

EFFECTO INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO BACTERIANO IN VITRO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS

INHIBITORY EFFECT OF BACTERIAL GROWTH IN VITRO PLATELET-RICH PLASMA

Carlos Enrique Huapaya Lazo¹, Jorge Noriega Castañeda²

Huapaya C, Noriega J. Efecto inhibidor del crecimiento bacteriano *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas. Kiru 2008, Vol 4 N°1

RESUMEN

Objetivo: determinar el efecto inhibidor del crecimiento bacteriano *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) sobre el *Estafilococo aureus*.

Material y método: se tomó 20cc de sangre a cada uno de los cinco pacientes que intervinieron en el estudio, obteniéndose el PRP activado con trombina bovina en cada una de las muestras. Se realizaron dos procedimientos diferentes, procesándose cada muestra por quintuplicado. En el primero se enfrenta al PRP puro y combinado con Ampicilina 500mg con el *Estafilococo aureus*, midiendo el halo de inhibición que se forma a las 24 horas. En el segundo procedimiento se enfrentó a los mismos compuestos con la misma bacteria, pero exponiéndolos en diferentes tiempos -uno, tres, cinco y quince minutos-, para observar la acción del PRP sobre el crecimiento bacteriano en diferentes momentos. Para el análisis de las variables se emplearon las pruebas ANOVA, prueba de esfericidad de Mauchly, la prueba de Scheffé y la corrección de Bonferrini.

Resultados: el PRP no presentó ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano en ninguna de las pruebas realizadas. Los halos de inhibición que se obtuvieron por parte del PRP en la primera prueba tuvieron un valor de 0 en todas las muestras, y el número del recuento de colonias obtenidas en la segunda prueba fue similar al testigo negativo.

Conclusiones: el Plasma Rico en Plaquetas no presenta un efecto inhibidor sobre el crecimiento bacteriano *in vitro* del *Estafilococo aureus*.

Palabras clave: plasma Rico en Plaquetas, *Estafilococo aureus*

ABSTRACT

Objective: to determine the inhibitory effect of bacterial growth in vitro platelet-rich plasma (PRP) on *Staphylococcus aureus*.

Material and method: 20cc of blood were taken from each one of the five patients that participated in this study, and PRP activated with bovine thrombin was obtained from each one of these samples. Two different methods were used; the procedure was repeated with each sample five times. In the first method, pure PRP and PRP combined with Ampicillin 500mg is exposed to *Staphylococcus aureus*, measuring the inhibition halo that is formed 24 hours later. In the second method we expose the same elements to the same bacteria but for different times, for one, three, five and fifteen minutes, to observe the PRP action in the different moments of bacterial growth. Variables were analyzed using ANOVA, W of Mauchly, test of Scheffé and test of Bonferrini.

Results: PRP did not show any action on the study bacteria in any of the samples. The inhibition halo obtained by PRP in the first test was zero in all of the samples, and the number of colony count obtained in the second test was abundant, similar to negative witness.

Conclusions: the platelet-rich plasma does not have an inhibitory effect on bacterial growth in vitro of *Staphylococcus aureus*.

Key words: platelet-rich plasma, *Stafilococo aureus*

¹ Cirujano Dentista. Docente de Internado de Estomatología. Facultad de Odontología - USMP

² Cirujano Dentista. Docente de Maestría de Periodoncia. Facultad de Odontología - USMP

Correspondencia:

Carlos Huapaya Lazo

INTRODUCCIÓN

El proceso de reparación de los injertos óseos depende de muchos factores, a saber: calidad de tejido donador (función osteoblástica correcta en los tejidos vecinos), amplia vascularización del área receptora, inmovilización del injerto y eficiencia de los mecanismos de reparación¹. Dentro de estos factores, la eficiencia de los mecanismos de reparación no depende únicamente de la técnica quirúrgica o de las condiciones quirúrgicas locales, sino principalmente de las condiciones propias del paciente.

En la década de los 80, los grandes laboratorios comenzaron a estudiar la utilización de mediadores químicos que modulen el proceso de reparación de los tejidos óseos².

Se sabe que durante toda intervención quirúrgica de cualquier índole e incluso durante un proceso de raspado y alisado radicular ocurre una bacteriemia que pudiera ser transitoria o de alto riesgo para la salud del paciente (siendo aun mayor si el paciente presentara un estado de salud disminuido), que

usualmente se logra controlar realizando la técnica operatoria con todas las medidas de asepsia y antisepsia, completándolo con una terapia antibiótica para asegurar que el recién operado no corra ningún riesgo de infección³. Dentro de una gran variedad de agentes químicos disponibles para disminuir o eliminar la flora patógena periodontal encontramos los antimicrobianos, tales como: penicilinas, tetraciclinas, espiramicina metronidazol, clindamicina, ampicilina, amoxicilina sola y la combinación de amoxicilina-ácido clavulánico. Estos agentes se emplean con la finalidad de disminuir o eliminar la flora patógena periodontal⁴, tanto para usarlos como una medida profiláctica ante una cirugía como para infecciones leves hasta moderadas del maxilar y la mandíbula, debido a su capacidad de penetración por el tejido óseo como por su espectro de acción⁵.

Sin embargo, en algunas situaciones la terapia antibiótica puede estar contraindicada para algunos pacientes debido a diversos factores como sensibilidad alérgica frente a determinados fármacos, o el riesgo de generar o reactivar una gastritis⁶.

En los últimos años se ha comenzado a emplear el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) como una alternativa adicional a las existentes en la técnica de regeneración tisular, obteniéndose resultados post operatorio muy favorables, debido a los elementos presentes en las plaquetas⁷.

En los resultados post-operatorios de cirugías periodontales e incluso en intervenciones de mayor magnitud, se observa una importante mejoría en la cicatrización de los tejidos blandos⁸; si a ello sumamos los buenos resultados reportados por algunos autores en lo que respecta a regeneración de tejido óseo, tendríamos que este elemento presenta propiedades favorables que podrían disminuir en gran medida el proceso inflamatorio.

Como se sabe, son varios los factores que pueden desencadenar este proceso inflamatorio, como son agentes físicos (temperatura, trauma), agentes químicos (diferentes clases de drogas) o agentes bacterianos⁹ tales como el *Estafilococo aureus*, patógeno presente tanto en infecciones comunitarias como nosocomiales¹⁰.

Al apreciar una disminución de la inflamación en el post-operatorio que sigue a la utilización de PRP, se hace evidente que los agentes causantes de este proceso se ven atenuados debido a las propiedades del agente, lo cual genera interrogantes respecto al mecanismo de acción que presentaría sobre alguno

de los elementos desencadenantes del proceso inflamatorio.

Mientras que las bacterias son uno de los factores que contribuyen a que se desencadene el proceso inflamatorio en nuestro organismo, las plaquetas son células del torrente sanguíneo derivadas de progenitores mieloides y conformadas por numerosos gránulos, que además de participar en la coagulación también juega un rol en el proceso de la inflamación⁸. Estas plaquetas se adhieren al endotelio y quedan fijadas cuando entran en contacto con la matriz extracelular subendotelial, la cual es expuesta cuando los vasos son injuriados. La superficie de la membrana de la plaqueta tiene receptores para varios de los componentes de esta matriz, tales como integrinas, colágeno, fibronectina y laminina. Seguido a la adherencia, las plaquetas llegan a activarse y liberan sus gránulos, siendo esta reacción activada por la presencia de colágeno, trombina, plasmina y tripsina, entre otros factores⁹. La liberación de los gránulos de las plaquetas ha sido materia de varios estudios, y específicamente el realizado por Klinger y Ulbricht (2003) generó el interrogante para realizar este trabajo de investigación, al haber encontrado un efecto antibacteriano en las plaquetas. Estas células, además de liberar péptidos bactericidas de los gránulos, como -lysinas y péptidos microbicidas de plaquetas (PMPs), tienen un mecanismo dependiente del contacto para matar bacterias invasivas. En ese estudio los autores trabajaron con tres bacterias -*K. pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *B. subtilis*-, encontrando resultados similares para cada uno de ellas; utilizaron el microscopio electrónico de transmisión para ver la calidad del efecto bacteriano y el microscopio de fluorescencia para valorar la cantidad del efecto bactericida¹².

Por otra parte, en el trabajo realizado por Kupferwasser et al (2002) hallaron que las plaquetas mitigaban la patogénesis de infección endovascular al secretar péptidos antimicrobiales vía local¹³, mientras que Yeaman, Sullam y Dazin (1994) encontraron que las proteínas microbicidas plaquetarias (PMP) reducen la adherencia del *Estafilococo aureus* a las plaquetas¹⁴, propiedad que sería adicional a su efecto microbicida; en este estudio los autores evaluaron el porcentaje de adherencia plaquetaria entre un grupo de PMP expuesto a un antibiótico (ampicilina) y otro grupo no expuesto, sin encontrar diferencia entre ambas muestras¹⁴. En un estudio previo, Yeaman, Norman y Bayer (1992) encontraron que la combinación de las PMP con la oxacilina ejercían un efecto bactericida sinérgico frente a tres tipos de microorganismos aislados, sin considerar si había susceptibilidad innata del PMP a la cepa¹⁵.

Por el contrario, Dhawan, Bayer y Yeaman (1998) encontraron que existían proteínas microbicidas plaquetarias inducidas por trombina (tPMP-1) con susceptibilidad y resistencia a la cepa de *Estafilococo aureus*, las cuales se hallaban en diferentes proporciones dependiendo del tejido de procedencia, y notándose que donde se encontraba menor cantidad de PMP la enfermedad progresaba con mayor rapidez¹⁶.

Asimismo, Mannaioni, Di Bello y Masini (1996) consideran que las plaquetas participan en la reposición de sustancias activas fisiológicas del huésped, como el factor de desarrollo derivado de plaquetas (PDGF), la familia selectin y la histamina plaquetaria, las cuales son liberadas durante la activación plaquetaria y tienen la capacidad de modular la comunicación intercelular entre las plaquetas y otras células inflamatorias. Los autores consideran que una terapia de drogas específicamente diseñada para interactuar con esta clase de moléculas puede representar una nueva frontera en el tratamiento de la inflamación vascular¹⁷.

