativa. (16)

### **Características para la identificación**

El estudio más usado para distinguir a *S. aureus* de otros estafilococos es la producción de coagulasa, que se fija de manera no enzimática a la protrombina y forma con ella un complejo que inicia la polimerización de la fibrina. La emulsión densa de célula de *S. aureus* en agua también se aglutina de inmediato al mezclarse con plasma debido a la fijación directa del fibrinógeno a un factor sobre la superficie celular. Esta se denominada prueba de aglutinación en laminilla, que tiene una correlación elevada con la coagulasa (95%). (15)

### **Diagnostico**

La coloración de Gram y cultivo son métodos diagnósticos primarios. Crecen en medio de agar-sangre baja incubación aerobia. Se pueden emplear pruebas de catalasa y coagulasa directamente. (15)

### **Aspectos Epidemiológicos**

El hábitat típico es la porción anterior de las fosas nasales; cerca del 30% de las personas porta el microorganismo en ese sitio en un momento dado, pero este porcentaje puede ser mayor en personal hospitalario y pacientes hospitalizados. Algunos portadores nasales e individuos con colonización de otros sitios, como el perineo, pueden diseminar con amplitud el microorganismo con las células epiteliales descamadas.

La mayor parte de las infecciones adquiridas en la comunidad son autoinfecciones. Los brotes en la comunidad suelen ser el resultado de mala higiene y transmisión por fómites entre individuos. Pueden sobrevivir largos periodos de desecación. (16)

## *Escherichia coli*

### **Generalidades y Crecimiento**

El género *Escherichia* está compuesta por 5 especies, siendo la de mayor importancia la *E. coli*. Se caracteriza por ser un anaerobio facultativo y por tener la capacidad de fermentar lactosa con rapidez y por su producción de indol. Posee cerca de 150 antígenos O diferentes y gran número de antígenos K y H. Los pili son frecuentes en la superficie de las cepas de *E. coli*, algunas de estas estructuras influyen en la virulencia como mediadoras de la fijación bacteriana a las superficies epiteliales humanas. *Escherichia coli* puede producir todas las clases de toxinas que elaboran las Enterobacteriaceae, como citotoxina formadora de poros, toxinas inhibitoras de la síntesis de proteínas y otras diversas que alteran las vías mensajeras de las células huéspedes. (16)

### **Estructura**

Las enterobacterias se encuentran entre las bacterias de mayor tamaño, pues miden 2 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.4 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho, con lados paralelos y extremos redondeados. Sus formas varían desde grandes cocobacilos hasta bastoncillos filamentosos alargados. No forman esporas ni son acidorresistentes. La pared celular, la membrana celular y las estructuras internas son morfológicamente similares. El lipopolisacárido de la membrana exterior se denomina antígeno O. Su especificidad antigénica está determinada por la composición de los azúcares que forman las cadenas laterales largas de polisacáridos terminales enlazadas con el polisacárido central y el lípido A. Los polisacáridos de la superficie celular pueden formar una capsula bien definida o una cubierta de consistencia viscosa amorfa, que se denomina antígeno K. Las cepas móviles cuentan con flagelos proteínicos peritricosos que se extienden más allá de la pared celular y cuyo componente proteínico se denomina antígeno H. Muchas de las enterobacterias tienen pili en la superficie, que son proteínas antigénicas. (16)

### **Diagnóstico**

El cultivo es el método diagnóstico primario; todas las enterobacterias se aíslan fácilmente en medios habituales casi bajo cualquier condición de incubación. A menudo se emplean medios indicadores especiales como agar de MacConkey, para el aislamiento primario, a fin de acelerar la separación de muchas especies, y pone de manifiesto fermentación de la lactosa. (16)

### **Aspectos Epidemiológicos**

La mayor parte de las enterobacterias es colonizadora primaria de la parte distal del tubo digestivo del hombre y los animales. Muchas especies sobreviven en cualquier sitio con

fuerza de agua y energética mínimas. En el hombre son los componentes facultativos principales de la flora bacteriana del colon, y se encuentran también en las vías genitales femeninas y como colonizadoras transitorias de la piel. En las vías respiratorias son escasos en pacientes sanos, pero puede aumentar en pacientes hospitalizados con enfermedades debilitantes crónicas. (16)

### ***Pseudomona aeruginosa***

#### **Generalidades y Crecimiento**

Su crecimiento y necesidades energéticas son variables puede emplear moléculas de NH<sub>3</sub> y CO<sub>2</sub> como únicas fuentes de nitrógeno y carbono. No necesita medios enriquecidos para crecer y sobrevivir. Puede reproducirse entre 20 a 42°C en casi cualquier ambiente, incluso en concentraciones elevadas de NaCl. El crecimiento de las colonias adopta un resplandor metálico característico y emite un olor “a frutas” intenso. Es principalmente aerobia, pero también se logra desarrollar en ambiente anaerobio si este contiene nitrato como aceptador de electrones. Entre sus características que distinguen a *P. aeruginosa* de otra enterobacterias es la producción de pigmentos azules, (piocianina). (16)

#### **Estructura**

Son bacilos gramnegativos móviles, posee una capsula conocida como exopolisacárido mucoide cubierta de glucocalix, que protege a la bacteria mediante la supresión de neutrófilos y linfocitos, además, inhibe la acción bactericida de los aminoglucosidos. Esta capsula es la principal responsable de conferir alta resistencia a muchos antibióticos. Adicionalmente la presencia de βlactamasas, la hidrólisis por acetiltransferasa y la alteración de la ADN girasa le confiere resistencia contra βlactámicos, cloranfenicol y fluoroquinolonas. Por esta razón, la antibioticoterapia debe de ser combinada. (15)

Desde la superficie celular se extienden un pili compuestos por monómeros repetitivos de la subunidad estructural de pilina, formando un flagelo que le confiere una rápida propulsión. (16)

#### **Productos Extracelulares**

La mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* elabora múltiples productos extracelulares, entre ellos exotoxina A, enzimas con actividad hemolítica, lecitinasa, colagenasa y elastasa. La exotoxina A entra en las células por endocitosis mediada por receptor y se interna en ellas, produciendo detención de la síntesis de proteínas y muerte celular. La exoenzima S produce fosforilación de ADP de diversas proteínas intracelulares. La elastasa actúa sobre diversos sustratos, entre ellos la elastina, IgA e IgG humanas, componentes del complemento y algunas colagenas. (16)

#### **Diagnóstico**

Crece con facilidad en cultivo. La combinación de colonias características positivas a la oxidasa, la producción de piocianina y la capacidad de crecer a 42°C la distingue de otras especies de *Pseudomonas*. (16)

### **Aspectos epidemiológicos**

El hábitat primario es el ambiente. Se encuentra en agua, suelo y diversos tipos de vegetación. Se ha aislado en la garganta y excremento de 2 a 10% de individuos sanos. Las tasas de colonización pueden ser más elevadas en pacientes hospitalizados, es una causa importante de procesos infecciosos, invasor a una enfermedad subyacente grave. Su capacidad para sobrevivir en el agua con nutrientes mínimos puede favorecer la contaminación de cualquier líquido no estéril, como dispositivos humidificadores de los respiradores, medicamentos, soluciones para lentes de contacto, fregaderos y grifo. No es motivo de alarma para gente sana pero sí para pacientes predispuestos a la infección. (16)

### **Materiales y Métodos**

#### **Obtención de PRP**

##### **Doble Centrifugación**

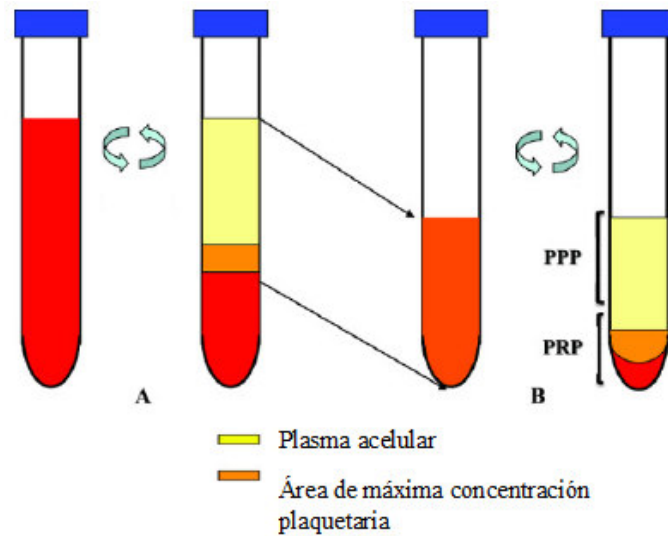
Para lograr la obtención máxima de la concentración de las plaquetas por unidad de volumen, sin la rotura de las mismas, se realiza la centrifugación con un equipo digital que garantiza que los parámetros de tiempos y velocidad son los adecuados. La velocidad de rotación depende del protocolo de obtención y del volumen utilizado. Cualquier alteración en la estandarización del centrifugado puede producir daños estructurales en las células sanguíneas. Existen dos protocolos:

- Centrifugación única.
- Doble centrifugación. (17)

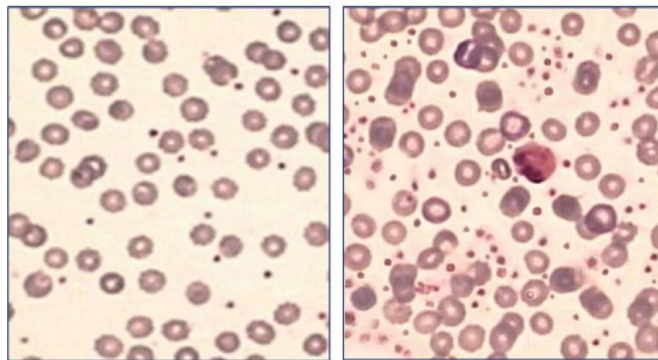
En el proceso de doble centrifugación, la primera centrifugación se puede realizar a una velocidad de 280 G (1400 rpm) durante 7 minutos, o bien a 160 G (1200 rpm) durante 10 minutos. El objetivo de la primera centrifugación será separar el plasma de los elementos formes de la sangre entera. (17) Ver **Figura 2**.

El objetivo de la segunda centrifugación, es separar y concentrar todavía más las plaquetas obteniendo como producto final el plasma rico en plaquetas. Esta segunda centrifugación se hará a una velocidad de 400 G (2000 rpm). Con este último proceso los tubos presentan una franja superior de suero sobrenadante de color amarillo claro, que contiene fibrinógeno y una concentración muy baja de plaquetas (plasma pobre en plaquetas o PPP), y una franja inferior formada por PRP. La concentración normal de las plaquetas tras la primera centrifugación es de 33-40% de plaquetas del nivel basal, pero tras el proceso de doble centrifugado se puede obtener una concentración de plaquetas de hasta 330% aproximadamente. (17) Ver **Figura 3**.





**Figura 2** Doble centrifugación. **A.** Primera centrifugación. **B.** Segunda centrifugación. Citado de: PRP as a New Approach to Prevent Infection: Preparation and *In vitro* Antimicrobial Properties of PRP.



**Figura 3** Frotis de sangre completa (izquierda). PRP (derecha) preparado por doble centrifugación-comparado con la sangre completa posee 10 veces el número de plaquetas. Citado de: PRP as a New Approach to Prevent Infection: Preparation and *In vitro* Antimicrobial Properties of PRP.

En estudios anteriores se ha utilizado como método de obtención del PRP, el blenderfuge (CHERITA) que es un modelo fabricado en nuestro país por medio de materiales obtenidos de una forma fácil y económica para nuestro medio. (4) Sin embargo en este estudio se pretende utilizar una metodología internacional estandarizada.

### Método de dilución en tubo.

El recuento de placas o células viables es un método de estimación del número de colonias que puedan crecer de una muestra, proveniente de un volumen seriado de dilución de bacterias que se emplea para producir varias muestras con densidad decreciente, en donde se siembre la alícuota de estas muestras en su respectivo medio, para valorar el crecimiento del número de colonias después de incubar. (18)

## Metodología

### Tipo de estudio

Experimental, en el que se determinó el efecto antibacteriano del PRP *in vitro* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Se utilizaron cepas previamente aisladas e identificadas por miembros del personal del Departamento de Microbiología de la facultad de Medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

Esta investigación se realizó en dos fases con un periodo de 1 mes de diferencia, utilizando la misma metodología y bacterias en estudio, con el motivo de aumentar el tamaño de la muestra.

