



# UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP-  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas

## TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

## AUTOR

Jibaja Caceres, Sandro Juniors

ORCID:0000-0002-3600-4682

## ASESOR

Foy Valencia, Enzo Carol

ORCID:0000-0001-7591-813X

Lima, Perú

2023

## **Metadatos Complementarios**

### **Datos de autor(a):**

Jibaja Caceres, Sandro Juniors

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 46650025

### **Datos de Asesor:**

Foy Valencia, Enzo Carol

Tipo de documento de identidad: DNI

Número de documento de identidad: 07006149

### **Datos del jurado:**

JURADO 1: Agurto Saenz, Tomás Rene

Número de documento de identidad: 07207884

Código ORCID: 0000-0001-5186-9265

JURADO 2: Tabacchi Bolivar, Dalinda Patricia

Número de documento de identidad: 25508227

Código ORCID: 0000-0002-2394-0156

JURADO 3: Guerra Santa Cruz, Alcides

Número de documento de identidad: 28260663

Código ORCID: 0000-0002-5130-8190

### **Datos de la investigación:**

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.01

Código del Programa: 511206

## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, SANDRO JUNIORS JIBAYA CÁCERES, con código de estudiante N° 2008/0031, con (DNI o Carné de Extranjería) N° 46650025, con domicilio en CALLE GRAN 341, distrito MICAFLORES, provincia y departamento de LIMA.

En mi condición de bachiller en Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, declaro bajo juramento que:

(El/la) presente (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación)

titolado: "EFECTO ANTI-MICROBIANO IN VITRO DEL PLASMA HUMANO POBRE en PLAQUETAS (PPP- $\leq 400000$  PLT/UL) y DEL PLASMA HUMANO RICO en PLAQUETAS (PRP- $\geq 400000$  PLT/UL) CONTRA *Escherichia coli* "AISLADA DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS"

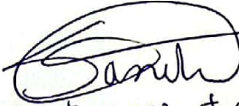
es de mi única autoría, bajo el asesoramiento del docente Dr. ENZIO FOY VALENCIA, y no existe plagio y/o copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica o de investigación, universidad, etc; (el/la) cual ha sido sometido (a) al antiplagio Turnitin y tiene el 14 % de similitud final.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación), el contenido de estas corresponde a las opiniones de ellos, y por las cuales no asumo responsabilidad, ya sean de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de internet.

Asimismo, ratifico plenamente que el contenido íntegro del(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) es de mi conocimiento y autoría. Por tal motivo, asumo toda la responsabilidad de cualquier error u omisión en el(la) (tesis/ trabajo de suficiencia profesional/ proyecto de investigación) y soy consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de falsa declaración, me someto a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y a los dispositivos legales nacionales vigentes.

Surco, 18 de Julio de 2023

  
SANDRO JUNIORS JIBAYA CÁCERES  
(Nombre completo)

(DNI o Carné de Extranjería  
N°) 46650025

<sup>1</sup> Se debe colocar la opción que corresponda, realizar lo mismo en todo el texto del documento.

  
Mg. Mario Martín Pauta Gálvez  
Jefe Unidad Grados y Títulos  
FCB

# Efecto antimicrobiano in vitro del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP- $\leq 400000$ Plt/ $\mu$ l) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP- $\geq 400000$ Plt/ $\mu$ l) contra Escherichia coli aislada de muestras urinarias humanas

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>14%</b>	<b>15%</b>	<b>7%</b>	<b>6%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>www.urp.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>3%</b>
<b>2</b>	<b>idus.us.es</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>es.scribd.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>creativecommons.org</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Universidad Ricardo Palma</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>7</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>8</b>	<b>repository.unab.edu.co</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