Por otro lado, sabemos que al *Estafilococo aureus* se le considera como una de las principales bacterias causante de la osteomielitis, como mencionan Marsh y Martin¹⁸. Sin embargo, recientes estudios también involucran a microorganismos anaerobios particularmente Gram negativos, como el *Fusobacterium spp.* Su-Pin Koo et al (1999) realizaron un estudio en conejos, reportando que la proteína microbicida 1 de plaquetas inducida por trombina presentaba una potente actividad microbicida contra un amplio espectro de bacterias y hongos patógenos, incluyendo al *Estafilococo aureus*¹⁹. Asimismo, Tayebbeh et al (1992) (20) reportaron una internalización del *Estafilococo aureus* y del virus HIV por parte de las plaquetas, en una investigación realizada con microscopio electrónico; las plaquetas fueron incubadas con una suspensión de *Estafilococo aureus* a 37°C por 1 hora, demostrándose que la internalización de la bacteria dentro de las plaquetas era poco frecuente, pero en las situaciones en que esto se daba las plaquetas presentaban signos morfológicos de activación adoptando una característica forma esférica, sin embargo la internalización se incrementó en las plaquetas que habían sido previamente activadas ya sea con adenosin 5'difosfato o trombina. Para la observación al microscopio electrónico, las muestras fueron fijadas en 1.5% glutaraldehído por 1 hora y lavadas 3 veces en 0.1 M de buffer fosfato, y para el examen morfológico las plaquetas fueron fijadas en ácido ósmico, deshidratadas en etanol y embebidas en Epon por métodos estandarizados. Mediante inmunomarcadores encontraron que existen

compartimientos subcelulares específicos para el englobamiento de las bacterias mediante receptores y ligandos *in vivo*.

Con respecto a la aplicación del PRP en los tratamientos de regeneración, Tözüm y Demiralp (2003) consideran a este agente como un componente de la sangre en el cual las plaquetas están concentradas en un volumen limitado de plasma. Refieren que existen evidencias de que las plaquetas contienen diversas sustancias que median o regulan el proceso inflamatorio, así como factores de desarrollo que aumentan la cicatrización de los tejidos y ayudan a inducir su regeneración. El plasma autólogo sería una fuente rica de factores de desarrollo y una vía efectiva para inducir la reparación y regeneración; una vez que las plaquetas se han adherido por medio del colágeno a los vasos injuriados, liberan gránulos conteniendo serotonina, tromboxano y adenosina para iniciar el proceso de coagulación, que luego permitirá la formación de fibrina. Asimismo, el PRP podría acelerar la cicatrización postoperatoria. En resumen, según los autores el PRP presentaría las siguientes ventajas quirúrgicas: Disminución de la frecuencia del sangrado intraoperatorio y posoperatorio en el lugar receptor, facilita una cicatrización más rápida, ayuda a la estabilización inicial del tejido injertado en el sitio receptor (como resultado de su naturaleza cohesiva y adhesiva), promueve una rápida vascularización de los tejidos cicatrizados por la liberación de factores de crecimiento, y en combinación con material injertado induce a la regeneración. Los autores resaltan la necesidad de realizar más estudios para comprender la capacidad real del PRP en la cicatrización y reparación de los tejidos²¹.

Entre las investigaciones sobre Plasma Rico en Plaquetas realizadas en el Perú podemos mencionar la de Romero R (2004), quien realizó un estudio de ingeniería tisular pulpar mediante la formación de un complejo pulpo dentinario empleando este agente combinado con tejido pulpar y fibrilla, todos autólogos. Mediante análisis cualitativos y cuantitativos demostró que el grado de regeneración de los tejidos pulpares de los grupos experimentales y grupo control fueron similares²².

También se ha documentado la existencia de proteínas microbicidas plaquetarias que inducidas por la trombina pueden inhibir el desarrollo de bacterias como el *Estafilococo aureus*¹⁶.

Asimismo, Klinger y Ulbricht mencionan que las plaquetas humanas, además de liberar péptidos bactericidas de los gránulos como -lysinas y péptidos microbicidas de plaquetas (PMPs), tienen un

mecanismo dependiente del contacto para eliminar bacterias invasivas¹².

Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido si el PRP genera un sinergismo con los fármacos aumentando su capacidad de acción.

El objetivo del estudio es determinar si el Plasma Rico en Plaquetas, utilizado de forma pura y combinado con ampicilina 500 mg, presenta un efecto inhibitor sobre el crecimiento *in vitro* del *Estafilococo aureus*. Los resultados del estudio permitirían sustentar su empleo terapéutico para favorecer la recuperación de los pacientes intervenidos. Cabe mencionar que en el Perú hasta el momento aún no se ha realizado estudios sobre las propiedades antibacterianas del Plasma Rico en Plaquetas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio es de tipo experimental, analítico y comparativo. Se comparó el crecimiento de cepas de *Estafilococo aureus* cultivadas *in vitro* a las que se aplicó

el plasma rico de plaquetas (PRP) de cinco personas por quintuplicado, de forma pura y combinada con ampicilina 500mg en intervalos de tiempo preestablecidos, utilizándose técnicas de evaluación microbiológica.

La población estuvo conformada por los pacientes que acuden al laboratorio de Análisis Microbiológico “Bravo-Guillén”, con edades comprendidas entre 30 y 40 años, de sexo masculino, y cuyos valores del hemograma completo estén dentro de los límites normales⁹, de acuerdo a las escalas estandarizadas¹⁰. Se excluyeron a los pacientes con tratamiento antibacteriano, con enfermedades sistémicas, discrasias sanguíneas o inmunosuprimidos.

La selección de los participantes fue por muestreo no probabilístico por conveniencia; la asignación de los grupos de estudio fue al azar. La muestra fue tomada de un total de cinco sujetos donadores a los cuales se les realizaron dos pruebas ejecutadas por quintuplicado, llegando a tener un total de 500 lecturas. La distribución de la muestra se observa en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: distribución de la muestra según los procedimientos efectuados para evaluar su acción bactericida

		Acción Bactericida				Total
		Procedimientos realizados				
		Suero	Amp. 500mg	Amp + PRP	PRP	
Número de lecturas por paciente	Paciente 1	5	5	5	5	20
	Paciente 2	5	5	5	5	20
	Paciente 3	5	5	5	5	20
	Paciente 4	5	5	5	5	20
	Paciente 5	5	5	5	5	20
	Total	25	25	25	25	100

Tabla 2: Distribución de la muestra según los procedimientos efectuados para evaluar su acción bacteriostática

Número de pacientes	Elementos Empleados	Acción Bacteriostática				Total
		Número de lecturas por tiempo de exposición				
		1'	3'	5'	15'	
Paciente 1	Suero	5	5	5	5	20
	Ampicilina 500mg	5	5	5	5	20
	Ampicilina + PRP	5	5	5	5	20
	PRP	5	5	5	5	20
Paciente 2	Suero	5	5	5	5	20
	Ampicilina 500mg	5	5	5	5	20
	Ampicilina + PRP	5	5	5	5	20
	PRP	5	5	5	5	20
Paciente 3	Suero	5	5	5	5	20
	Ampicilina 500mg	5	5	5	5	20
	Ampicilina + PRP	5	5	5	5	20
	PRP	5	5	5	5	20
Paciente 4	Suero	5	5	5	5	20
	Ampicilina 500mg	5	5	5	5	20
	Ampicilina + PRP	5	5	5	5	20
	PRP	5	5	5	5	20
Paciente 5	Suero	5	5	5	5	20
	Ampicilina 500mg	5	5	5	5	20
	Ampicilina + PRP	5	5	5	5	20
	PRP	5	5	5	5	20
Total de lecturas		100	100	100	100	400

Método de recolección de datos

Se tomaron muestras de 20 cc de sangre venosa de cada uno de los sujetos donadores seleccionados (figura 1). Seguidamente se distribuyó la sangre en cinco tubos de ensayo estériles (Vacutiners, Becton Dickinson Vacutainer System. 4.5ml, Franklin Lakes,

NJ), 4cc en cada uno. Los tubos contenían citrato de sodio como anticoagulante (figura 2). Cada tubo fue llevado a la centrifuga para obtener el PRP.



Figura 1: toma de muestra de sangre



Figura 2: tubos Vacoutanier con muestras de sangre

Seguidamente se procedió según el protocolo Gonschor²³ en el cual se realizan dos centrifugados, el primero por 10 min a 1,300 rpm (160G) y el segundo por 10 min a 2,000 rpm (400G). Se utilizó una centrifuga marca KCENTRIFUGE modelo PLC-05



Figura 3: centrifuga "KCENTRIFUGE" modelo PLC-05

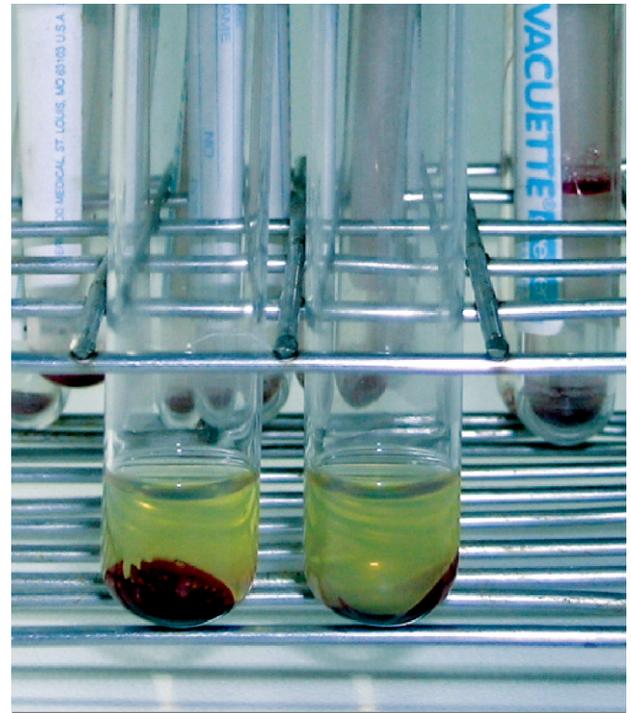


Figura 5: plasma rico y pobre en plaquetas después del segundo centrifugado



Figura 4: trombina (Reactivo)

producida por Gemi Industrial (figura 3). Mediante este procedimiento se liberaron los factores de crecimiento; el PRP fue activado con la trombina (figura 4)^{9,23}.