**Tabla 2** Variables en estudio

Variable	Definición	Tipo	Forma de medición
Conteo basal de plaquetas	Número de plaquetas en muestra	Cuantitativa	Conteo automatizado realizado en laboratorio Hospital Diagnóstico. Número de plaquetas por $\mu\text{L}$
Series investigadas	Grupos de experimentación	Cualitativa	Control, PPP <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , PRP <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , PRP <sup>1</sup> / <sub>4</sub> , PRP <sup>1</sup> / <sub>10</sub> , PRP <sup>1</sup> / <sub>20</sub> .
Diluciones seriadas	Cuatro diluciones por cada serie investigada	Cualitativa	$10^{-2}$ , $10^{-4}$ , $10^{-6}$ , $10^{-8}$
Clasificación de bacterias	Bacterias en estudio Gram Positivas <i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus sp.</i> ) Gram Negativas ( <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> )	Nominal	Clasificación de las bacterias de acuerdo a la coloración de Gram contra las que se detecta actividad antimicrobiana
Turbidez	Turbidez del medio de cultivo producto del crecimiento bacteriano.	Cuantitativa	Medida visualmente con una escala relativa de crecimiento de 1 a 4 cruces tomando en consideración como 4 el tubo con mayor turbidez y como 1 el que menor turbidez presentó.
Determinación del número de UFC	El termino unidad formadora de colonia (UFC)	Cuantitativa	El conteo se realizó manualmente en las cajas de Petri cuando era posible contar. En el caso que las colonias fueran muchas y su conteo se volvía dificultoso, se

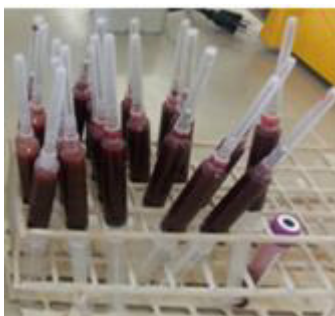
	permite determinar cuántas bacterias aproximadamente se encuentran formando una sola agrupación juntas, en par, tétradas, grupos, y cadenas bajo un término común. (15)		dividió la caja de Petri en 4 y se contó el número de colonias en un cuadrante y se multiplico por 4 y se utilizó la siguiente fórmula: (No de colonias)/ (Volumen de muestra sembrado × Factor de dilución). Para propósitos de gráficas y análisis se empleó una escala logarítmica base 10 por el gran número de UFC. (15)
Actividad antibacteriana	Tasa de inhibición del crecimiento bacteriano	Cuantitativa	Medida a través de la fórmula de conteo manual de placas bacterianas: ( <u>Conteo De Bacterias - Conteo De Bacterias Control</u> ) Conteo De Bacterias Control (13)
Cambios en morfología de pared	Presencia de cambios microscópicos de bacterias estudiadas.	Cualitativa	Fue evaluada mediante microscopia óptica y tinción de Gram.

### Selección del donante y obtención de la sangre para la obtención de PRP

Como criterio de inclusión el voluntario al cual se eligió debía presentar un buen estado de salud y al menos un mes de no haber recibido antibióticoterapia; y que obtuviera el mayor número de plaquetas basales (1)

Se realizó una extracción de 10 ml de sangre a 3 voluntarios, seguido de un conteo automatizado de plaquetas. Ver **Tabla 4**. Mediante dicho análisis se seleccionó al voluntario que cumpliera con los requisitos antes mencionados, para la preparación del PRP.

Al voluntario seleccionado, se le coloco un acceso venoso a través de un catéter estéril del cual se obtuvieron 100 ml de sangre completa. Los cuales se distribuyeron en 20 jeringas de 5mL a las que se les cortaron las aletas de sujeción y se les colocó un tapón de seguridad para utilizarlas como tubo de centrifuga; a cada una de estas jeringas se les agrego 0.01 mL de heparina (19) (**Figura 4**).



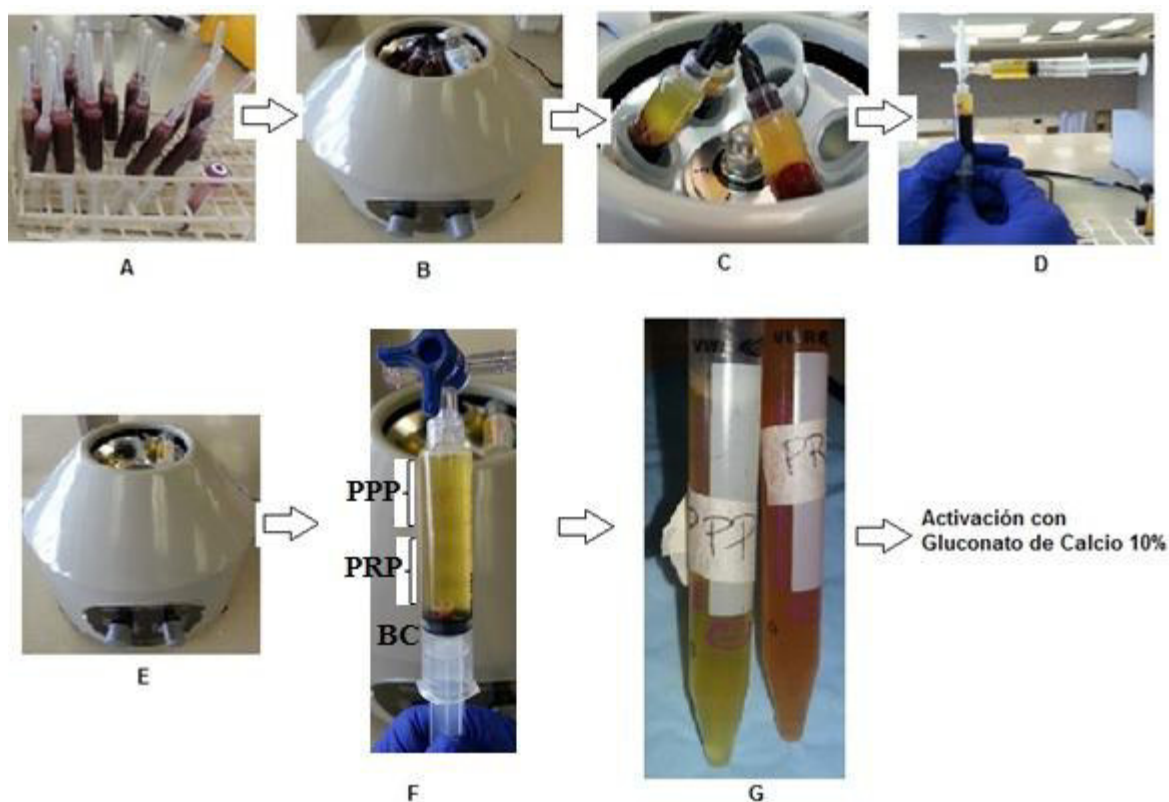
**Figura 4** Muestra de sangre completa

## Doble centrifugación

Las jeringas de 5 mL modificadas se colocaron en la centrifuga con el tapón hacia arriba. (16) Se inició la primera centrifugación a 160 G (1000 rpm) durante 10 minutos. (17) Posterior a esta centrifugación las jeringas se colocaron en posición vertical en una gradilla, y se transfirió la fracción del plasma de cada una de las jeringas mediante una válvula de 3 vías, a una nueva jeringa de 5 ml estéril (20). A dicha jeringa, se le agregó la cantidad que se obtiene con el bisel de una aguja, PGE1 (*Alprostadil*) para lograr la precipitación de las plaquetas. (21)

Luego se conectó cada jeringa de 5 ml conteniendo la muestra centrifugada con su contraparte vacía y se procedió a separar el plasma de los glóbulos rojos. Una vez separados, se sometió la jeringa conteniendo el plasma a una segunda centrifugación la cual se realizó a una velocidad de 400 G por 10 minutos. (14) **(Figura 5).**

Una vez se terminada la segunda centrifugación, se procedió a separar el PPP del PRP y Buffy Coat (sedimento de células blancas) de la misma manera en que se separó los glóbulos rojos del plasma en la primera centrifugación.



**Figura 5** Metodología para la obtención del PRP. **A.** Muestra de sangre con heparina fraccionada en jeringas de 5mL sin aletas de sujeción, **B.** Primera centrifugación, **C.** Fracciones obtenidas en la primera centrifugación, **D.** Preparación de la muestra para la segunda centrifugación, **E.** Segunda centrifugación, **F.** Fracciones resultantes de la segunda centrifugación, **G.** Volumen total de PPP y PRP obtenido de los 100ml de sangre completa.

Las fracciones obtenidas se analizaron en el Laboratorio Hospital de Diagnostico a través de un conteo automatizado obteniendo el número de plaquetas y leucocitos para su clasificación según el sistema PAW.

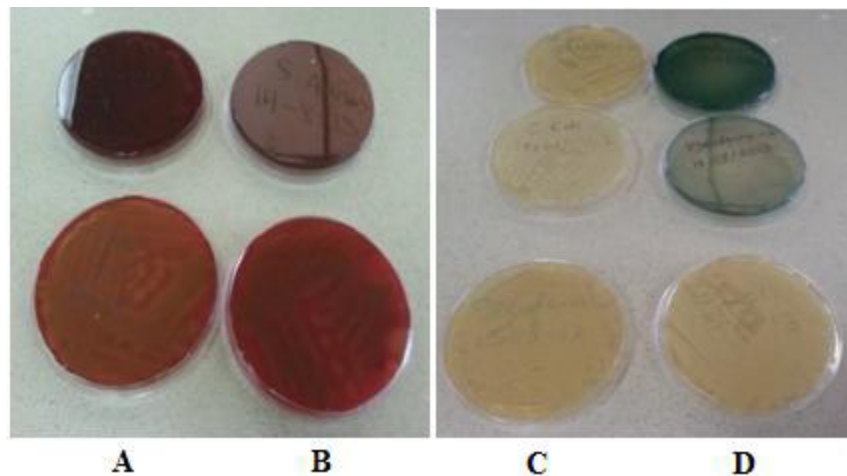
### Activación del PRP

A la fracción de PRP obtenida, se añadió 0.15 ml de gluconato de calcio al 10% por cada mililitro de PRP y de igual manera al PPP, para obtener la activación plaquetaria. (22)

### Determinación de la actividad antimicrobiana del PRP

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó con cepas de *Staphylococcus sp*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* todas procedentes de aislamientos clínicos.

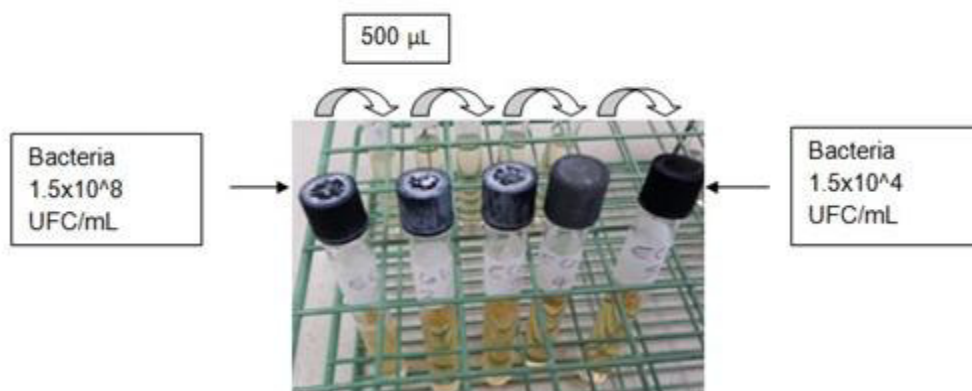
De cada bacteria se realizaron cultivos los cuales se incubaron por 18 horas a 35 °C en medio TSA con sangre de carnero al 5 % para *Staphylococcus sp* y *S. aureus*; y Tryptone Soya Agar (TSA) para *E. coli* y *P. aeruginosa*. Ver **Figura 6**.