9	<a href="http://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	<1 %
10	<a href="http://opendata.dspace.ceu.es">opendata.dspace.ceu.es</a> Fuente de Internet	<1 %
11	<a href="#">Submitted to Universidad de los Andes - Chile</a> Trabajo del estudiante	<1 %
12	<a href="http://revistas.upeu.edu.pe">revistas.upeu.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
13	<a href="http://documentop.com">documentop.com</a> Fuente de Internet	<1 %
14	<a href="http://repodigital.unrc.edu.ar">repodigital.unrc.edu.ar</a> Fuente de Internet	<1 %
15	<a href="http://purl.org">purl.org</a> Fuente de Internet	<1 %
16	<a href="http://dok.u.pub">dok u.pub</a> Fuente de Internet	<1 %
17	<a href="http://repositorio.umsa.bo">repositorio.umsa.bo</a> Fuente de Internet	<1 %
18	<a href="#">Submitted to Universidad Cientifica del Sur</a> Trabajo del estudiante	<1 %
19	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	<1 %
20	<a href="http://repositorio.unapiquitos.edu.pe">repositorio.unapiquitos.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %

21	<a href="https://scielo.sld.cu">scielo.sld.cu</a> Fuente de Internet	<1 %
22	<a href="http://www.revactamedica.sld.cu">www.revactamedica.sld.cu</a> Fuente de Internet	<1 %
23	<a href="http://cunori.edu.gt">cunori.edu.gt</a> Fuente de Internet	<1 %
24	Diana Ibáñez Peinado. " Estudio de la capacidad antimicrobiana de sustancias naturales in vivo e in vitro", Universitat Politecnica de Valencia, 2022 Publicación	<1 %
25	<a href="http://repositorio.uap.edu.pe">repositorio.uap.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
26	<a href="http://repositorio.usmp.edu.pe">repositorio.usmp.edu.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
27	<a href="http://www.elsevier.es">www.elsevier.es</a> Fuente de Internet	<1 %
28	<a href="http://www.aulavirtualusmp.pe">www.aulavirtualusmp.pe</a> Fuente de Internet	<1 %
29	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
30	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fuente de Internet	<1 %

[repositorio.utp.edu.co](http://repositorio.utp.edu.co)

31

Fuente de Internet

&lt;1 %

32

[www.scielo.org.co](http://www.scielo.org.co)

Fuente de Internet

&lt;1 %

33

Łukasz Piszczorowicz, Dorota Król, Stanisław Dyląg. "Autologous platelet-rich plasma therapy —a promising method for tissue repair/ /regeneration in many medical fields", Journal of Transfusion Medicine, 2020

Publicación

&lt;1 %

34

Submitted to euroinnova

Trabajo del estudiante

&lt;1 %

35

[dspace.utb.edu.ec](http://dspace.utb.edu.ec)

Fuente de Internet

&lt;1 %

36

[repositorio.unsch.edu.pe](http://repositorio.unsch.edu.pe)

Fuente de Internet

&lt;1 %

37

[ijp.iranpath.org](http://ijp.iranpath.org)

Fuente de Internet

&lt;1 %

38

[eprints.ucm.es](http://eprints.ucm.es)

Fuente de Internet

&lt;1 %

39

[repositorio.uta.edu.ec](http://repositorio.uta.edu.ec)

Fuente de Internet

&lt;1 %

40

[saber.ucv.ve](http://saber.ucv.ve)

Fuente de Internet

&lt;1 %

[www.icn.ch](http://www.icn.ch)

41

Fuente de Internet

<1 %

42

[pdfs.semanticscholar.org](https://pdfs.semanticscholar.org)

Fuente de Internet

<1 %

43

[tesis.ucsm.edu.pe](https://tesis.ucsm.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

44

[www.colibri.udelar.edu.uy](http://www.colibri.udelar.edu.uy)

Fuente de Internet

<1 %

45

[repositorio.usanpedro.edu.pe](https://repositorio.usanpedro.edu.pe)

Fuente de Internet

<1 %

46

[vdoc.pub](https://vdoc.pub)

Fuente de Internet

<1 %

47

[www.grafiati.com](http://www.grafiati.com)

Fuente de Internet

<1 %

Ex cluir citas

Activo

Ex cluir coincidencias < 20 words

Ex cluir bibliografía

Activo



## ***DEDICATORIA***

*A Dios, quien ha sido mi guía durante toda esta nueva aventura llamada Tesis de Licenciatura y me ha dado fortaleza para seguir adelante y concluirla.*

*A mi abuelo Alejandro Amador Cáceres Urdanivia (QEPE), que desde el cielo me observa, ilumina y protege. A mi abuela Valvurga Ruth Vásquez Bravo, por su amor y cariño brindado.*