Una vez obtenido el PRP (figura 5) se procedió evaluar su efecto antimicrobiano, utilizándose para el estudio al *Estafilococo aureus* considerando que es una bacteria ampliamente estudiada y uno de los principales microorganismos asociados a la endocarditis bacteriana y la osteomielitis maxilar, reacción inflamatoria post quirúrgica de hueso y médula que puede originarse por la diseminación hematogena de una infección originada en focos infecciosos bucales^{9,10}.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó el método de Kirby-Bauer⁹, para lo cual se colocó un papel filtro con el coágulo de PRP y las diferentes combinaciones mezcladas con el antimicrobiano seleccionado, sobre placas de agar sembradas con la bacteria en estudio. Después de un periodo de incubación se midió el diámetro de inhibición bacteriana.

Una vez obtenido el PRP se tomó una gota de 50l del coágulo con una micropipeta (Finnpipet^R- Finlandia) y se depositó en una de las cuatro placas petri

preparadas con agar Müller Hinton y sembradas con *Estafilococo aureus* (figura 6). En las otras tres placas fueron colocadas las otras combinaciones como se detalla a continuación:

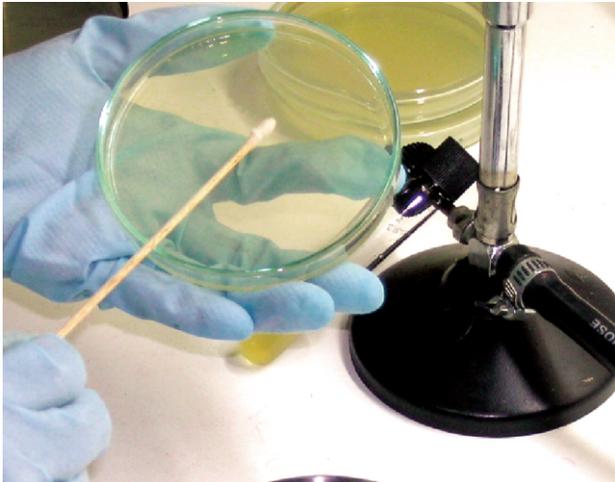


Figura 6: siembra por diseminación sobre agar Muller Hinton

- PRP puro (primer grupo test)
- Ampicilina 500mg (grupo control positivo). Se empleó un disco de papel embebido en el antibiótico y diluido a concentración de $8\mu\text{g/ml}$, que es la concentración sérica de un paciente que toma la dosis indicada cada 8 horas durante su tratamiento (9)
- 50l de suero fisiológico (grupo control negativo)
- Mezcla de PRP 50l + Ampicilina 500mg (segundo grupo test).

El procedimiento que se siguió con cada muestra fue el mismo que se realizó con el coágulo de PRP.

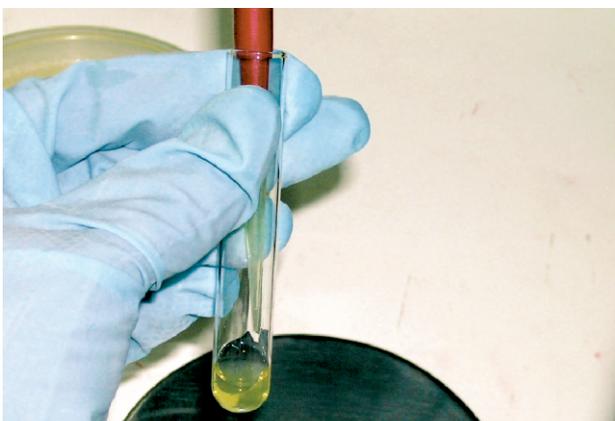


Figura 7: toma de $50\mu\text{l}$ del coágulo del PRP con la pipeta Finpipet.

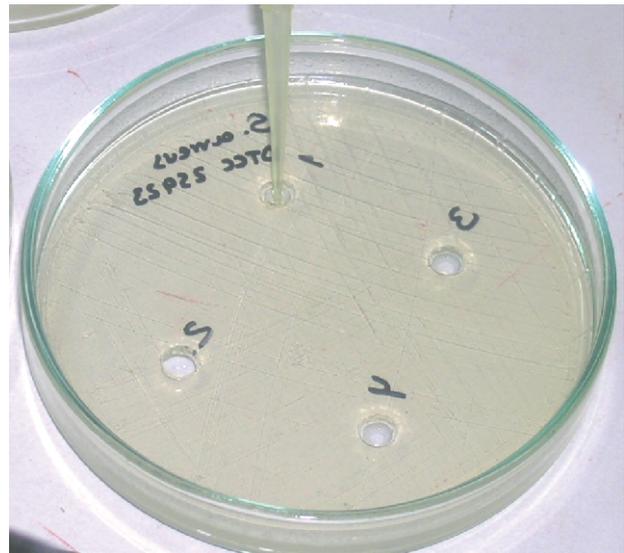


Figura 8: colocación del PRP en la placa.



Figura 9: placa con los 4 reactivos colocados. Se observan los halos de inhibición después de haber transcurrido 24 horas

Las placas petri fueron colocadas en un ambiente de aerobiosis a 37°C por 24 horas. Al transcurrir este tiempo se observaron los halos de inhibición bacteriana de cada muestra (figuras 7-9).

En total se realizaron 100 lecturas, cuya distribución se detalla en el cuadro 1.

Procedimiento para medir la acción bacteriostática

El PRP obtenido en el procedimiento anterior fue aplicado sobre el *Estafilococo aureus* en un tubo de ensayo con caldo tripticosa soya. Luego se realizaron resembrados por estrías en placas petri con agar Müller Hinton, con intervalos de tiempo de 1, 3, 5 y 15 minutos (figura 10). Seguidamente cada placa

petri fue colocada en una estufa de cultivo a 37°C y a las 24 horas. Al terminar cada período de tiempo se

observó y registró el crecimiento de las colonias bacterianas en cada caso (figura 11).



Figura 10: siembra por estrías en los diferentes tiempos

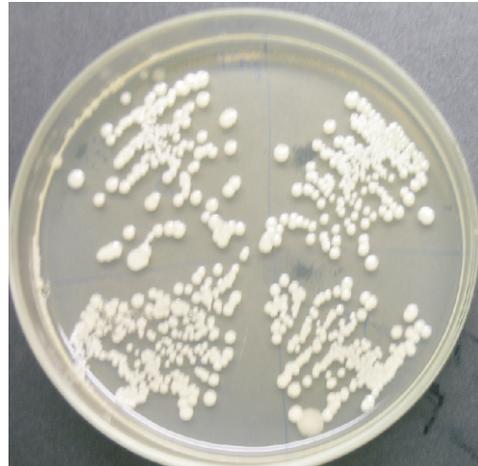


Figura 11: crecimiento de colonias en la placa donde se enfrentó al *Estafilococo aureus* con el PRP

Este procedimiento se repitió con la ampicilina sola y combinada con PRP, así como con el suero fisiológico (control negativo). A las cinco muestras de sangre se les aplicó el procedimiento descrito por quintuplicado, obteniéndose 400 siembras con sus respectivas lecturas (cuadro 2).

RESULTADOS

Evaluación de la acción bactericida

Para establecer el efecto de la acción bactericida se registró la amplitud (en milímetros) del halo de inhibición bacteriana formado 24 horas después de haber depositado las muestras. Para preparar las muestras se tomó una gota de 50l del coágulo del PRP, un disco de papel filtro embebido en ampicilina 500mg, una gota de 50l de suero fisiológico y una

gota con la mezcla de PRP 50l + ampicilina 500 mg, las cuales fueron colocadas en una placa petri que contenía agar Müller Hinton, previamente sembrada con la cepa de *Estafilococo aureus*.

En la tabla 3 se registran los valores máximo y mínimo de los halos de inhibición, así como la media y desviación estándar por paciente en cada uno de los procedimientos. En el gráfico 1 se presenta la distribución de los valores promedio de los halos inhibitorios en los pacientes. En ambos gráficos se aprecia que en el caso de la gota de 50 ml del coágulo del PRP y la gota del suero fisiológico no se desarrolló ningún halo inhibitorio. En el caso del disco de papel filtro embebido en ampicilina el halo inhibitorio osciló entre 22 y 34 mm, mientras en el caso de la gota con la mezcla de PRP 50ml + ampicilina el halo inhibitorio estuvo entre los 20 y 32 mm.

Tabla 3: diámetro del halo inhibitorio en relación al agente evaluado en cada paciente.