**Figura 6** Cultivo de Bacterias en Estudio. **A.** *Staphylococcus sp* **B.** *Staphylococcus aureus* **C.** *E. coli*. **D.** *Pseudomona aeruginosa*.

### Diluciones seriadas en tubo

A partir de estos cultivos bacterianos se prepararon suspensiones con turbidez 0.5 según la escala de Mcfarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en tubos conteniendo 5 ml de Tryptone Soya Broth (TSB) y se realizaron suspensiones seriadas de base 10 logrando una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL. Ver **Figura 7**



**Figura 7** Suspensión McFarland 0.5

Con la última dilución obtenida en la **Figura 7** que corresponde a la concentración  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL se preparó otra serie de tubos con distintas cantidades de PRP y PPP para medir la actividad antimicrobiana. A este grupo de diluciones cuyas características se describen en la **Tabla 6**, nos referiremos como "Serie A" de diluciones. Todos los tubos de esta serie se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  por 18 horas. (3)

**Tabla 3** Diluciones serie A.

Componentes	Tubo1 Control	Tubo 2 PPP $\frac{1}{2}$	Tubo 3 PRP $\frac{1}{2}$	Tubo 4 PRP $\frac{1}{5}$	Tubo 5 PRP $\frac{1}{10}$	Tubo 6 PRP $\frac{1}{20}$
Medio TSB	900 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	400 $\mu\text{L}$	650 $\mu\text{L}$	800 $\mu\text{L}$	850 $\mu\text{L}$
Bacteria $1.5 \times 10^4$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
PRP	---	---	500 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
PPP	---	500 $\mu\text{L}$	---	---	---	---

### Inspección visual de la Turbidez y Tinción Gram

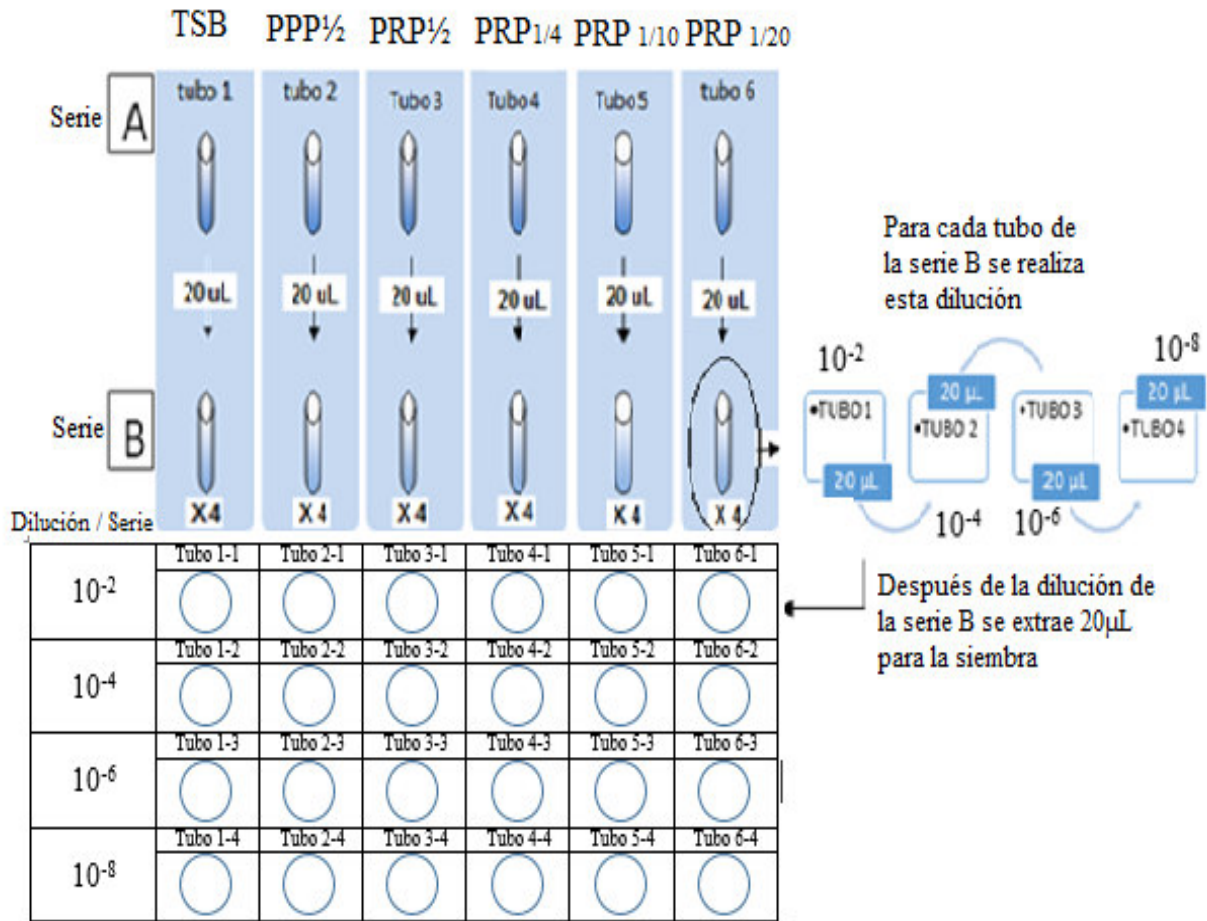
Después de la incubación se procedió a la inspección visual de la turbidez de cada uno de los tubos de las diluciones utilizadas para la identificación de alteraciones en la turbidez. Posteriormente se realizó un frotis por bacteria, a los cuales se aplicó tinción Gram y se observaron por microscopía óptica, donde se analizó la presencia o no de cambios en la tinción o morfología de la bacteria.

### Conteo de colonias viables en placa y determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)



Para el conteo de colonias viables en placas se realizó una nueva serie de diluciones la cual denominaremos "Serie B" de diluciones, a partir de la "Serie A" descrita anteriormente. Todos los tubos de la "Serie B" tendrán 2 ml de SSN 0.9%.

Para crear el tubo 1 de la "Serie B" se tomaron 20 µL de cada uno de los 6 tubos de la "Serie A" por cada bacteria en estudio. Ver **Figura 8** y **Figura 9**.

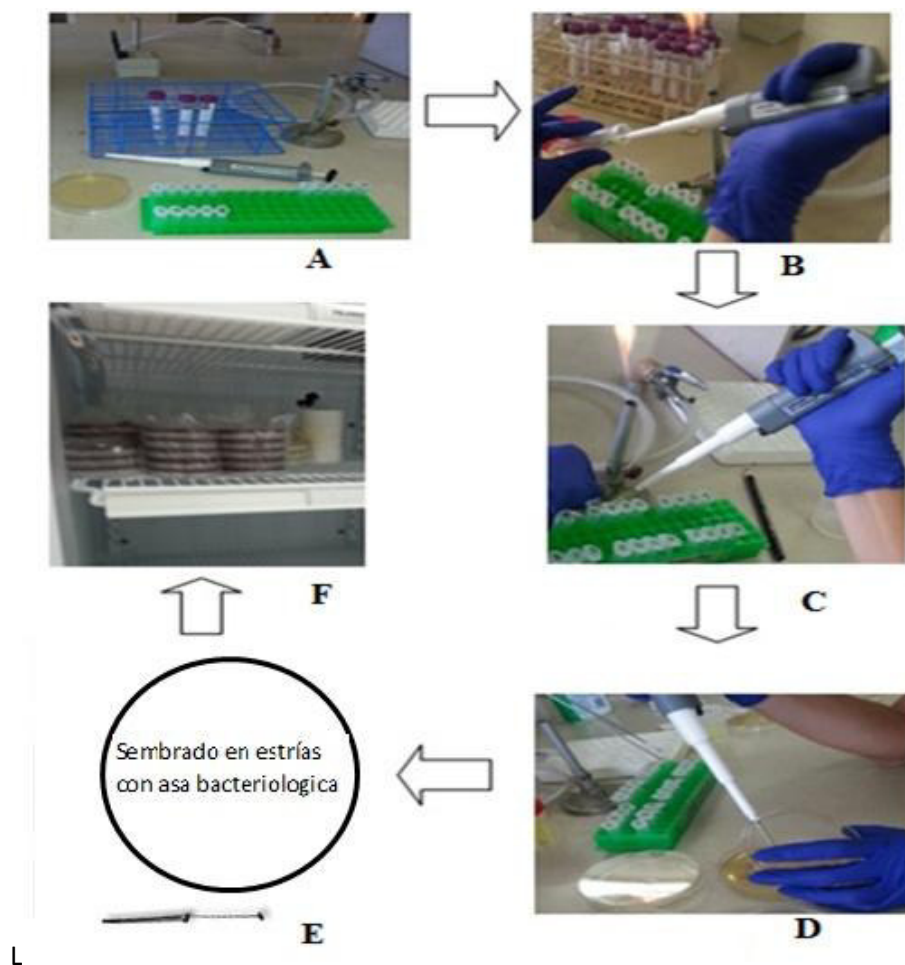


**Figura 8** Metodología para la determinación de la actividad antimicrobiana mediante el método de dilución en tubo y el conteo de células viables.

De cada tubo de la serie B se realizara una siembra por bacteria con su medio de cultivo correspondiente. Hay que recordar que el primer tubo de cada bacteria de la serie B, cuenta con una concentración aproximada de 10<sup>7</sup> bacterias por lo que se toma de partida dicho número en la primera caja de petri del sembrado.

Cada caja de petri se incubo a 35°C por 18 horas realizando posteriormente el conteo manual de colonias viables y el cálculo UFC/ mL. Se considerara una bacteria "sensible"

aquella que presente una disminución en el crecimiento de al menos 10 veces del número de UFC con respecto al control. (15). Ver **Figura 9**.



**Figura 9** Realización de serie B y sembrado. **A**. Materiales a utilizar. **B**. Extracción de 20  $\mu\text{L}$  del tubo de serie A y colocación al tubo de serie B que contiene 2 cc de SSN. **C**. Toma de alícuota de 20  $\mu\text{L}$  del primer tubo de la serie B al siguiente. **D**. Colocación de 20  $\mu\text{L}$  de la muestra de cada tubo en caja de petri. **E**. Sembrado en estrías de la muestra en el medio correspondiente para cada bacteria. **F**. Incubación de las cajas de petri sembradas a 35°C por 18 horas.

### Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron tabulados en el programa Microsoft Excell 2010 y posteriormente analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism versión 6, utilizando la prueba de kolmogorov-smirnov mostrando las características no paramétricas



de las variables por lo que se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para y el análisis post hoc de Dunn.

## Resultados

### Obtención del PRP

A la muestra de sangre venosa tomada de cada uno de los voluntarios se le determinó la concentración de plaquetas, la cual fue analizado en el Laboratorio Hospital de Diagnóstico.