*A mi Madre, Nora Mercedes Cáceres Vásquez, por el apoyo incondicional en mi carrera y por siempre estar alentándome a realizar y concluir la Tesis.*

*A mis hermanos, Alonso Adolfo Jibaja Cáceres y Marcoantonio Jibaja Cáceres, por su amor fraternal, apoyo y aliento constante que me brindaron día a día durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura.*

## **AGRADECIMIENTOS**

***“Si no conozco una cosa, la investigaré”. Louis Pasteur***

*Esta tesis no hubiera sido lograda sin el apoyo de las siguientes personas:*

*A Dios, por darme la fuerza para seguir con mis sueños y proyectos.*

*A mi Madre, por apoyarme con mis aventuras científicas.*

*A mis hermanos, por estar siempre conmigo y echarme ánimos.*

*A mi asesor, Dr. Enzo Foy Valencia, por confiar en mí desde el inicio del proyecto, por brindarme su amistad, consejos, experiencia y apoyo para terminar mi tesis.*

*Al Dr. Iván Rodríguez Chávez y al Dr. Fred García Alayo PhD por su amistad, sus palabras de aliento y su apoyo.*

*A mi padre putativo Luis Villegas Pajuelo, por su incondicional amistad, su apoyo y por confiar siempre en mí.*

*A mis amigos Jean Paul Falen Bernex y Fernando Felipe Norberto Chueca Calle, por su amistad brindada, el aliento constante y el tiempo brindado.*

# Índice

1.	INTRODUCCIÓN .....	1
1.2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	14
1.3	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
2.	OBJETIVOS .....	16
2.1	OBJETIVO GENERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	16
3.	MARCO TEORICO .....	17
3.1	PLAQUETAS .....	17
3.2	PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP) .....	20
3.3	DERIVADOS DEL PRP .....	22
3.3.1	PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP).....	22
3.3.2	PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y LEUCOCITOS (L-PRP) .....	23
3.3.3	PLASMA RICO EN PLAQUETAS PURO (P-PRP).....	23
3.3.4	FACTORES DE CRECIMIENTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS RICO (PRP-GF) .....	24
3.4	SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE PLAQUETAS .....	24
3.4.1	POSEIDO .....	24
3.4.2	MISHRA .....	26
3.4.3	SISTEMA DE CLASIFICACIÓN PAW .....	27
3.5	INFECCIONES URINARIAS .....	28
3.5.1	INCIDENCIA.....	29
3.5.2	ETIOLOGÍA .....	30
3.5.2.1	BACTERIAS UROPATÓGENAS .....	31
3.5.2.1.1	<i>Escherichia coli</i> UROPATÓGENA .....	31
3.5.2.2	MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA .....	33
3.5.2.2.1	MÉTODOS FENOTÍPICOS .....	34
3.5.3	EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO <i>IN VITRO</i> .....	36
3.5.3.1	MÉTODO DE KIRBY-BAUER.....	36
4.	ANTECEDENTES.....	37
4.1	ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	37
4.2	ANTECEDENTES NACIONALES .....	46
5.	HIPÓTESIS.....	47

5.1	GENERAL .....	47
5.2	ESPECÍFICA .....	47
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
6.1	LUGAR DE EJECUCIÓN .....	48
6.2	DISEÑO METODOLÓGICO .....	48
6.3	VARIABLES .....	48
6.3.1	VARIABLE INDEPENDIENTE.....	48
6.3.2	VARIABLE DEPENDIENTE.....	48
6.4	OPERALIZACIÓN DE VARIABLES.....	49
6.5	MUESTREO .....	49
6.6	PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS .....	49
6.6.1	AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS	49
6.6.1.1	RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	49
6.6.1.2	COLORACIÓN GRAM.....	50
6.6.1.3	AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> .....	50
6.6.2	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	51
6.6.3	CENTRIFUGACIÓN DE LA MUESTRA.....	51
6.6.4	OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO POBRE EN PLAQUETAS (PPP).....	51
6.6.5	OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO RICO EN PLAQUETAS (PRP).....	52
6.6.6	CONTEO DE LEUCOCITOS Y PLAQUETAS .....	52
6.6.7	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO <i>in vitro</i> DEL PPP y DEL PRP CONTRA <i>Escherichia coli</i> AISLADA DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS .....	53
6.6.7.1	MÉTODO DE KIRBY BAUER.....	53
6.6.7.1.1	PREPARACIÓN DEL INÓCULO .....	53
6.6.7.1.2	INOCULACIÓN DE LAS PLACAS.....	53
6.6.7.1.3	APLICACIÓN DE LOS DISCOS .....	54
6.6.7.1.4	LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN .....	55
6.6.7.2	TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN .....	55
6.7	ASPECTOS ÉTICOS .....	56
7.	RESULTADOS.....	57
7.1	AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS ....	57
7.2	OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO POBRE EN PLAQUETAS (PPP $\leq$ 400000 PLT/ $\mu$ L) Y DEL PLASMA HUMANO RICO EN PLAQUETAS (PRP- $\geq$ 400000 PLT/ $\mu$ L) ...	59
7.3	CONTEO DE LEUCOCITOS Y PLAQUETAS .....	60