		Composición de la muestra			
		Suero	Ampicilina 500 mg	Ampicilina 500 mg + Plasma Rico en Plaquetas	Plasma Rico en Plaquetas
Paciente 1	Diámetro máximo del halo inhibitorio	0,0	22,0	20,0	0,0
	Diámetro mínimo del halo inhibitorio	0,0	22,0	20,0	0,0
	Media	0,0	22,0	20,0	0,0
	Desviación estándar	0,0	0,0	0,0	0,0
Paciente 2	Diámetro máximo del halo inhibitorio	0,0	28,0	26,0	0,0
	Diámetro mínimo del halo inhibitorio	0,0	27,0	25,0	0,0
	Media	0,0	27,8	25,8	0,0
	Desviación estándar	0,0	0,4	0,4	0,0
Paciente 3	Diámetro máximo del halo inhibitorio	0,0	27,0	25,0	0,0
	Diámetro mínimo del halo inhibitorio	0,0	26,0	24,0	0,0
	Media	0,0	26,4	24,4	0,0
	Desviación estándar	0,0	0,5	0,5	0,0
Paciente 4	Diámetro máximo del halo inhibitorio	0,0	33,0	29,0	0,0
	Diámetro mínimo del halo inhibitorio	0,0	30,0	31,0	0,0
	Media	0,0	31,2	29,8	0,0
	Desviación estándar	0,0	1,1	0,8	0,0
Paciente 5	Diámetro máximo del halo inhibitorio	0,0	34,0	32,0	0,0
	Diámetro mínimo del halo inhibitorio	0,0	32,0	30,0	0,0
	Media	0,0	32,8	31,0	0,0
	Desviación estándar	0,0	0,8	0,7	0,0

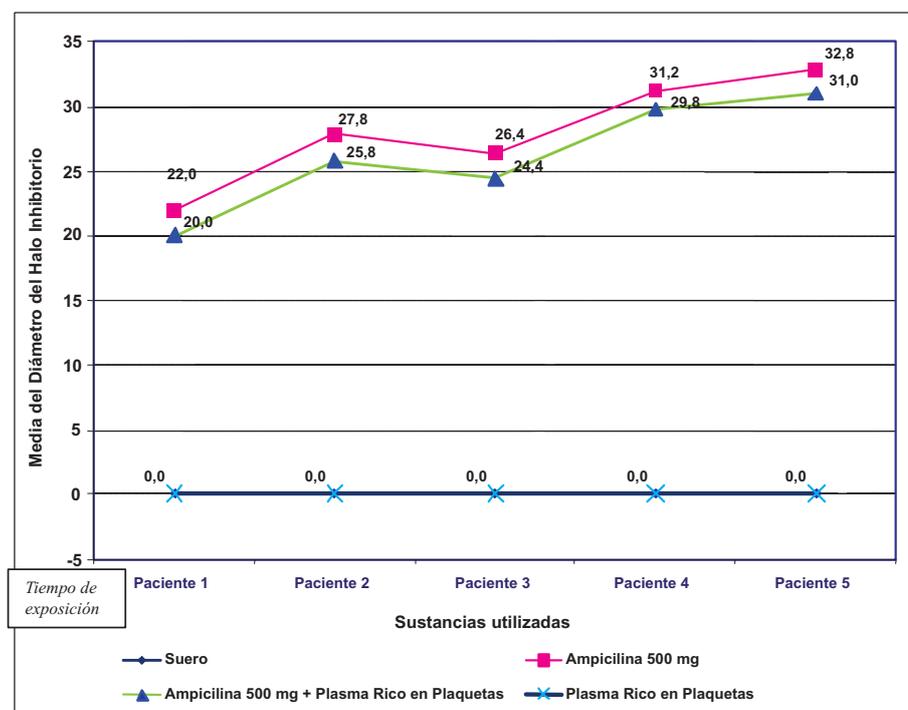
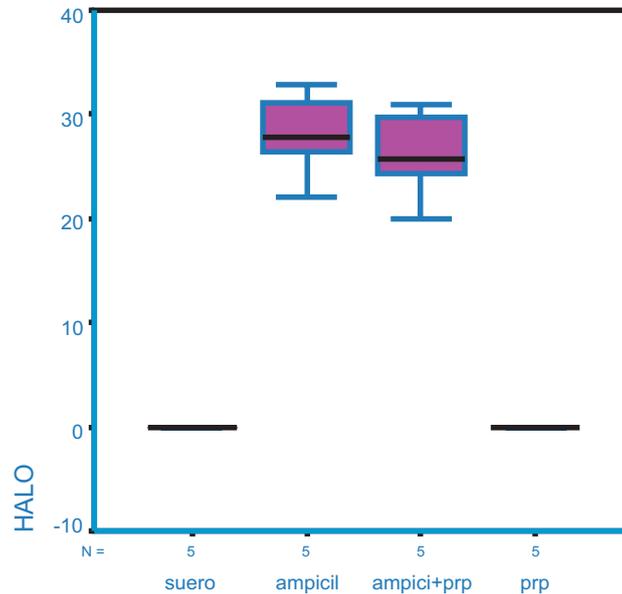


Gráfico 1: diámetro del halo inhibitorio en relación al agente evaluado en cada paciente

En el gráfico 2 observamos las medidas promedio de los halos inhibitorios según el agente evaluado (efecto bactericida). Se aprecia que el “Suero” y “PRP”

presentaron valores de 0, mientras que la “Ampicilina” y “Ampicilina + PRP” presentaron valores entre 20 y 30 mm.



PROCEDIMIENTO

Gráfico 2: evaluación de la acción bactericida según el diámetro del halo inhibitorio en relación al agente evaluado

La diferencia en el efecto bactericida entre los grupos se determinó a través del análisis de varianza (ANOVA) de un factor con medidas repetidas. El factor de análisis corresponde a las cuatro situaciones experimentales a las que fueron sometidas las muestras, y la condición intra-sujeto esta dado por el hecho que se aplicó por quintuplicado los procedimientos experimentales a las muestras de cada sujeto.

Los resultados del análisis ANOVA se muestran en las tablas 2 y 3.

En la tabla 4 se observa que solo en la “Ampicilina 500mg” y “la Ampicilina 500mg + PRP” se obtiene un valor crítico ligeramente superior a 0.05 (0.076 y 0.078 respectivamente), lo que indicaría que existe igualdad de las varianzas entre estos dos procedimientos.

Tabla 4: ANOVA para determinar la diferencia en el efecto bactericida entre los diferentes agentes evaluados.

PROCEDIMIENTOS	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
SUERO	0,000	4	0	0,000
AMPICILINA 500 mg	2,485	4	20	0,076
AMPICILINA 500 mg + PRP	2,462	4	20	0,078
PRP	0,000	4	0	0,000

En la tabla 5 se observa que los procedimientos “Ampicilina 500 mg” y “Ampicilina 500 mg + PRP” el valor crítico es 0.0 ($p < 0.05$), lo que indicaría que

existe diferencia significativa entre ambos resultados. En los demás casos el efecto sería similar.

Tabla 5: ANOVA para determinar la diferencia en el efecto bactericida entre los diferentes agentes evaluados.

PROCEDIMIENTOS		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
SUERO	Inter-grupos	0,000	4	0,0000	-	-
	Intra-grupos	0,000	20	0,0000	-	
	Total	0,000	24	-		
AMPICILINA 500 mg	Inter-grupos	359,360	4	89,8400	187,167	0,0000
	Intra-grupos	9,600	20	0,4800	35,542	0,0000
	Total	368,960	24	-		
AMPICILINA 500 mg + PRP	Inter-grupos	389,200	4	97,3000	286,176	0,0000
	Intra-grupos	6,800	20	0,3400	50,196	0,0000
	Total	396,000	24	-		
PRP	Inter-grupos	0,000	4	0,0000	-	-
	Intra-grupos	0,000	20	0,0000	-	
	Total	0,000	24	-		

Para profundizar en los resultados del ANOVA se realizó el análisis de contrastes multivariados de medias resultantes, mediante la prueba de esfericidad de Mauchly. La esfericidad en el ANOVA de medidas repetidas supone que existe una relación especial entre las respuestas dentro de los niveles de las variables que está implícita en el modelo de la matriz de varianzas y covarianzas. Por tanto, esta matriz es diagonal y los elementos son constantes, es decir circular o esférica.

La matriz de varianzas-covarianzas se forma combinando los niveles de los datos y formando pares

de datos a partir de todas las combinaciones posibles: 1) Suero-ampicilina 500 mg, 2) Suero-ampicilina 500 mg+PRP, 3) Suero-PRP, 4) ampicilina 500 mg-ampicilina 500 mg+PRP, 5) ampicilina 500 mg-PRP, y 6) ampicilina 500 mg+PRP-PRP.

En la tabla 4 se presenta el resultado de la prueba de esfericidad de Mauchly; puesto que el nivel crítico asociado al estadístico W de Mauchly es 0.000 ($p < 0,05$), se rechaza la suposición de esfericidad. Esto quiere decir que la acción bactericida no presenta diferencias significativas entre los procedimientos utilizados.

Tabla 6: prueba de esfericidad de Mauchly para determinar la diferencia en el efecto bactericida de los diferentes agentes evaluados.

EFECTO	W de Mauchly	Chi cuadrado aprox.	gl	Significación	Epsilon (a)		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
PACIENTES	1,000	0,000	0	0,000	1,000	1000	1000

Complementando el resultado de la prueba de esfericidad de Mauchly, se realizó una aproximación univariada (“esfericidad asumida”), pues en condiciones de esfericidad el estadístico univariado F es más potente que los estadísticos multivariados. En la tabla 5 se presentan los resultados de la aproximación

univariada para las cuatro versiones del estadístico F, observándose que en todos los casos el nivel crítico es menor que 0.05. Esta situación confirma que las mediciones de resultantes de la aplicación de las diferentes sustancias utilizadas son significativamente diferentes.

Tabla 7: análisis de aproximación univariada para F para determinar la diferencia en el efecto bactericida de los diferentes agentes evaluados.

EFECTO		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
PROCEDIMIENTOS	Esfericidad asumida	557990,490	4	139497,623	11,725	0,000
	Greenhouse-Geisser	557990,490	1,337	417394,930	11,725	0,014
	Huynh-Feldt	557990,490	1,759	317240,225	11,725	0,006
	Límite-inferior	557990,490	1	557990,490	11,725	0,027
PROCEDIMIENTOS * SUJETO	Esfericidad asumida	50374,888	3	16791,629	11,206	0,001
	Greenhouse-Geisser	50374,888	1,673	30104,373	11,206	0,009
	Huynh-Feldt	50374,888	2,736	18409,077	11,206	0,001
	Límite-inferior	50374,888	1	50374,888	11,206	0,029

Con el fin de establecer entre qué procedimientos experimentales hay mayor proximidad y diferencias se determinó el valor crítico de Scheffé y Tukey, que permite establecer diferencias significativas entre combinaciones de procedimientos. Los resultados de esta prueba se presentan en la tabla 8; al comparar

los valores críticos de las relaciones entre los procedimientos experimentales utilizados se puede encontrar una relación más significativa entre los métodos “Suero” y “PRP” (p: 1.00) y entre los métodos “Ampicilina 500 mg.” y “Ampicilina 500 mg. + PRP” (p: 0,778).

Tabla 8: prueba de Tukey para determinar la diferencia en el efecto bactericida de los diferentes agentes evaluados.