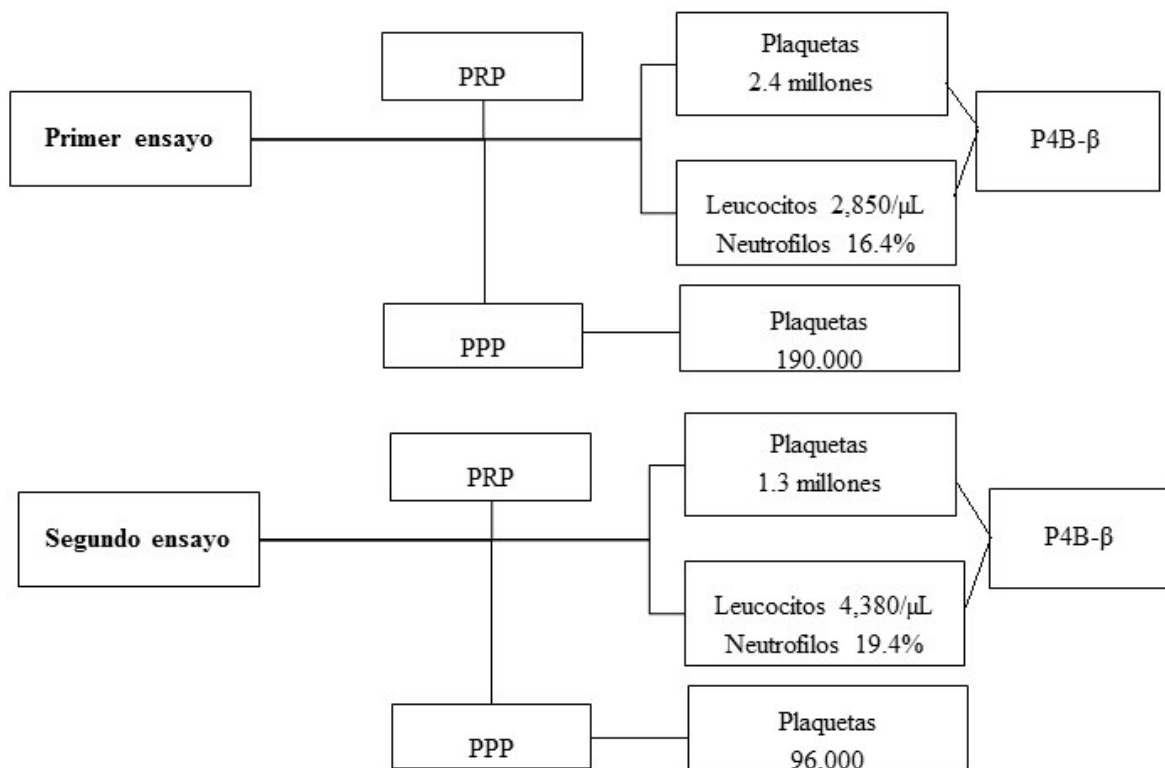
Tabla 4 Selección de donante

Voluntarios del estudio	Nivel basal de plaquetas
Participante 1	180,000/ $\mu$ L
Participante 2	105,000/ $\mu$ L
Participante 3	308,000/ $\mu$ L

Con estos resultados y según nuestro criterio de inclusión, la muestra seleccionada fue el voluntario 3. De la muestra obtenida de dicho voluntario también se le realizó un leucograma el cual obtuvo un valor de 9,000 leucocitos/ $\mu$ L.

Posteriormente, se inició el proceso de doble centrifugación con los siguientes valores para el primer ensayo: 2.4 millones de plaquetas por  $\mu$ L (7.7 veces sobre el valor basal) y un leucograma de 2,850 leucocitos/ $\mu$ L, Neutrofilos de 16.4% ó  $0.47 \times 10^3/\mu$ L. Y para el segundo ensayo: 1.3 millones de plaquetas por  $\mu$ L (4.2 veces sobre el valor basal), leucograma de 4,380 leucocitos/ $\mu$ L, Neutrofilos de 19.4% ó  $0.85 \times 10^3/\mu$ L. Logrando así la obtención de un PRP satisfactorio según la clasificación establecida en ambos ensayos.

Con estas características podemos decir que los PRP obtenidos corresponden a P4B- $\beta$  según la clasificación PAW y que el PPP obtenido cumple los requisitos de un plasma pobre en plaquetas al no poder ser incluido en ninguna de las categorías de la clasificado PAW. Ver **Figura 10** y **Tabla 5**.



**Figura 10** Clasificación del PRP según sistema PAW.

**Tabla 5** Resultados obtenidos. A continuación se muestran las concentraciones de plaquetas en cada uno de los ensayos 1 y 2.

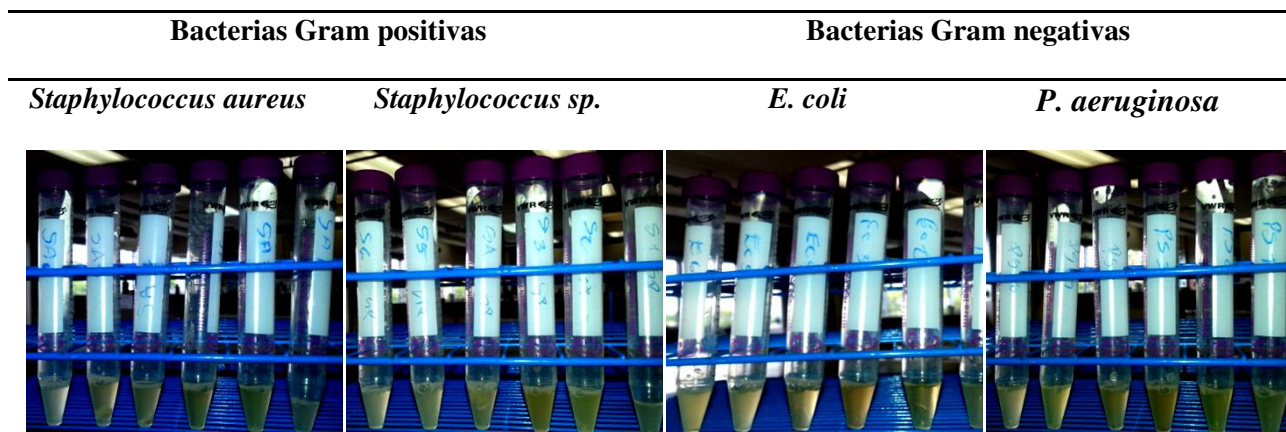
Tubos	Número de plaquetas Ensayo 1	Número de plaquetas Ensayo 2
Tubo 1 TSB	---	---
Tubo 2 PPP $1/2$	95,000/ $\mu$ L	48,000/ $\mu$ L
Tubo 3 PRP $1/2$	1,200,000/ $\mu$ L	650,000/ $\mu$ L
Tubo 4 PRP $1/5$	600,000/ $\mu$ L	325,000/ $\mu$ L
Tubo 5 PRP $1/10$	300,000 / $\mu$ L	130,000 / $\mu$ L
Tubo 6 PRP $1/20$	150,000 / $\mu$ L	65,000 / $\mu$ L

### Medición de la actividad antibacteriana del PRP

#### Determinación de la actividad antimicrobiana mediante la inspección visual e la turbidez.

La **Figura 11**, **Tabla 6** y **Gráfica 1** muestran los resultados de la medición por inspección visual de la turbidez de los tubos de las series ensayadas por grupos bacterianos. El análisis estadístico de los resultados refleja que no existen diferencias estadísticas significativas ( $P=0.34$ ) en la turbidez producto del crecimiento de las bacterias. Sin embargo, la mayor disminución de la turbidez producto de la actividad antibacteriana se observó para *E. coli*

en los tubos 2 y 3 correspondientes a PPP y PRP. En los tubos 2 y 3 así como 2, 3 y 4 de las series de *Staphylococcus sp.* y *Staphylococcus aureus* se observó la presencia de un coágulo que dificultó la lectura de la turbidez en ambas series. El coágulo fue más prominente en los tubos de *S. aureus*. Estos tubos corresponden a las mayores concentraciones de plasma ya sea PPP o PRP.



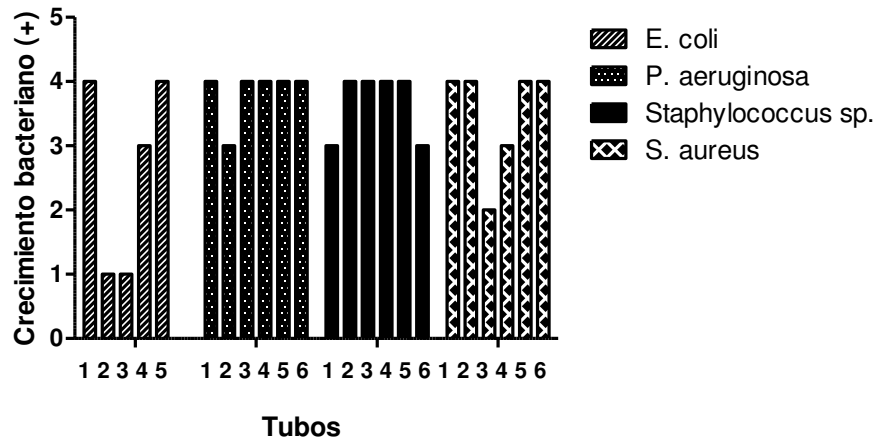
**Figura 11** Apariencia de tubos de la serie A

**Tabla 6** Medición visual en cruces de la turbidez en los tubos de la serie A. Los números representan el número de cruces.

Bacteria	Turbidez Inicial	Después de incubación por 18 horas					p <sup>a</sup>
		Tubo1	Tubo2	Tubo3	Tubo4	Tubo 5	
<i>S. aureus</i>	0	1	2 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	4	3	0.060
<i>Staphylococcus sp.</i>	0	2	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	3	4	
<i>E. coli</i>	0	4	4	2	2	3	
<i>P. aeruginosa</i>	0	4	3	3	3	3	

<sup>a</sup> Análisis de Kruskal Wallis

<sup>b</sup> Presencia de coágulo.

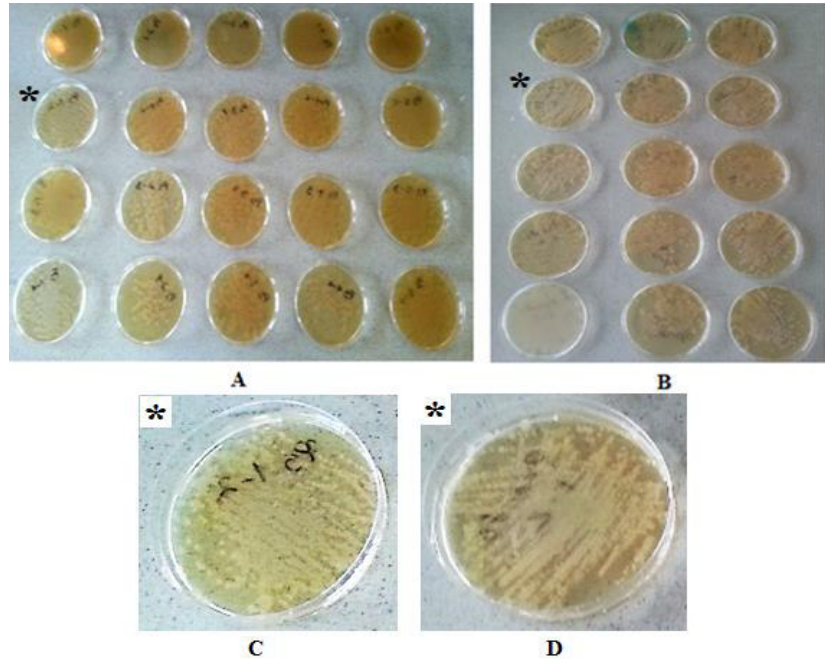


**Gráfica 1.** Representación de la turbidez obtenida para cada bacteria de la serie A. Las barras representan los tubos utilizados con distintas condiciones experimentales para cada bacteria (TSB, PPP 1/2, PRP 1/2, PRP 1/4, PRP 1/10, PRP 1/20). Valor  $p= 0.3499$  obtenido por la prueba de Kruskal-Wallis.

### Determinación de la actividad antibacteriana mediante la determinación de las UFC

El conteo de las colonias en placas se realizó de manera manual para cada una de las bacterias en estudio. Las siembras cuyo número era imposible de contar manualmente ya sea por una cantidad excesiva de placas o por la fusión de múltiples colonias se definieron como "Incontables". (Ver **Anexos 1-3**) No se pudo realizar el conteo de placas viables de *P. aeruginosa*, debido a que la cantidad de colonias eran incontables en todas las muestras utilizadas. Ver **Anexo 4** y **Figura 12**.