7.4	CLASIFICACIÓN DEL PPP Y DEL PRP CON EL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN PAW	61
7.5	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL PPP Y DEL PRP CONTRA <i>Escherichia coli</i> AISLADA DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER	62
7.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
8.	DISCUSIÓN	68
9.	CONCLUSIONES	76
10.	RECOMENDACIONES	77
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
12.	ANEXOS	88

## Índice de Figuras

<b>Fig. 1:</b> Coloración GRAM.....	2
<b>Fig. 2:</b> Componentes de la Sangre.....	4
<b>Fig. 3:</b> Microfotografía electrónica de una plaqueta .....	8
<b>Fig.4:</b> Obtención del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP).....	12
<b>Fig.5:</b> Ilustración esquemática de la matriz y arquitectura celular de las 4 familias de concentrados de plaquetas .....	16
<b>Fig.6:</b> Sistema de Clasificación de Plaquetas PAW .....	18
<b>Fig.7:</b> Reacciones de color específicas de microorganismos en el CHROMOagar Orientación.....	26
<b>Fig.8:</b> Direcciones del sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.....	45
<b>Fig.9:</b> Muestra urinaria humana S utilizada para el aislamiento de <i>E. coli</i> .....	48
<b>Fig.10:</b> Coloración GRAM de la muestra urinaria S .....	49
<b>Fig.11:</b> Colonias de <i>Escherichia coli</i> en el CHROMOagar orientación.....	49
<b>Fig.12:</b> Extracción de Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP).....	50
<b>Fig.13:</b> Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana contra <i>Escherichia coli</i> aislada de muestras urinarias humanas .....	55

## Índice de Tablas

<b>Tabla N° 1:</b> Contenido de los gránulos alfa y su función.....	10
<b>Tabla N° 2:</b> Clasificación del PRP propuesta por Mishra y sus colaboradores .....	17
<b>Tabla N° 3:</b> Cantidad de Plaquetas, Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos en el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP).....	51
<b>Tabla N° 4:</b> Cantidad de Plaquetas, Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos en el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP).....	52
<b>Tabla N° 5:</b> Clasificación de las 7 muestras de Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y de las 5 muestras de Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) de acuerdo al sistema de clasificación PAW .....	53
<b>Tabla N° 6:</b> Halos de inhibición (mm) en el agar Mueller- Hinton (Merck, Alemania) de <i>Escherichia coli</i> aislada de muestras urinarias humanas .....	54
<b>Tabla N° 7:</b> Análisis Estadísticos de los halos de inhibición del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) .....	56
<b>Tabla N° 8:</b> Prueba de Shapiro-Wilk .....	57
<b>Tabla N° 9:</b> Prueba de Levine.....	57
<b>Tabla N° 10:</b> Prueba T de Student para muestras independiente 5iError! Marcador no definido.	
<b>Tabla N° 11:</b> Puntos de Corte para Disco Difusión para Enterobacterias (CLSI, 2020) .....	98