(I) Sustancias	(J) Sustancias	Diferencias de medias (I-J)	Error Típico	Sig	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite Inf.	Límite Sup.
Suero	PRP	0,000	1,935	1,000	-5,535	5,535
	Ampicilina 500mg	-28,040	1,935	0,000	-33,575	-22,505
	Ampicilina 500mg + PRP	-26,200	1,935	0,000	-31,735	-20,665
Ampicilina 500 mg	Ampicilina 500mg + PRP	1,840	1,935	0,778	-3,695	7,375
	PRP	28,040	1,935	0,000	22,505	33,575
Ampicilina 500 mg + PRP	PRP	26,200	1,935	0,000	20,665	31,735

Evaluación de la acción bacterioestática

Para establecer la acción bacteriostática se evaluó longitudinalmente el crecimiento *in vitro* de cepas de *Estafilococo aureus* expuestas a las cuatro situaciones experimentales, durante cuatro tiempos de exposición.

En el gráfico 3 se observan los promedios acumulados del número de colonias para las distintas sustancias analizadas en relación con los tiempos de exposición. En el caso de las muestras con suero fisiológico se observa que el número de cepas de *Estafilococo aureus* en el minuto uno es 146,28, en el minuto tres 135,44,

en el minuto cinco 128,60 y en el minuto quince 138,28. En las muestras con Plasma Rico en Plaquetas (PRP), para el minuto uno se tiene una media de 99,00 colonias, en el minuto tres 107,08, en el minuto cinco 94,44 y en el minuto quince 97,92. En la solución de ampicilina de 500 mg la media es de 21,52 colonias en el minuto uno, de 20,16 colonias en el minuto tres, 10,20 colonias en el minuto cinco y 7,48 colonias en el minuto quince. Para el caso la preparación de ampicilina de 500 mg con Plasma Rico en Plaquetas (PRP), en el minuto se observa una media de 76,64 colonias, en el minuto tres 35,88, en el minuto cinco 34,64 y en el minuto quince 35,12.

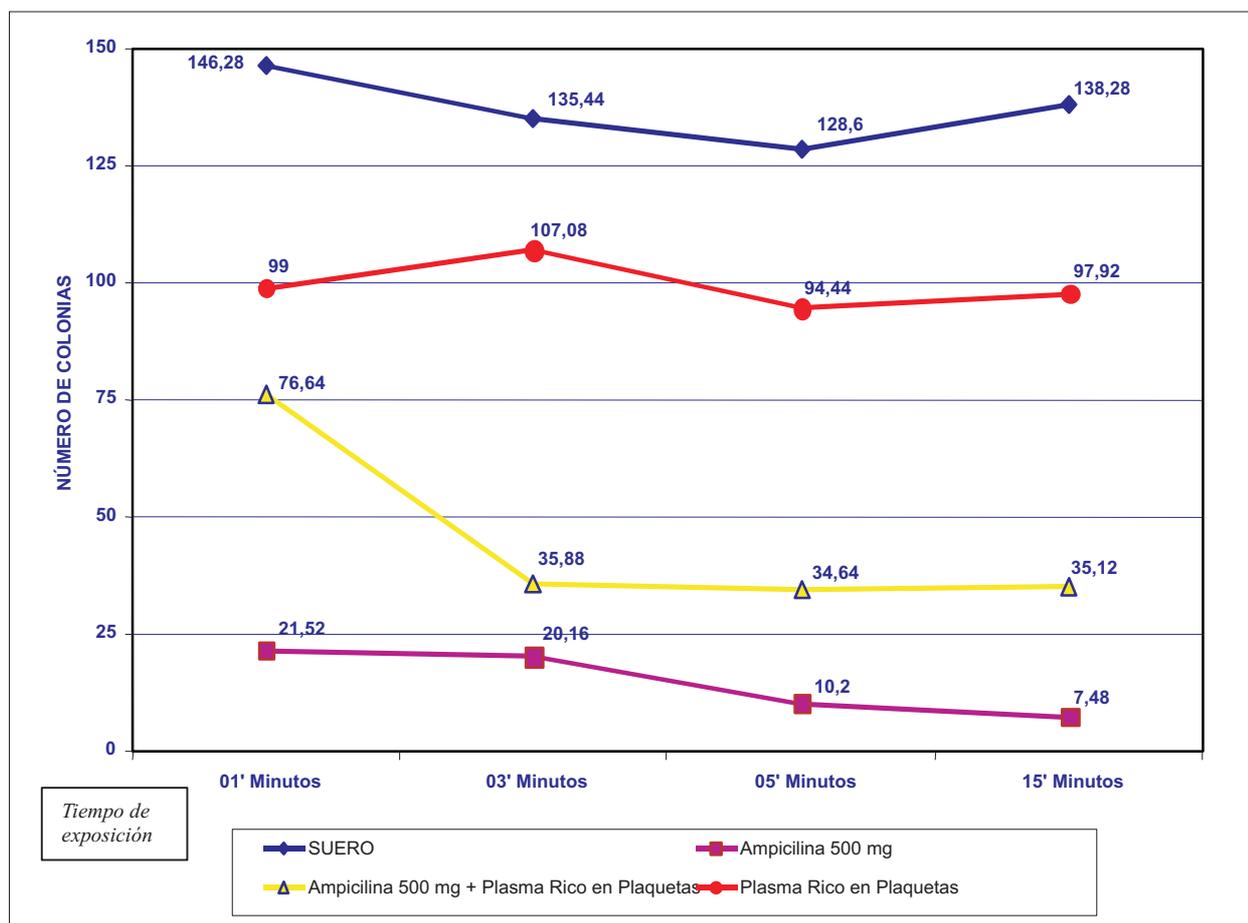


Gráfico 3: promedio de crecimiento bacteriano por tiempo de exposición según el agente evaluado

Para evaluar la diferencia en el efecto bactericida de las muestras se empleó el análisis de varianza (ANOVA), mediante un diseño de dos factores con medidas repetidas en un factor. El factor inter-sujeto que corresponde a las sustancias utilizadas con cuatro niveles: 1) Suero, 2) PRP, 3) Ampicilina 500 mg y 4) Ampicilina 500 mg + PRP; el factor intra-sujetos corresponde al tiempo de exposición evaluado también con cuatro niveles: 1) Al minuto, 2) Al tercer minuto, 3) A los cinco minutos y 4) A los quince minutos; la variable dependiente es el número de colonias de la bacteria *Estafilococo aureus*.

Los valores críticos alcanzados en la prueba de

LEVENE para “Minuto 03” (0.337), “Minuto 05” (0.730) y “Minuto 15” (0.151), permiten asumir que las medidas de las varianzas son similares entre si ($p > 0,05$). En el caso del “Minuto 01” el valor crítico fue de 0.036, por lo que en este caso la medida de las varianzas es significativamente diferente entre las muestras.

En la tabla 7 se presentan los resultados del ANOVA para los tiempos de exposición, observándose que todos los valores críticos presentan un valor de 0.000, lo cual nos indicaría que existen diferencias significativas entre los diferentes tiempos de exposición.

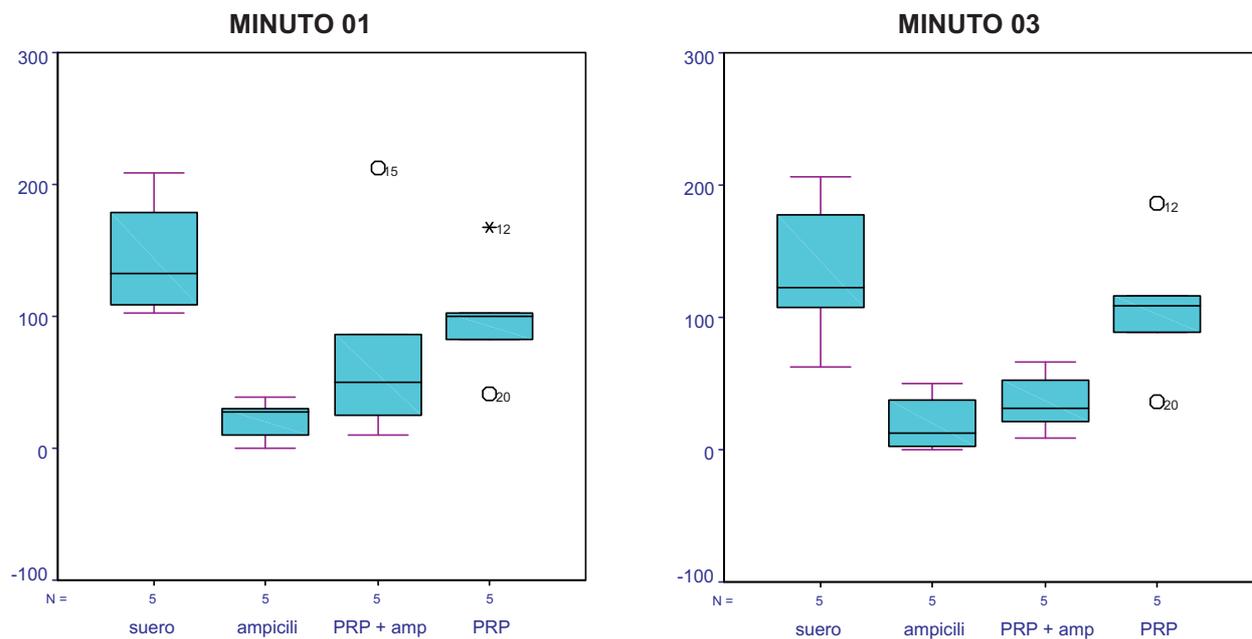
Tabla 9: ANOVA para evaluar la acción bacteriostática de los diferentes agentes evaluados según tiempo de exposición.