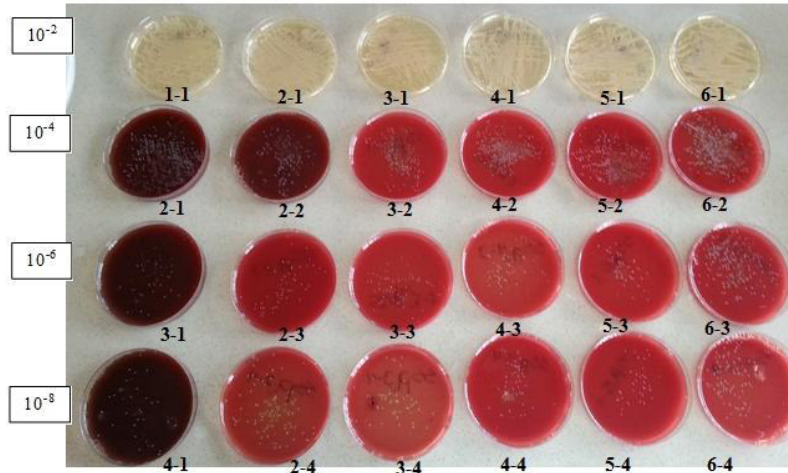
*E.coli* fue excluida del segundo ensayo debido a que presentó contaminación durante el crecimiento. Ver **Figura 13**.



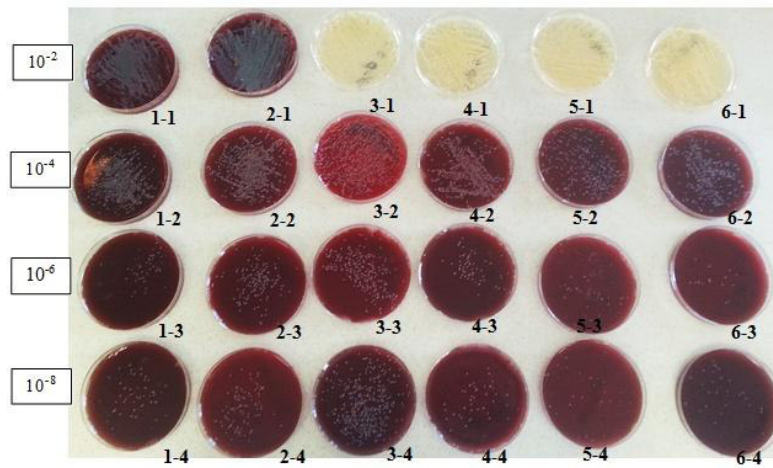
**Figura 12** Placas viales de *P. aeuroginosa*. **A.** Crecimiento bacteriano, primer ensayo. **B.** Crecimietno bacteriano, segundo ensayo. **C.** Acercamiento del sembrado1-2 del primer ensayo (incontable). **D.** Acercamiento del sembrado1-2 del segundo ensayo (incontable).



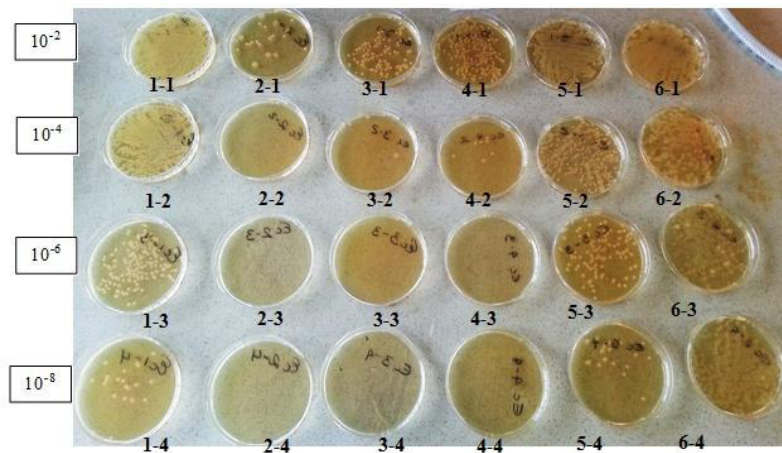
**Figura 13** *E. coli* segundo ensayo



**Figura 14** Imagen de las placas de *Staphylococcus aureus* donde se realizó el conteo bacteriano.

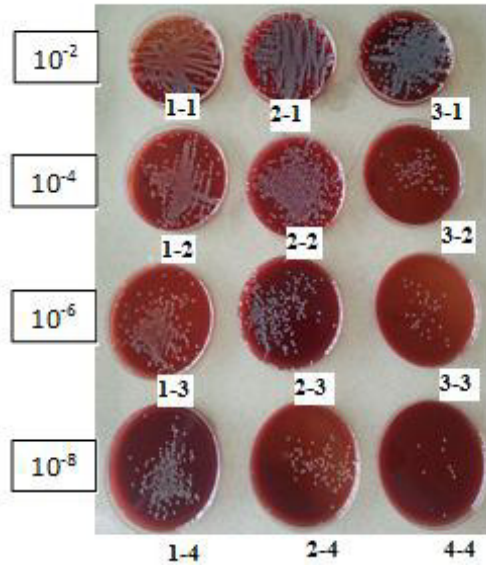


**Figura 15** Imagen de las placas de *Staphylococcus sp* donde se realizó el conteo bacteriano.

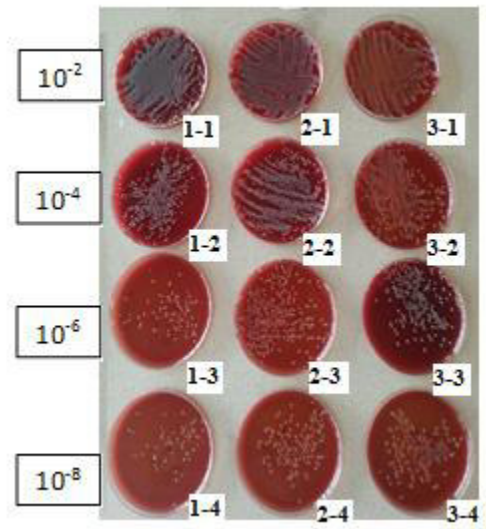


**Figura 16** Imagen de las placas de *E. coli* donde se realizó el conteo bacteriano.





**Figura 17** Imagen de las placas de *Staphylococcus aureus* donde se realizó el conteo bacteriano. Segundo ensayo.



**Figura 18** Imagen de las placas de *Staphylococcus sp* donde se realizó el conteo bacteriano. Segundo ensayo.

### Conteo manual de placas viables

La **Tabla 7**, **Gráfica 2**, **Gráfica 3** y **Gráfica 4** muestran los resultados del conteo manual de placas viables por grupos bacterianos durante el ensayo 1. El análisis estadístico mostrado en la **Tabla 7** no encontró diferencias en la cantidad de UFC/ml entre los grupos control, PPP<sup>1/2</sup>, PRP<sup>1/2</sup>, PRP<sup>1/5</sup>, PRP<sup>1/10</sup> y PRP<sup>1/20</sup> y tampoco se encontraron diferencias con la prueba post hoc de Dunn. A pesar de esto, es de notar que *E. coli* obtuvo valor p de 0.064 lo que sugiere una posible tendencia. Al examinar detenidamente los valores de *E. coli* se

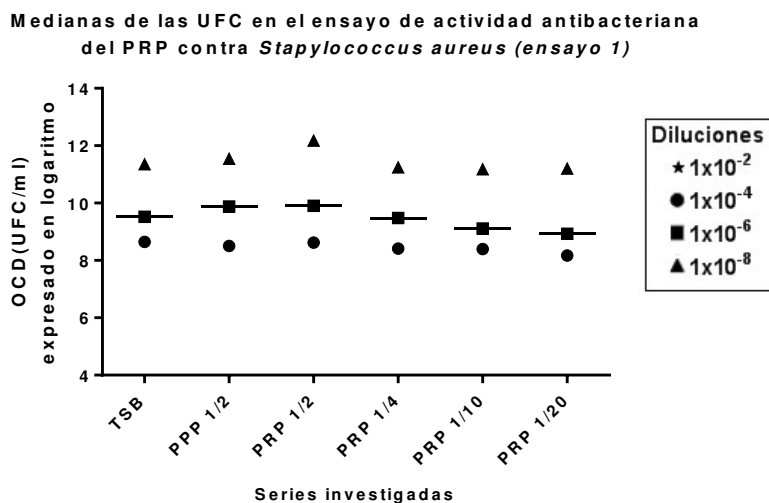
observa un decremento en el número de UFC/mL, esta tendencia queda ejemplificada en la **Gráfica 4**, lo que sugiere un posible efecto antibacteriano. La **Gráfica 2**, **Gráfica 3** y **Gráfica 4** ilustran la distribución de los datos obtenidos para las diferentes bacterias. Se observa a la derecha la leyenda con los símbolos de las diferentes diluciones. No fue posible obtener resultados para todas las diluciones ya que en algunas (como es el caso de la dilución de  $1 \times 10^{-2}$ ) las colonias fueron muy numerosas para ser contadas y fueron excluidas del análisis. La raya en medio de las series de datos representa la mediana. Con estos gráficos se pretende mostrar que no hubo diferencia en las medianas de los grupos.

**Tabla 7** Medianas de UFC/ml obtenidas durante el ensayo 1. Los valores se expresan en notación exponencial.

Bacteria	Control	PPP <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	PRP <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	PRP <sup>1</sup> / <sub>5</sub>	PRP <sup>1</sup> / <sub>10</sub>	PRP <sup>1</sup> / <sub>20</sub>	P <sup>a</sup>
<b>Bacterias Gram +</b>							
<i>S. aureus</i>	4x10 <sup>9</sup>	2 x10 <sup>9</sup>	3 x10 <sup>9</sup>	3 x10 <sup>9</sup>	3 x10 <sup>9</sup>	7 x10 <sup>9</sup>	1.000
<i>Staphylococcus sp.</i>	3 x10 <sup>9</sup>	8 x10 <sup>9</sup>	8 x10 <sup>9</sup>	3 x10 <sup>9</sup>	1 x10 <sup>9</sup>	9 x10 <sup>8</sup>	0.895
<b>Bacterias Gram -</b>							
<i>E. coli</i>	5 x10 <sup>10</sup>	2.85x10 <sup>5</sup>	1 x10 <sup>6</sup>	5.4x10 <sup>5</sup>	3 x10 <sup>10</sup>	--- <sup>b</sup>	0.064
<i>P. aeruginosa</i>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>	--- <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Análisis de Kruskal-Wallis

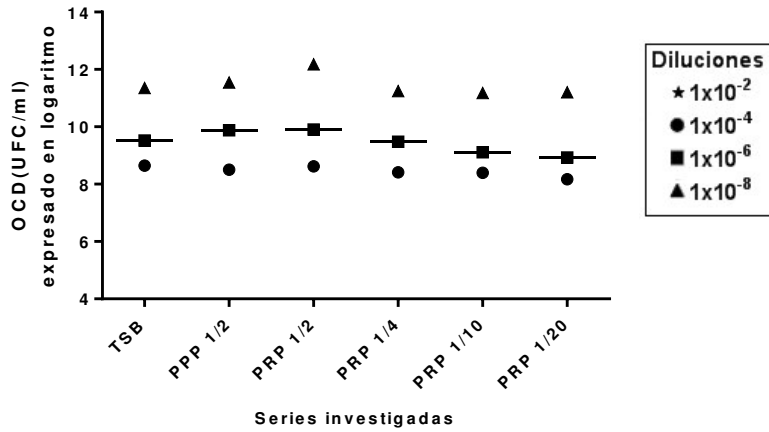
<sup>b</sup>Fueron excluidos del análisis las placas en las que el conteo de colonias resultó muy dificultoso o hubo contaminación.