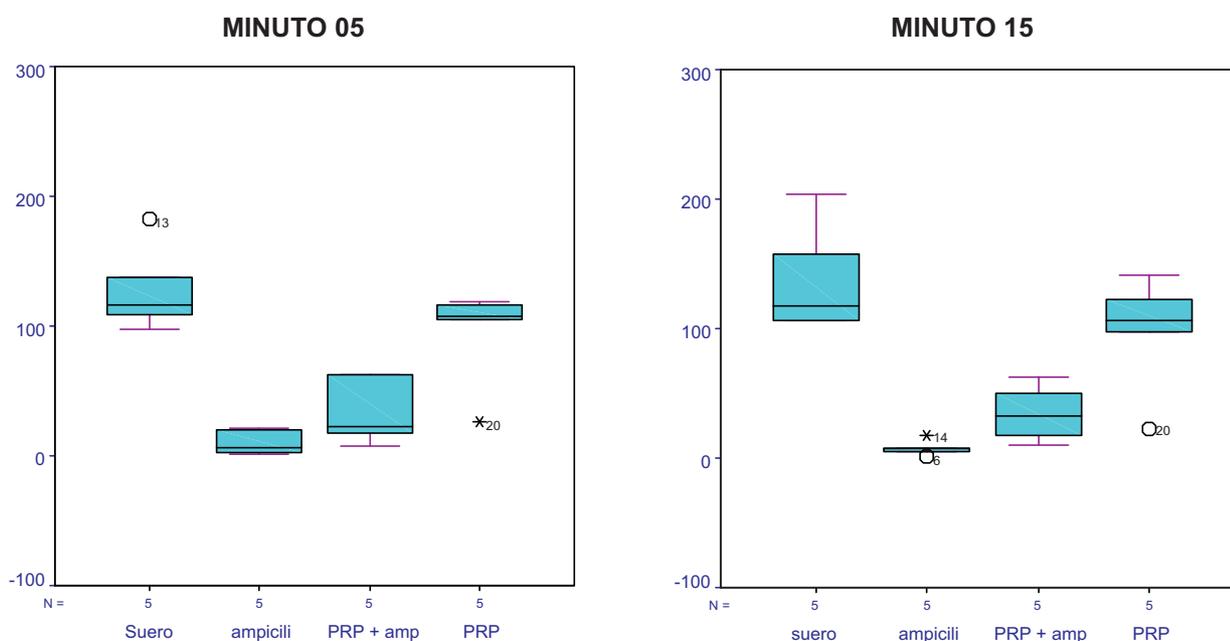
Tiempo de Observación		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Al Minuto 01	Inter-grupos	30434,150	3	10144,717	115,741	0,0000
	Intra-grupos	1402,400	16	87,650		
	Total	31836,550	19			
Al Minuto 03	Inter-grupos	13272,550	3	4424,183	38,421	0,0000
	Intra-grupos	1842,400	16	115,150		
	Total	15114,950	19			
Al Minuto 05	Inter-grupos	44371,800	3	14790,600	172,737	0,0000
	Intra-grupos	1370,000	16	85,625		
	Total	45741,800	19			
Al Minuto 15	Inter-grupos	40843,200	3	13614,400	69,692	0,0000
	Intra-grupos	3125,600	16	195,350		
	Total	43968,800	19			

En el gráfico 4 puede observarse la distribución de las medias acumuladas de acción bacteriostática de los

procedimientos en relación a cada tiempo de exposición.

Gráfico 4: crecimiento de colonias bacterianas según el agente evaluado por tiempo de exposición





En la tabla 10 se observa que el factor “Sustancias utilizadas” tiene un efecto significativo en la relación inter-sujetos, puesto que el valor crítico asociado al estadístico F es menor 0.05, lo que indicaría que

existen diferencias significativas en el crecimiento de las colonias bacterianas entre los diferentes procedimientos.

Tabla 10: ANOVA de medidas repetidas (aproximación a efectos inter-sujetos) para evaluar la acción bacteriostática según los agentes evaluados.

Variable transformada: Promedio

FUENTE	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	1881012,250	1	1881012,250	257,383	0,000
Procedimientos	0,000	0	-	-	-
Error	175397,500	24	7308,229		

El gráfico 5 presenta la interacción de los factores “Sustancias utilizadas” y “Tiempo de Exposición”, observándose que las muestras que presentaban ampicilina (“Ampicilina 500 mg” y “Ampicilina 500 mg + PRP”) mostraban una tendencia a inhibir en

distinto grado el crecimiento bacteriano. En tanto, las muestras correspondientes a “Suero” y “PRP” se asociaron en diverso grado a un crecimiento de las colonias bacterianas.

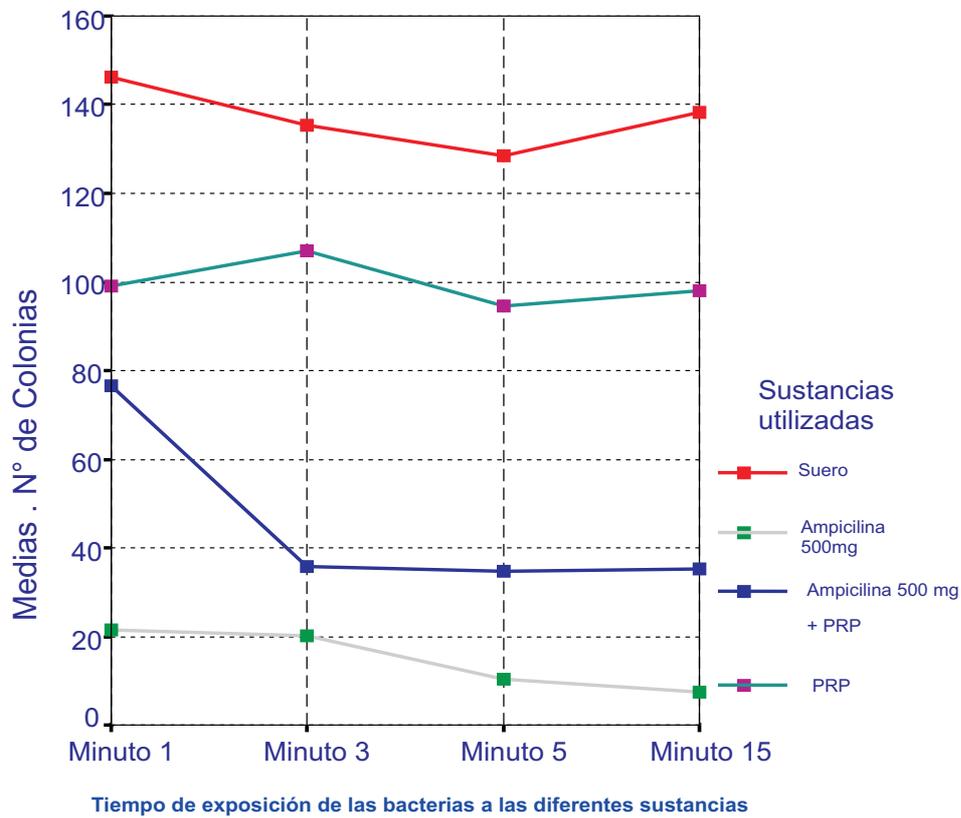


Gráfico 5: efecto bacteriostático de los agentes evaluados según tiempo de exposición

Aunque al parecer existirían diferencias en el efecto de las sustancias utilizadas, para confirmar esta situación se realizaron comparaciones múltiples. En la tabla 11 se presentan las comparaciones múltiples para el factor “Tiempo de Exposición”, utilizando la corrección de Bonferrini para controlar las

posibilidades de cometer errores del tipo I. En la comparación de los niveles por pares de los tiempos de exposición (“Minuto 1”, “Minuto 3”, “Minuto 5” y “Minuto 15”) no se observa una relación marcada entre el crecimiento de colonias bacterianas y el factor “Tiempo de Exposición” ($p > 0,05$).

Tabla 11: comparaciones múltiples mediante corrección de Bonferrini. Factor “Tiempo de exposición”

Comparaciones por pares: Factor “Momento de Observación”					Intervalo de confianza al 95%.	
(I) Momento de Observación	(J) Momento de Observación	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Significación	Límite inferior	Límite superior
Minuto 1	Minuto 3	11,220	6,895	0,642	-7,355	29,795
	Minuto 5	18,890	6,895	0,044	0,315	37,465
	Minuto 15	16,160	6,895	0,127	-2,415	34,735
Minuto 3	Minuto 1	-11,220	6,895	0,642	-29,795	7,355
	Minuto 5	7,670	6,895	1,000	-10,905	26,245
	Minuto 15	4,940	6,895	1,000	-13,635	23,515
Minuto 5	Minuto 1	-18,890	6,895	0,044	-37,465	-0,315
	Minuto 3	-7,670	6,895	1,000	-26,245	10,905
	Minuto 15	-2,730	6,895	1,000	-21,305	15,845
Minuto 15	Minuto 1	-16,160	6,895	0,127	-34,735	2,415
	Minuto 3	-4,940	6,895	1,000	-23,515	13,635
	Minuto 5	2,730	6,895	1,000	-15,845	21,305

La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0.05

Asimismo, mediante la corrección de Bonferrini se realizaron las comparaciones múltiples para el factor “Sustancias Utilizadas”. Los resultados se presentan en la tabla 12, donde se observa que las interacciones “Suero”-“Ampicilina 200 mg”, “Suero”-“Ampicilina

500 mg + PRP” y “Ampicilina 200 mg + PRP”-“PRP” presentaron valores significativamente diferentes (p:0.000). Por el contrario, los resultados de las interacciones “Suero”-“PRP”, “Ampicilina 200 mg”-“Ampicilina 200 mg + PRP” fueron similares (p:1,00)

Tabla 12: comparaciones múltiples mediante corrección de Bonferrini. Factor “Sustancias utilizadas”

Comparaciones por pares: Factor "Sustancias Utilizadas"

(I) Sustancias Utilizadas	(J) Sustancias Utilizadas	Diferencias de medias (I-J)	Error Típico	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
Suero	Ampicilina 500mg	78,200	3,455	0,000	67,805	88,595
	Ampicilina 500mg + PRP	76,100	3,455	0,000	65,705	86,495
	PRP	1,200	3,455	1,000	-9,195	11,595
Ampicilina 500 mg	Ampicilina 500mg + PRP	-2,100	3,455	1,000	-12,495	8,295
	PRP	-77,000	3,455	0,000	-87,395	-66,605
Ampicilina 500 mg + PRP	PRP	-74,900	3,455	0,000	-85,295	-64,505

En la tabla 13 se presenta la comparación múltiple del factor “Sustancias Utilizadas” para cada uno de los niveles del factor “Tiempo de Exposición”. En los diferentes niveles de Exposición (“Minuto 01”, “Minuto 03”, “Minuto 05” y “Minuto 15”) se observan diferencias significativas en la media del crecimiento bacteriano en las interacciones “Suero”-“Ampicilina 500 mg”, “Suero”-“Ampicilina 500 mg + PRP” y “Suero”-“PRP” (p:0,000). En los diferentes niveles del factor “Tiempo de Exposición” se puede observar que a pesar de la diferencia entre las medias registradas para la interacción de las sustancias “Ampicilina 500 mg” y “Ampicilina 500 mg + PRP”, esta diferencia no

sería estadísticamente significativa, con un valor p:1,000 que indicaría un comportamiento similar.

En el caso de las interacciones “Ampicilina 500 mg”-“PRP” y “Ampicilina 500 mg + PRP”-“PRP” con los niveles “Minuto 01” y “Minuto 03”, aunque no se observaron diferencias significativas el valor crítico está muy alejado de 1,000, lo que no nos permitiría afirmar que sus comportamientos son similares. En el caso de las interacciones “Ampicilina 500 mg”-“PRP” y “Ampicilina 500 mg + PRP”-“PRP” con los niveles “Minuto 05” y “Minuto 15” sí se observó un efecto similar ante el crecimiento bacteriano (p:1,000).

Tabla 13: comparaciones múltiples mediante corrección de Bonferrini. Interacción de factores · “Sustancias utilizadas”- “Tiempo de exposición”*Variable dependiente: Crecimiento de colonias de la bacteria Staphylococcus aureus*

Factor: "Tiempo de Exposición"	(I) Sustancias	(J) Sustancias	Diferencia de Medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Minuto 01	Suero	Ampicilina 500mg	169,400	13,266	0,000	129,491	209,309
		PRP + Ampicilina 500mg	169,000	13,266	0,000	129,091	2,089,009
		PRP	137,800	13,266	0,000	97,891	177,709
	Ampicilina 500mg	Ampicilina 500mg + PRP		13,266	1,000	-40,309	39,509
		PRP	-31,600	13,266	0,180	-71,509	8,309
		Ampicilina 500mg + PRP	PRP	-31,200	13,266	0,191	-71,109
Minuto 03	Suero	Ampicilina 500mg	174,400	15,555	0,000	127,604	221,196
		PRP + Ampicilina 500mg	167,800	15,555	0,000	121,004	214,596
		PRP	141,200	15,555	0,000	94,404	187,996
	Ampicilina 500mg	Ampicilina 500mg + PRP	-6,600	15,555	1,000	-53,396	40,196
		PRP	-33,200	15,555	0,292	-79,996	13,596
		Ampicilina 500mg + PRP	PRP	-26,600	15,555	0,639	-73,396
Minuto 05	Suero	Ampicilina 500mg	135,200	19,519	0,000	76,480	193,920
		PRP + Ampicilina 500mg	129,600	19,519	0,000	70,880	188,320
		PRP	112,000	19,519	0,000	53,280	170,720
	Ampicilina 500mg	Ampicilina 500mg + PRP	-5,600	19,519	1,000	-64,320	53,120
		PRP	-23,200	19,519	1,000	-81,920	35,520
		Ampicilina 500mg + PRP	PRP	-17,600	19,519	1,000	-76,320
Minuto 15	Suero	Ampicilina 500mg	196,800	15,925	0,000	148,891	244,709
		PRP + Ampicilina 500mg	193,800	15,925	0,000	145,691	241,509
		PRP	180,800	15,925	0,000	132,891	228,709
	Ampicilina 500mg	Ampicilina 500mg + PRP	-3,200	15,925	1,000	-51,109	44,709
		PRP	-16,000	15,925	1,000	-63,909	31,909
		Ampicilina 500mg + PRP	PRP	-12,800	15,925	1,000	-60,709

Finalmente, para contrastar los resultados obtenidos por las pruebas de Bonferrini se realizó una comparación múltiple utilizando la prueba de Tukey para el factor “Sustancias Utilizadas”. Los resultados se presentan en la tabla 14, donde se observa que existen diferencias significativas entre las interacciones “Suero”-“Ampicilina 500 mg”, “Suero”- “Ampicilina 500 mg + PRP”, “Suero”-

“PRP” y “Ampicilina 500 mg”-“PRP” ($p < 0,05$). Para la interacción “Ampicilina 500 mg + PRP”-“PRP” no se observó una diferencia significativa, pero el valor crítico de 0,056 nos indicaría que sus resultados tampoco son similares. Por el contrario, la interacción “Ampicilina 500 mg”- “Ampicilina 500 mg”-“PRP” sí presentó un comportamiento similar respecto al crecimiento bacteriano ($p: 0,957$).

Tabla 14: prueba de Tukey para evaluar el factor “Sustancias utilizadas”

Comparación por pares: Factor "Sustancias Utilizadas"

(I) Sustancias Utilizadas	(J) Sustancias utilizadas	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Significación	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite Superior
Suero	Ampicilina 500 mg	168,950	7,872	0,000	146,427	191,473
	Ampicilina 500 mg + PRP	165,000	7,872	0,000	142,477	187,523
	PRP	142,950	7,872	0,000	120,427	165,473
Ampicilina 500 mg	Ampicilina 500mg + PRP	-3,950	7,872	0,957	-26,473	18,573
	PRP	-26,000	7,872	0,021	-48,523	-3,477
Ampicilina 500mg + PRP	PRP	-22,050	7,782	0,056	-44,573	0,473

DISCUSIÓN

Como sabemos, las plaquetas en su función clásica de homeostasis contribuyen activamente en la reacción inflamatoria y de defensa. Siendo el primer elemento celular que se acumula en el sitio de la injuria de la pared vascular, las plaquetas empiezan a iniciar el mecanismo de defensa contra los patógenos invasores por medio de la internalización de bacterias y secreción de péptidos microbicidas como los gránulos α , β -lysinas y péptidos microbicidas de plaquetas (PMPs); la reacción de liberación de gránulos es iniciada por la presencia de colágeno, trombina, plasmina y tripsina, entre otros factores⁹. Sin embargo, se piensa que las plaquetas presentan mayores habilidades defensivas aún por descubrir.

El presente estudio toma como base la investigación de Klinger y Ulbricht¹², quienes estudiaron cómo las plaquetas sanguíneas humanas participaban en la defensa del huésped. Los autores encontraron que las plaquetas pueden presentar una acción bactericida poscontacto. Para demostrarlo, enfrentaron un concentrado de plaquetas con bacterias suspendidas en TRIS-buffered saline (TBS), medio neutro para desarrollo bacteriano. Las plaquetas fueron estimuladas por 15 minutos con 2U/ml de trombina. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2% y tetraóxido osmio al 1%, para luego ser observadas por microscopio electrónico de transmisión. Se observó cambios en una sola cepa de las tres evaluadas (*B. subtilis*). Las bacterias intactas presentaron sus membranas celulares rodeadas por una pared celular densamente electrónica al igual que su citoplasma, el cual contenía abundantes ribosomas. Las bacterias que sí fueron afectadas

presentaron una permeabilización de la membrana celular, permitiendo el ingreso de agua a su interior; este efecto se manifestó como una menor densidad electrónica tanto en el citoplasma como en la disminución de ribosomas y otras estructuras intrabacterianas. El *B. subtilis* mostró una mayor adhesión a las plaquetas estimuladas que las otras bacterias estudiadas, y cuando se examinaron a un mayor aumento la membrana de la plaqueta que se encontraba en contacto con *B. subtilis* frecuentemente presentaba una apariencia arrugada.

En otro procedimiento utilizaron el microscopio de fluorescencia y procedieron al enfrentamiento de las plaquetas con las bacterias tanto con una sola estimulación como con doble estimulación con trombina. Para el primer caso enfrentaron 5l de plaquetas con 5l de bacterias suspendidas en una placa de vidrio, las cuales fueron estimuladas con 2U/ml de trombina por 15 minutos. Para la doble estimulación, primero se estimuló a las plaquetas con una concentración de trombina; el sobrenadante que contenía a las plaquetas degranuladas fue centrifugado a 14,000 x g por 1 minuto, y al compuesto resultante se le adhirió con TBS. Seguidamente se procedió como en el caso anterior, enfrentándose 5l de plaquetas degranuladas con 5l de bacterias suspendidas en una placa de vidrio, las cuales fueron nuevamente estimuladas con 2U/ml de trombina por 15 minutos. Después de 15 minutos de incubación se realizó la tinción de las bacterias en ambas muestras, con un colorante que tiene la propiedad de teñir sólo a las bacterias que presentaban daño de membrana. Esta tinción permitió una clara distinción entre bacterias vivas y muertas. Los resultados encontrados en la co-

incubación de las plaquetas estimuladas con trombina fueron un alto rango de muerte bacteriana, con un promedio de 77% en *B. subtilis* y 80% para *C. pneumoniae*. Cuando el sobrenadante de las plaquetas estimuladas con trombina fue expuesto, sólo el *C. pneumoniae* fue hallado muerto, a diferencia del *K. pneumoniae* y *B. subtilis*. El estudio concluyó que tanto la plaqueta como el sobrenadante de la degranulación plaquetaria presentan un efecto bactericida sobre el *C. pneumoniae*, mientras que para que reproduzca el efecto bactericida ante el *K. pneumoniae* y el *B. subtilis* se necesita que las bacterias estén adheridas a la plaqueta.

De esta forma, la presente investigación pretendía confirmar *in vitro* estos hallazgos, para lo cual se utilizó el método de Kirbi Bauer²⁸, prueba de sensibilidad que nos permite determinar el nivel bactericida de un determinado agente -en este caso las plaquetas activadas por trombina-, mediante presencia de halos de inhibición de crecimiento bacteriano -en este caso del *Estafilococo aureus*- formados alrededor de las muestras estudiadas -PRP puro, el suero fisiológico (control negativo), combinación de ampicilina con PRP y la ampicilina sola (control positivo). La presencia y tamaño de estos halos fueron los indicadores que permitieron la evaluación del efecto antibacteriano.