**Gráfica 2** Unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus aureus* obtenidas en cada serie estudiada. Ensayo 1. p=1.000. Ver **Figura 14**

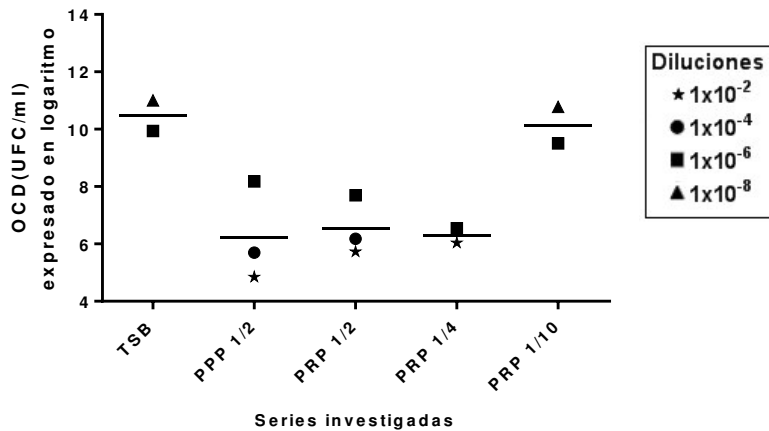


Medianas de las UFC en el ensayo de actividad antibacteriana del PRP contra *Staphylococcus sp.* (ensayo 1)



**Gráfico 3** Unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus sp.* obtenidas en cada serie estudiada. Ensayo 1.  $p=0.895$  Ver **Figura 15**

Medianas de las UFC en el ensayo de actividad antibacteriana del PRP contra *Escherichia coli* (ensayo 1)



**Gráfico 4** Unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* obtenidas en cada serie estudiada. Ensayo 1.  $p=0.064$ . Ver **Figura 16**

La **Tabla 8**, **Gráfico 5** y **Gráfico 6** muestran los resultados del conteo manual de placas viables por grupos bacterianos durante el ensayo 2. El análisis estadístico mostrado en la **Tabla 8** no encontró diferencias en la cantidad de UFC/mL entre los grupos control, PPP<sup>1/2</sup>, PRP<sup>1/2</sup>. A diferencia de la **Gráfico 2**, en la **Gráfico 5** se observa una tendencia hacia la disminución en el número de UFC/mL aunque no se observa tan marcadamente como en el caso de *E. coli* en la **Gráfico 4**. La **Gráfico 5** y **Gráfico 6** muestran la distribución de los datos obtenidos. No hay diferencia en las medianas de estas series.

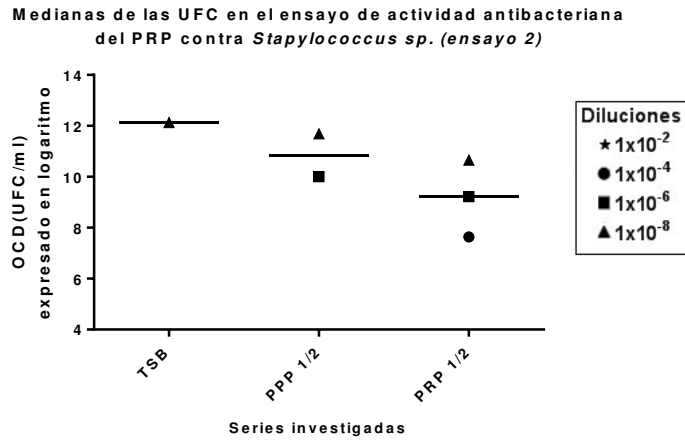
**Tabla 8** Medianas de UFC/mL obtenidas durante el ensayo 2. Los valores se expresan en notación exponencial.

Bacteria	Control	PPP <sup>1/2</sup>	PRP <sup>1/2</sup>	P <sup>a</sup>
<b>Bacterias Gram +</b>				
<i>S. aureus</i>	1x10 <sup>12</sup>	2x10 <sup>11</sup>	2x10 <sup>9</sup>	0.4000 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus sp.</i>	5x10 <sup>9</sup>	5x10 <sup>11</sup>	1x10 <sup>10</sup>	0.3964
<b>Bacterias Gram -</b>				
<i>E. coli</i>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>	--- <sup>c</sup>

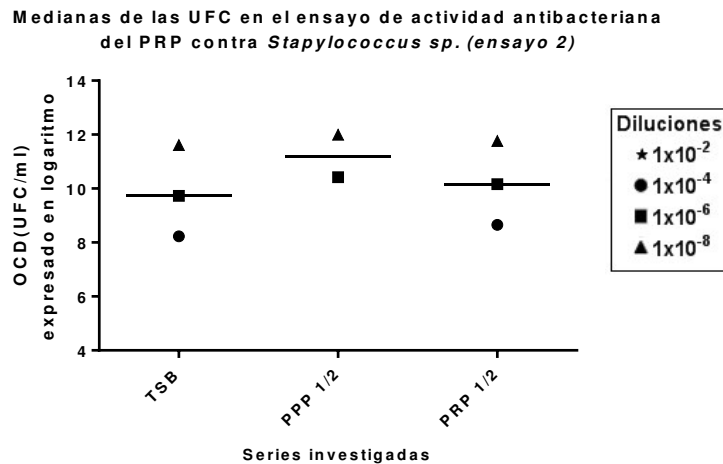
<sup>a</sup> Análisis de Kruskal-Wallis

<sup>b</sup> Este valor p se calculó entre PPP<sup>1/2</sup> y PRP<sup>1/2</sup> ya que el control solo tenía un valor.

<sup>c</sup> Fueron excluidos del análisis las placas en las que el conteo de colonias resultó muy dificultoso o hubo contaminación.

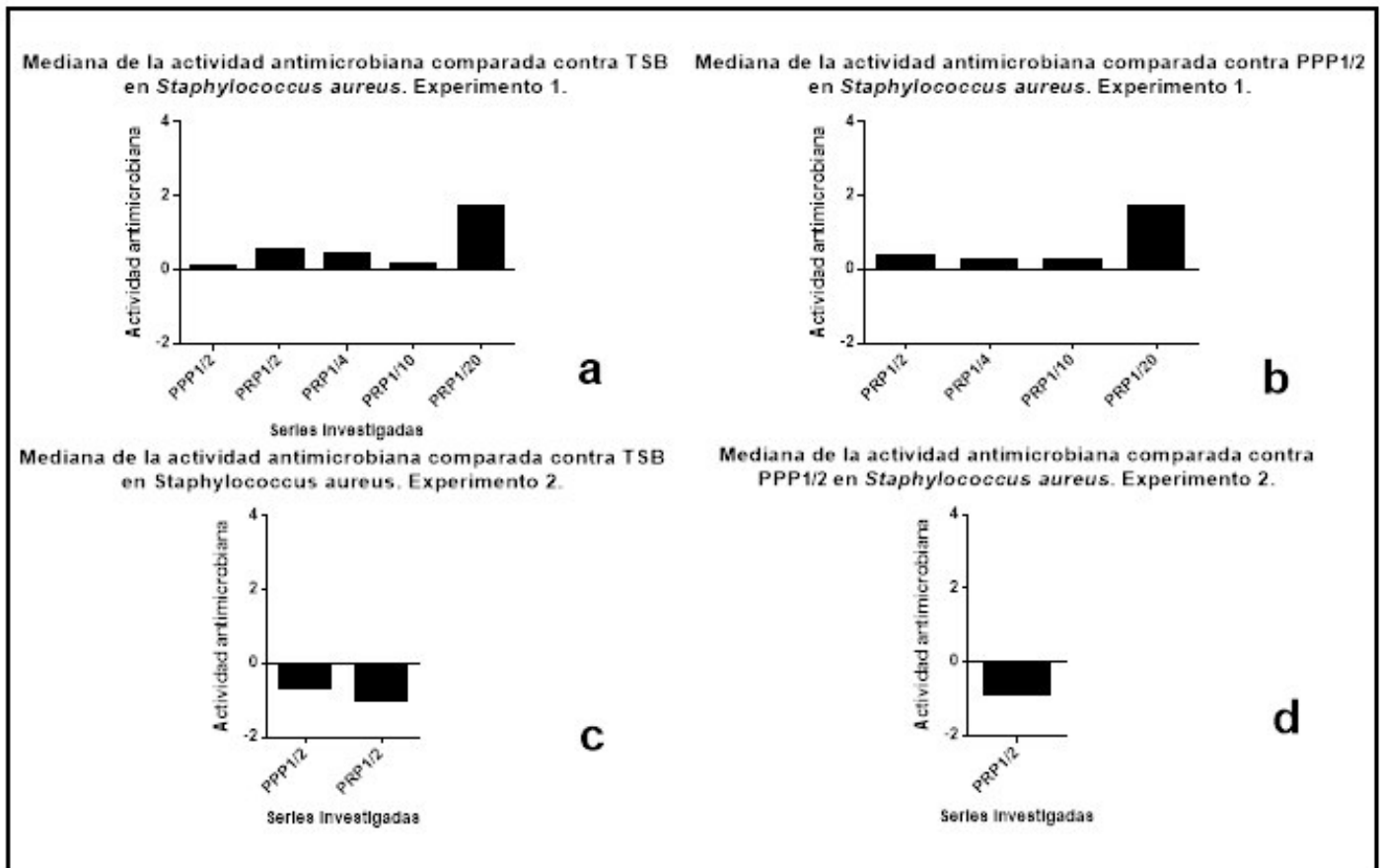


**Gráfica 5** Unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus aureus* obtenidas en cada serie estudiada. Ensayo 2. Ver **Figura 17**



**Gráfica 6** Unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus sp.* obtenidas en cada serie estudiada. Ensayo 2.  $p=0.396$  Ver **Figura 18**

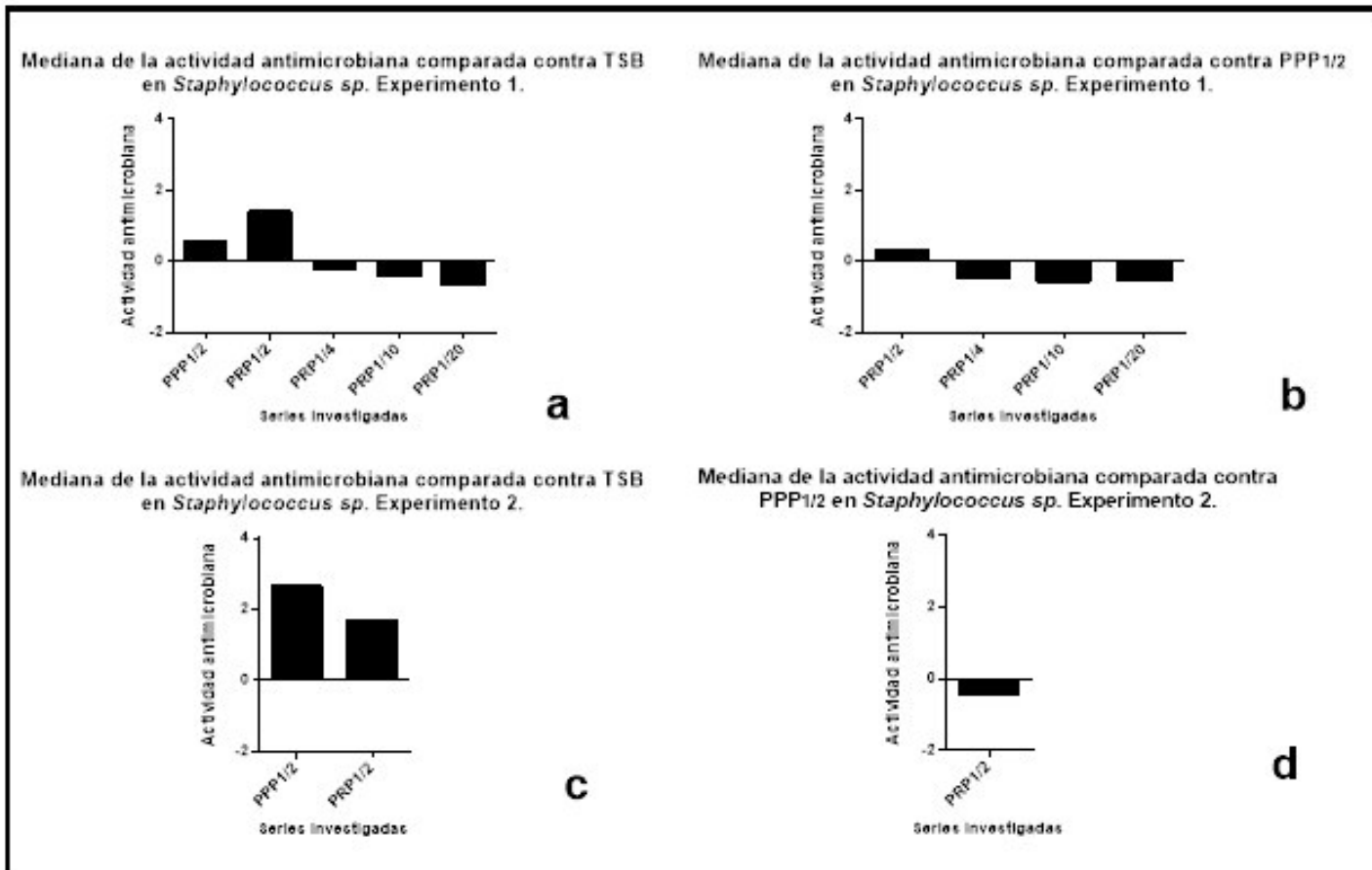
### Tasa antibacteriana



**Gráfica 7** Medición de la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. El segmento a tiene un valor  $p=0.907$ , el b tiene un valor de  $p=0.8056$ , no es posible medir el valor p de c y d ya que tienen muy pocos datos. Los valores fueron obtenidos por el test de Kruskal-Wallis.

Los datos del ensayo 1 y 2 no son consistentes, en el primero no se encontró actividad antibacteriana para las diluciones que contenían PRP al compararlo contra TSB (control) y PPP1/2 ya que no hubo una reducción en el crecimiento para considerarla sensible.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupo del primer ensayo ( $p=0.907$  y  $p=0.8056$ ). Mientras que en el segundo ensayo sí hubo reducción en el crecimiento bacteriano por lo que se puede decir que fue sensible a la presencia del plasma. Sin embargo dado que en algunos grupos solo hubo una muestra, no fue posible calcular el valor p.

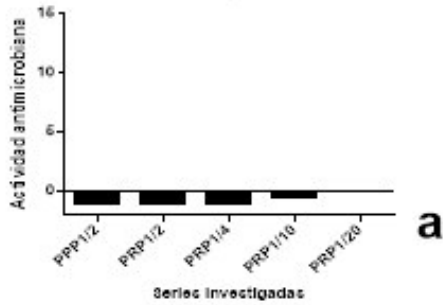


**Gráfica 8** Medición de la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus sp.* El segmento a tiene un valor  $p=0.003$  (no hubo diferencias en el análisis post hoc), el segmento b tiene un valor  $p=0.050$  (tampoco hubo diferencias en el análisis post hoc), el segmento c tuvo un valor  $p=0.800$ .

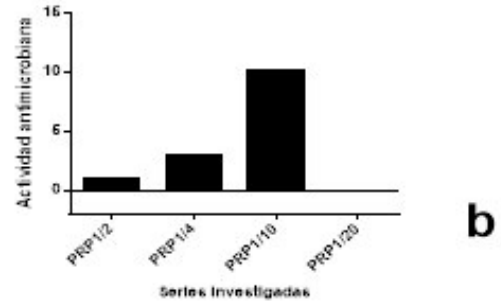
En el primer ensayo se encontró sensibilidad bacteriana a la presencia de las diluciones con PRP con respecto al TSB y PPP. También se encontró una diferencia estadística entre los grupos ( $p=0.003$  y  $p=0.050$ ) sin embargo no hubo diferencia en el análisis post hoc de Dunn.

En el segundo ensayo no se encontró actividad antibacteriana al contrastarlo contra TSB, pero sí al compararlo contra PPP1/2. Sin embargo no hay una diferencia estadística significativa ( $p=0.800$ ).

Mediana de la actividad antimicrobiana comparada contra TSB en *E. coli* Experimento 1.



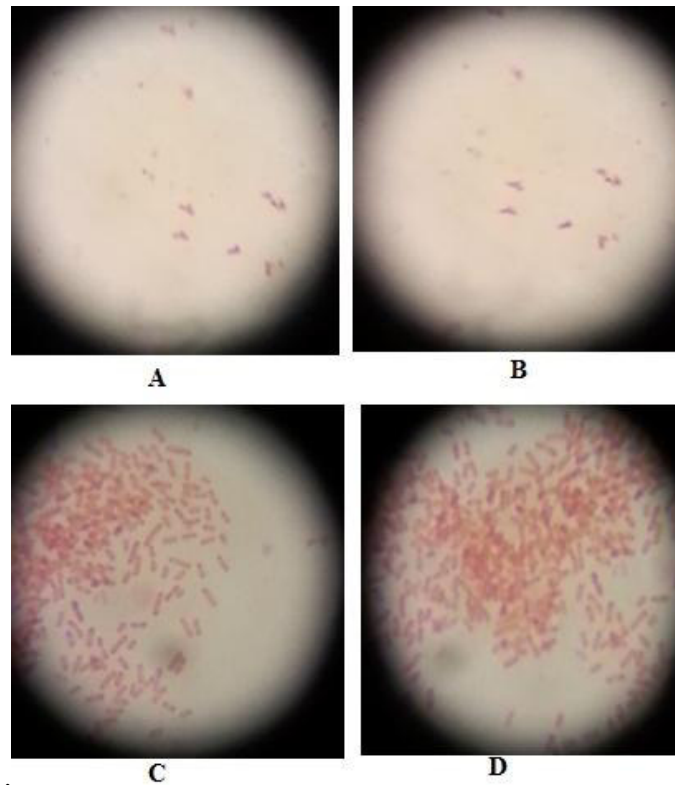
Mediana de la actividad antimicrobiana comparada contra PPP en *E. coli* Experimento 1.



**Gráfica 9** Medición de la actividad antimicrobiana sobre *E. coli*. El segmento a tiene un valor  $p=0.222$  y el b tiene un valor  $p=0.9714$ . El valor de a fue obtenido con Kruskal-Wallis y b con U de Mann-Whitney.

En el primer ensayo se observó disminución en el crecimiento bacteriano al comparar las diluciones del PRP con el TSB, mientras que al compararlo con el PPP no se observa disminución en el crecimiento bacteriano. No hubo diferencia estadística significativa entre los grupo ( $p=0.222$  y  $p=0.9714$ ).

**Tinción Gram**



**Figura 12** Tinción Gram. **A:** *Staphylococcus aureus*. **B:** *Staphylococcus sp.* **C:** *E. coli* **D:** *Pseudomona aeruginosa*. Visto al 100X.

## Discusión

La porción obtenida de PRP a través de la doble centrifugación logró una concentración de plaquetas de 7.7 veces sobre el valor basal de la muestra utilizada, siendo está similar a las obtenidas por Jove et al (+/- 10 veces sobre el valor basal) y como Chan et al logrando 8.1 veces sobre el valor basal.(13)(14)

Estudios que utilizaron una sola centrifugación para la obtención del PRP lograron una concentración de plaquetas similar a la obtenida con dos centrifugaciones como por ejemplo el estudio de Moojen et al donde obtuvieron hasta 8 veces el valor basal y en el de Bielicki et al, el cual lograron concentrar la muestra hasta 7.6 veces el valor basal con una sola centrifugación (11) (2).

Esto muestra que ambos métodos son válidos y dependerá mucho del uso que se le quiera dar al PRP y los recursos disponibles para decidir qué método utilizar.

En cuanto al efecto del PRP sobre las bacterias en estudio, los resultados obtenidos en la inspección visual de la turbidez, dado que no hubo diferencia significativa para cada bacteria ( $P= 0.06$ ), nos indica que no podemos afirmar que el PRP tenga acción antibacteriana contra alguna de las 4 bacterias en estudio utilizando solamente esta prueba.

En el primer ensayo para *S. aureus* dado que no hubo diferencia estadística significativa entre los grupos en cuanto a la tasa antibacteriana ni disminución en el crecimiento bacteriano (en base a las UFC) por lo que podemos afirmar que el PRP no presentó actividad antibacteriana contra dicha bacteria. Sin embargo en el segundo ensayo si se muestra inhibición del crecimiento bacteriano, con una disminución de  $10^{-1}$  en el conteo de UFC pero los datos no son suficientes para poder aplicar un análisis estadístico, por lo que a pesar de este resultado no podemos afirmar que posee efecto antibacteriano contra dicha bacteria. Estos resultados son congruentes con la controversia que existe actualmente sobre si el PRP posee o no actividad antibacteriana contra *S. aureus* como lo descrito por Huapaya et al. (12)

Consideramos que esta diferencia en los resultados publicados se pueda deber a las diferentes serotipos de *S. aureus* que se han utilizado pero que no se han descrito, entre otras variables como la obtención y la aplicación del PRP por lo que es necesario seguir investigando dicho efecto.

En *Staphylococcus sp.* no se observó disminución en el conteo de UFC sin embargo, hubo diferencia estadística significativa en cuanto a la tasa antibacteriana en las diluciones que contenían PRP al comparar con el control ( $p=0.03$ ) y con el PPP ( $p=0.05$ ). En el segundo ensayo no se encontró una diferencia estadística significativa en la tasa antibacteriana ( $p=0.8$ ). En ambos casos, tras el análisis post hoc de Dunn, se encontró que no había diferencia significativa por lo tanto no podemos afirmar que el PRP tenga efecto antibacteriano. Estos resultados eran de esperarse dadas las similitudes entre ambos *Staphylococcus* en estudio por lo que al igual que *S. aureus*, serán estudios más especializados los que podrán dilucidar realmente el alcance antibacteriano del PRP.

En cuanto a la bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* mostro una reacción muy diferente ante la presencia de PPP y PRP que las bacterias Gram positivas estudiadas. En

cuanto al conteo de UFC en el primer ensayo, se observó una disminución en el crecimiento bacteriano en PRP de  $10^{-4}$  y en PPP  $10^{-5}$  indicando mayor inhibición en presencia de PPP que de PRP ( $p=0.06$ ). Al comparar la tasa antibacteriana del PRP con TSB se observó claramente una diferencia (tasa antibacteriana -0.98).

Las diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativas pero la tendencia de todos es de presentar un efecto antibacteriano.

Sin embargo al compararlos contra PPP dicho efecto no se observa, lo que sugiere que el efecto antibacteriano es dado por otro componente plasmático adicional a las plaquetas, el cual se va diluyendo progresivamente. Se ha sugerido que el PPP puede tener efecto antibacteriano debido a la presencia de péptidos antimicrobiales y otros factores similares presentes en la fisiología normal del plasma. Adicionalmente se debe considerar la presencia de dichas moléculas antimicrobianas por ruptura ya sea de plaquetas o glóbulos blancos durante el proceso de centrifugación. (11)

Estos resultados son congruentes con los encontrados con los obtenidos por Bielecki et al el cual utilizó aislados clínicos. Sin embargo en el estudio realizado por Chen et al a pesar de que describen actividad antibacteriana contra *E.coli*, sugieren que dicha actividad no es por el efecto de las plaquetas sino más bien por la presencia de antibióticos previo. (2) (13).

Con respecto a *Pseudomona aeruginosa* no se pudo realizar análisis estadístico ya que fue imposible realizar conteo de colonias. Esto sugiere que el PRP no demostró efecto inhibitorio en el crecimiento. Dichos resultados coinciden con algunas de las bibliografías previamente citadas.

Algunas de las limitantes fueron la falta de material, el costo económico de todos los materiales necesarios para realizar la investigación y el tiempo de disponibilidad de los investigadores. Así como el grado de contaminación que presentó la cepa de *E.coli* tanto en la dilución 1/20 del primer ensayo, como en todas las siembras del segundo ensayo por lo que tuvieron que ser excluidas del estudio. El costo económico no permitió extender más el estudio y tampoco permitió que el segundo ensayo fuera realizado con las mismas diluciones que el primero y por esta misma razón no se pudo repetir las cepas contaminadas. La lectura de las colonias viables solo se pudo realizar una vez (a las 18 horas de incubación) debido a la disponibilidad de tiempo.

Las ventajas que encontramos en el desarrollo del estudio fue la facilidad para la obtención de las cepas bacteriológicas, el personal para la extracción de la sangre a los voluntarios y la disponibilidad de la centrifuga que se pudieron obtener dentro de la facultad.