Se procedió a enfrentar al PRP puro y combinado con ampicilina con el *Estafilococo aureus* suspendido en caldo tripticasa soya, exponiéndolos en diferentes periodos de tiempo (1,3,5,15 minutos), para luego sembrar las muestras en agar Muller Hinton donde se observó el número de colonias formadas para determinar el nivel de crecimiento bacteriano. Este indicador nos permitió medir el efecto de las sustancias evaluadas sobre la bacteria en los diferentes tiempos establecidos.

En todas las muestras nuestros resultados evidenciaron una ausencia de efecto antibacteriano contra el *Estafilococo aureus*, hallazgo que contrasta con los resultados previamente citados. Los resultados obtenidos utilizando PRP puro y un control negativo (suero fisiológico) no mostraron diferencias significativas, lo cual nos indica que el PRP no presenta acción antibacteriana. Cuando se utilizó la combinación de PRP más un antibiótico y lo comparamos con la utilización del antibiótico puro (control positivo), no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, observándose incluso que el antibiótico tendía a ser menos eficaz cuando se combinaba con el PRP, lo cual nos indica que el PRP

no presenta acción sinérgica al actuar con un antibiótico.

La diferencia entre los resultados del presente estudio y los reportados por Klinger y Ulbricht¹² puede deberse a que ellos trabajaron con plaquetas ya separadas y concentradas por un proceso bastante tecnificado como es la trombocitoforesis con la utilización de un separador celular Amicus® (Baxter, Munchen, Germany), pudiendo de esa manera trabajar directamente con la plaqueta a la vez que emplearon un microscopio electrónico de transmisión para observar el estado de la membrana celular y su citoplasma (tanto de la plaqueta como de la bacteria); en el presente estudio se utilizó el protocolo de Gonshor²³ en el cual se realiza la separación de las plaquetas por centrifugación, y se trabaja con las plaquetas degranuladas al ser activadas con la trombina presente en el plasma. Aunque en el presente estudio partimos del hallazgo reportado por Klinger y Ulbricht¹², no podemos comprobar si el procedimiento que se siguió permitió la degranulación total de las plaquetas o si esta degranulación fue incompleta, obteniéndose una cantidad de proteínas bactericidas insuficientes que explicaría el resultado negativo del experimento.

Otra situación que podría explicar la discrepancia entre los estudios es la bacteria utilizada. De las tres bacterias con las que trabajaron Klinger y Ulbricht¹², el sobrenadante de las plaquetas activadas mostró un mayor efecto bactericida con el *C. pneumoniae*, mientras que para el caso de *B. subtilis* y *K. pneumoniae* tenía que existir necesariamente un contacto bacteria-plaqueta para obtenerse el efecto bactericida. Según lo observado en el presente estudio, los péptidos liberados por las plaquetas activadas con trombina no presentan efecto sobre el crecimiento bacteriano del *Estafilococo aureus*. Sin embargo, se tendrían que realizar otros estudios de mayor precisión con microscopía electrónica para poder confirmar que la membrana bacteriana y su citoplasma no se ven afectadas por la acción de las proteínas plaquetarias.

En el estudio realizado por Yeaman et al¹⁴ se separaron las proteínas antibacterianas de las plaquetas (PMP – proteína bactericida derivada del gránulo a) por centrifugación (2,000 x g, 10 min) para luego exponerlas frente al *Estafilococo aureus*, encontrándose una inhibición de su crecimiento; este efecto aumentaba cuando era expuesto junto con la oxacilina. A diferencia de nuestro trabajo, el estudio de Yeaman separó a la proteína por una alta

centrifugación, procedimiento que les permitió garantizar su aislamiento, mientras que las revoluciones usadas por el presente estudio sólo fueron de 400 x g. Esta situación nos conduce a un próximo estudio sobre la viabilidad de las plaquetas activadas según el protocolo de Gonshor, porque en este estudio algunas cepas del *Estafilococo aureus* se mostraron sensibles a las proteínas liberadas por las plaquetas mientras que otras se mantuvieron resistentes. También sería necesario establecer cuales de las cepas del *Estafilococo* son las que presentan la sensibilidad.

Hasta el momento los estudios clínicos realizados con el PRP están dirigidos a observar su acción sobre el tejido óseo y mucosas, obteniéndose diferentes y en muchos casos controversiales resultados; sin embargo, también es necesario realizar estudios clínicos para evaluar su acción antibacteriana, tema sobre el que se necesita mayor evidencia.

El estudio concluye que el plasma rico en plaquetas (PRP) no presenta un efecto inhibitor del crecimiento in vitro del *Estafilococo aureus*. La combinación del PRP con Ampicilina 500mg inhibe el crecimiento in vitro del *Estafilococo aureus*, pero el PRP no aumenta el efecto bactericida del antibiótico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schenk R. Bone Regeneration: biologic basis. En: Buser, Dahlin, Schenk (editor). Guide Bone Regeneration in Implant Dentistry. Hong Kong: Quintessence Publishing Co, Inc. 1994:49-100.
2. Lemos J, Rossi R, Píspico R. Utilização de Plasma Rico em Plaquetas em enxertos óseos – Proposta de um Protocolo de Obtenção simplificado. (en línea) Medcenter.com Odontología. 2002. Fecha de acceso: 31 de mayo de 2005. Disponible en: <http://www.odontologia.com.br/artigos.asp?id=225&desp=6&ler=s>
3. Liébana J, Castillo A, Álvarez M. Enfermedades periodontales: consideraciones microbiológicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2004; 9 Suppl:75-91.
4. Saglimbeni M, Salazar de Plaza E, Uso terapéutico de la Amoxicilina - Acido Clavulánico en la enfermedad periodontal. Acta Odontológica Venezolana. Revista en línea. 2002 ; 40(3). Disponible en: http://www.actaodontologica.com/ediciones/2002/3/amoxicilina_acido_clavulnico.asp#top
5. Pires de Abreu L, Mas Ortiz R, Calafati de Castro S, Pedrazzoli J. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration. J Pharm Pharmaceut 2003 ; 6(2): 223-230.
6. Cabrejos J. Terapia antibiótica de la infección bucofacial odontogénica. Lima-Perú. Centro de Producción Editorial - Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2004: 79-83.
7. Tözüm T, Demiralp B. Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry. Journal of the Canadian Dental Association 2003; 69(10): 664-664
8. García M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. Rev Cubana Angiol y Cir Vasc 2000; 1(2): 132-41
9. Trowbridge H, Emling R.C. Inflammation. A review of the process. 5a ed. Quintessence Publishing Co Inc, 1997.
10. Bayer A, Prasad R, Chandra J, Koul A, Smriti M, Varna A., Skurray R, Firth N, Brown M, Su-Pin Koo, Yeaman M. In vitro Resistance of Staphylococcus aureus to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein Is Associated with Alterations in Cytoplasmic Membrane Fluidity. Infection and Immunity 2000; 68(6):3548-3553.
11. Weir D, Stewart J. Inmunología. 8a ed. Editorial El Manual Moderno, 1999.
12. Klinger MHF., Ulbricht T. Participation of Human Blood Platelets in Antimicrobial Host Defense. Transfus Med Hemother 2003; 30: 57-62.
13. Kupferwasser L, Yeaman M, Shapiro S, Nast C, Bayer A. In Vitro Susceptibility to Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein Is Associated with Reduced Disease progression and Complication Rates in Experimental Staphylococcus aureus Endocarditis. Microbiological, Histopathologic, and Echocardiographic Analyses. Circulation 2002;105:746-752.
14. Yeaman M, Sullam P, Dazin P, Bayer A. Platelet Microbicidal Protein Alone and in Combination with Antibiotics Reduces Staphylococcus aureus Adherence to Platelets In Vitro. Infection and Immunity 1994; 62(8):3416-3423.
15. Yeaman M, Norman D, Bayer A. Platelet Microbicidal Protein Enhances Antibiotic-Induced Killing of and Postantibiotic Effect in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agent and Chemotherapy 1992;36(8):1665-1670
16. Dhawan V, Bayer A, Yeaman M. In vitro Resistance to Thrombin- Induced Platelet Microbicidal Protein is Associated with Enhanced Progression and Hematogenous Dissemination in Experimental Staphylococcus aureus Infective Endocarditis. Infect Immun. 1998;66(7):3476-3479.
17. Mannaioni P, Di Bello M, Masini E. Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. Inflammation research 1997;46(1):4-18.
18. Marsh. P, Martín M. Oral Microbiology. 4a ed. MPG Books. Great Britain, 2001.
19. Su-Pin K., Bayer A, Kagan B, Yeaman M. Membrane Permeabilization by Thrombin-Induced Platelet Microbicidal Protein 1 Is Modulated by Transmembrane Voltage Polarity and Magnitude. Infection and Immunity 1999;67(5):2475-2481.

20. Tayebeh Y, Arnaud D, Massé J, Guichard J, Cramer E. Host defense rol: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. Journal of American society of hematology. Blood. 2002;99(11):4021-4029.
21. Tözüm T, Demiralp B. Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry. Journal of the Canadian Dental Association 2003;69(10): 664-664.
22. Romero R. Análisis histológico de la regeneración in vivo el complejo pulpo-dentinario humano con ingeniería tisular autóloga. Odontología Sanmarquina 2004;8(1):10-13.
23. Gonshor A. Technique for producing Platelet-Rich Plasma and Platelet Concentrate: Background and Process. Int. J Periodontics Restorative Dent 2002;22:547-557.
24. Brees M, Bekow R. El Manual Merk de Diagnóstico y Tratamiento. 10a ed. Ed Harcourt 1999:2532- 2557.
25. Venturelli A. Regeneración Ósea: Plasma Rico en Plaquetas. Rev Asoc Odontológica Argentina 1999;87(6):459-467.
26. Dinatale E. Diseminación de la infección odontogénica. Acta Odontol. Venez 2000;38(1)
27. Sphepherd, J. P. Osteomyelitis of the tibia following dentoalveolar abscess. A case report. Br Dent J. 1978;145:267-272.
28. Madigan M, Martinko J. Biology of Microorganisms. 11a ed. Pearson Prentice Hall. USA, 2006.
29. Lindhe J, Karting T, Lang N. Clinical Periodontology and Implant dentistry. 4a ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005.

Presentado para su publicación:
23/04/09

Aceptado para su publicación:
02/06/09