## Conclusión

La metodología utilizada en esta investigación para la obtención del PRP es fácil de reproducir, bajo costo económico y factible para utilizarlo en futuras investigaciones sobre la actividad antibacteriana del PRP en bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Dando como resultado valores de concentración plaquetaria óptimos tanto como para regeneración tisular como para efecto antibacteriano. Pudiendo de esta manera clasificar el PRP en un valor según estándares internacionales para su segura utilización siendo uno de estos el sistema PAW el cual es un sistema factible, sencillo de aplicar y útil para la estandarización de concentrados de plaquetas. Dicha clasificación hace más fácil la reproducibilidad de datos obtenidos en diferentes investigaciones.

Adicionalmente en nuestra investigación encontramos que no hay diferencia estadística significativa en cuanto al conteo de UFC en los grupos estudiados de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp*, sin embargo si se observó diferencia significativa en *Escherichia coli*. No podemos afirmar que hay actividad antibacteriana del PRP en las bacterias estudiadas, sin embargo hay una tendencia de efecto antibacteriano (calculado por la tasa antibacteriana) principalmente en *E.coli*. Dicha actividad pudiera ser atribuida a componentes del plasma y no exclusivamente al efecto de las plaquetas por lo que será necesario realizar más estudios.

Los estudios pueden ampliarse a otras bacterias y microorganismos, que posteriormente se puede extrapolar a otros modelos de investigación para poder lograr su utilización como tratamiento coadyuvante en regeneración tisular como antibacteriano. Y de esta manera acortar el tiempo de duración de tratamiento como el costo de los mismos.



## **Recomendaciones**

Estudios como el que se presentó en este documento, pretenden ser un punto de partida para realizar nuevas investigaciones acerca del efecto antibacteriano del PRP con el fin de comprender mejor su mecanismo y su espectro *in vitro*. Sin embargo, futuras investigaciones deben de considerar el modelo clínico en los que se puede aplicar el PRP y valorar la reacción de este en un ambiente más fisiológico, considerando aquellos microorganismos de mayor importancia en la infección de tejidos blandos.

Adicionalmente se debe tomar en cuenta el tiempo de estudio, el costo y los cuidados necesarios al momento de la manipulación de las muestras para evitar contaminación.

Es de mucha importancia continuar la investigación del efecto para posteriormente promoverlo como un tratamiento coadyuvante en el tratamiento farmacológico convencional.

## Bibliografía

1. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol.* 2013;13(1):47.
2. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Król W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances AN IN VITRO STUDY. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 Mar 1;89-B(3):417–20.
3. Astrid Irene Abrego Garcia, Elena María Abrego Portillo, Charlene Elizabeth Naves Canizales. Modelo Animal: Efecto del Plasma Rico en Plaquetas en la Regeneración Tisular de Quemaduras de Segundo Grado. [El Salvador, San Salvador]: Universidad Dr. José Matias Delgado; 2012.
4. Marcia Esther Aquino Amaya,, Emma Dinorah Avelar Bonilla,, Wendy Vanessa Turcios Torres. Validación de una metodología para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas en El Salvador. [El Salvador, San Salvador]: Universidad Dr. Jose Matias Delgado; 2013.
5. Klinger MHF, Jelkmann W. Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Sep;22(9):913–22.
6. MD ACG, PhD JEH. *Fisiología Medica*, 11e. 11th ed. Elsevier Espana; 2006. 1104 p.
7. Yeaman MR. Platelets in Defense Against Bacterial Pathogens. *Cell. Mol. Life Sci* 2010 Nov 67:525–544.
8. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-Rich Plasma: A Milieu of Bioactive Factors. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2012 Mar;28(3):429–39.
9. Mazzocca AD. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. *J Bone Jt Surg Am.* 2012 Feb 15;94(4):308.
10. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2012 Jul;28(7):998–1009.
11. Moojen DJF, Everts PAM, Schure R-M, Overdevest EP, van Zundert A, Knape JTA, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008 Mar;26(3):404–10.
12. Huapaya Lazo CE, Noriega Castañeda JR. Efecto inhibitor del crecimiento bacteriano in vitro del plasma rico en plaquetas. *Kiru.* 2008 Jun;5(1):2–23.
13. Chen L, Wang C, Liu H, Liu G, Ran X. Antibacterial Effect of Autologous Platelet-Rich Gel Derived from Subjects with Diabetic Dermal Ulcers In Vitro. *J Diabetes Res [Internet].* 2013 Feb 28 [cited 2014 Jan 23];2013. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2013/269527/abs/>

14. Li H, Li B. PRP as a new approach to prevent infection: preparation and in vitro antimicrobial properties of PRP. *J Vis Exp JoVE*. 2013;(74).
15. PhD PRM. *Microbiologia Medica*, 5e. 5th ed. Elsevier Espana; 2006. 976 p.
16. Ray C, Ryan KJ. *Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. McGraw-Hill Medical; 2003. 992 p.
17. Beca T, Bascones A, Morante S, Hernandez G. Plasma rico en plaquetas. Una revision bibliografica [Internet]. 2007. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v19n1/original4.pdf>
18. Chess B. *Laboratory Applications in Microbiology: A Case Study Approach*. 1st ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; 2008. 576 p.
19. A safe and economic method for preparing PRP (platelet rich plasma):Part1 [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 21]. Available from: [http://www.youtube.com/watch?v=KEZdTCFcI4k&feature=youtube\\_gdata\\_player](http://www.youtube.com/watch?v=KEZdTCFcI4k&feature=youtube_gdata_player)
20. A safe and economic method for preparing PRP (platelet rich plasma):Part2 [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 21]. Available from: [http://www.youtube.com/watch?v=ZMAH4q7KChs&feature=youtube\\_gdata\\_player](http://www.youtube.com/watch?v=ZMAH4q7KChs&feature=youtube_gdata_player)
21. A safe and economic method for preparing PRP (platelet rich plasma):Part3 [Internet]. 2012 [cited 2013 Jun 21]. Available from: [http://www.youtube.com/watch?v=waWvu4zbn8U&feature=youtube\\_gdata\\_player](http://www.youtube.com/watch?v=waWvu4zbn8U&feature=youtube_gdata_player)
22. Katzung BG. *Basic & clinical pharmacology*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill; 2007. 716 p.

## Anexos

### Anexo 1. Base de datos para *S. aureus*. Ensayo 1

Serie	Número de tubo	Conteo de placas viables	OCD (UFC/ml)
Control	1-1	Incontables	Incontable
	1-2	968	4.84E+08
	1-3	43	2.15E+09
	1-4	29	1.45E+11
PPP $\frac{1}{2}$	2-1	Incontables	Incontable
	2-2	212	1.06E+08
	2-3	48	2.40E+09
	2-4	90	4.50E+11
PRP $\frac{1}{2}$	3-1	Incontables	Incontable
	3-2	287	1.44E+08
	3-3	67	3.35E+09
	3-4	45	2.25E+11
PRP $\frac{1}{4}$	4-1	Incontables	Incontable
	4-2	456	2.28E+08
	4-3	60	3.00E+09
	4-4	44	2.20E+11
PRP $\frac{1}{10}$	5-1	Incontables	Incontable
	5-2	900	4.50E+08
	5-3	61	3.05E+09
	5-4	34	1.70E+11
PRP $\frac{1}{20}$	6-1	Incontables	Incontable
	6-2	800	4.00E+08
	6-3	131	6.55E+09
	6-4	78	3.90E+11

### Anexo 2. Base de datos para *Staphylococcus sp.* Ensayo 1

Serie	Número de tubo	Conteo de placas viables	OCD (UFC/ml)
Control	1-1	Incontables	Incontable
	1-2	880	4.40E+08
	1-3	66	3.30E+09
	1-4	45	2.25E+11
PPP $\frac{1}{2}$	2-1	Incontables	Incontable
	2-2	640	3.20E+08
	2-3	152	7.60E+09
	2-4	70	3.50E+11
PRP $\frac{1}{2}$	3-1	Incontables	Incontable
	3-2	840	4.20E+08

	3-3	160	8.00E+09
	3-4	300	1.50E+12
PRP <sup>1/4</sup>	4-1	Incontables	Incontable
	4-2	520	2.60E+08
	4-3	60	3.00E+09
	4-4	35	1.75E+11
PRP <sup>1/10</sup>	5-1	Incontables	Incontable
	5-2	500	2.50E+08
	5-3	26	1.30E+09
	5-4	30	1.50E+11
PRP <sup>1/20</sup>	6-1	Incontables	Incontable
	6-2	298	1.49E+08
	6-3	17	8.50E+08
	6-4	32	1.60E+11

### Anexo 3. Base de datos para *E. coli*. Ensayo 1

Serie	Número de tubo	Conteo de placas viables	OCD (UFC/ml)
Control	1-1	Incontables	Incontable
	1-2	Incontables	Incontable
	1-3	172	8.60E+09
	1-4	20	1.00E+11
PPP <sup>1/2</sup>	2-1	14	7.00E+04
	2-2	1	5.00E+05
	2-3	3	1.50E+08
	2-4	0	0.00E+00
PRP <sup>1/2</sup>	3-1	108	5.40E+05
	3-2	3	1.50E+06
	3-3	1	5.00E+07
	3-4	0	0.00E+00
PRP <sup>1/4</sup>	4-1	216	1.08E+06
	4-2	7	3.50E+06
	4-3	0	0.00E+00
	4-4	0	0.00E+00
PRP <sup>1/10</sup>	5-1	Incontables	Incontable
	5-2	Incontables	Incontable
	5-3	64	3.20E+09
	5-4	12	6.00E+10
PRP <sup>1/20</sup>	6-1	Contaminado	Contaminado
	6-2	Contaminado	Contaminado
	6-3	Contaminado	Contaminado
	6-4	Contaminado	Contaminado

**Anexo 4. Base de datos para *P. aeruginosa*. Ensayo 1**

Serie	Número de tubo	Conteo de placas viables	OCD (UFC/ml)
Control	1-1	Incontables	---
	1-2	Incontables	---
	1-3	Incontables	---
	1-4	Incontables	---
PPP $\frac{1}{2}$	2-1	Incontables	---
	2-2	Incontables	---
	2-3	Incontables	---
	2-4	Incontables	---
PRP $\frac{1}{2}$	3-1	Incontables	---
	3-2	Incontables	---
	3-3	Incontables	---
	3-4	Incontables	---
PRP $\frac{1}{4}$	4-1	Incontables	---
	4-2	Incontables	---
	4-3	Incontables	---
	4-4	Incontables	---
PRP $\frac{1}{10}$	5-1	Incontables	---
	5-2	Incontables	---
	5-3	Incontables	---
	5-4	Incontables	---
PRP $\frac{1}{20}$	6-1	Incontables	---
	6-2	Incontables	---
	6-3	Incontables	---
	6-4	Incontables	---

**Anexo 5. Base de datos para *S. Aureus*. Ensayo 2**

Serie	Número de tubo	Conteo de placas viables	OCD (UFC/ml)
Control	1-1	Incontables	Incontable
	1-2	Incontables	Incontable
	1-3	Incontables	Incontable
	1-4	270	1.35E+12
PPP $\frac{1}{2}$	2-1	Incontables	Incontable
	2-2	Incontables	Incontable
	2-3	202	1.01E+10
	2-4	97	4.85E+11
PRP $\frac{1}{2}$	3-1 <sup>b</sup>	Incontables	Incontable
	3-2 <sup>b</sup>	86	4.30E+07
	3-3 <sup>b</sup>	33	1.65E+09
	3-4	9	4.50E+10

**Anexo 6. Base de datos para *Staphylococcus sp.* Ensayo 1**

<b>Serie</b>	<b>Número de tubo</b>	<b>Conteo de placas viables</b>	<b>Núm. aproximado de UFC</b>
Control	1-1	Incontables	Incontable
	1-2	336	1.68E+08
	1-3	107	5.35E+09
	1-4	82	4.10E+11
PPP½	2-1	Incontables	Incontable
	2-2	Incontables	Incontable
	2-3	528	2.64E+10
	2-4	197	9.85E+11
PRP½	3-1	Incontables	Incontable
	3-2	896	4.48E+08
	3-3	288	1.44E+10
	3-4	115	5.75E+11