## RESUMEN

Los concentrados autólogos de plaquetas han sido utilizados en diversas áreas de la medicina, como la medicina deportiva, cirugía estética y plástica, odontología, traumatología, reumatología, entre otros. La importancia detrás de su uso radica a la liberación de una diversidad de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas localizadas en los gránulos  $\alpha$  intracelulares de las plaquetas que promueven la regeneración de tejidos blandos como duros. Asimismo, últimamente se han señalado propiedades antimicrobianas contra diversas bacterias. En este estudio se determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas. Se obtuvieron muestras de sangre de 6 pacientes voluntarios que fueron informados sobre el estudio y firmaron el consentimiento informado. La susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* se determinó mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Las zonas de inhibición producidas por el PPP oscilaron entre 13,3 mm y 19,3 mm de diámetro y del PRP oscilaron entre 9,7 mm y 18,7 mm de diámetro. Por lo que, el PPP y el PRP presenta propiedades antimicrobianas contra *E. coli* uropatógena, y sugiere que es una sustancia autóloga potencialmente útil en la lucha contra las infecciones urinarias.

**Palabras claves:** Infecciones urinarias, PPP, PRP, Efecto antimicrobiano, Método Kirby-Bauer



## ABSTRACT

Autologous platelet concentrates have been used in various areas of medicine, such as sports medicine, aesthetic and plastic surgery, dentistry, traumatology, rheumatology, among others. The importance behind its use lies in the release of a diversity of growth factors and other bioactive molecules located in the intracellular  $\alpha$  granules of the platelets that promote the regeneration of soft and hard tissues. Likewise, lately antimicrobial properties against various bacteria have been reported. In this study, the *in vitro* antimicrobial effect of Platelet-Poor Human Plasma (PPP) and Platelet-Rich Human Plasma (PRP) was determined against *Escherichia coli* isolated from human urinary samples. Blood samples were obtained from 6 voluntary patients who were informed about the study and signed the informed consent. *In vitro* antimicrobial susceptibility was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method. The zones of inhibition produced by the PPP ranged from 13.3 mm to 19.3 mm in diameter and from the PRP ranged from 9.7 mm to 18.7 mm in diameter. Therefore, PPP and PRP have antimicrobial properties against uropathogenic *E. coli*, suggesting that it is a potentially useful autologous substance in the fight against urinary tract infections.

**Keywords:** Urinary tract infections, PPP, PRP, Antimicrobial effect, Kirby-Bauer Method

## 1. INTRODUCCIÓN

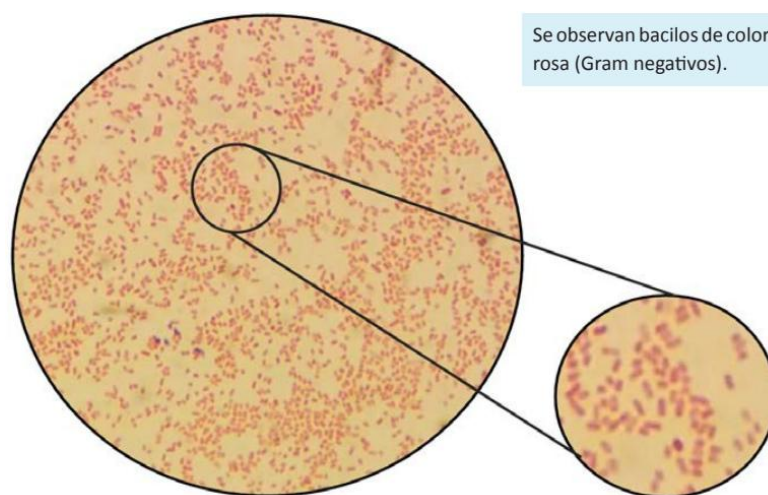
Las Infecciones Urinarias (IUs) son una de las principales causas de consulta y de hospitalización a nivel mundial (Gómez *et al.*, 2009; Machado & Murillo, 2012; Leguizamón *et al.*, 2017). Es la segunda enfermedad infecciosa más frecuente después de la infección de vías respiratorias (Orrego-Marin *et al.*, 2014; Passadouro *et al.*, 2014; Leguizamón *et al.*, 2017), anualmente se reportan alrededor de 150 millones de casos con diferencias en las frecuencias acorde a la edad. En los Estados Unidos se estima que las infecciones urinarias son causa de aproximadamente 7 millones de visitas a los médicos, 1 millón de visitas al departamento de emergencia y 100 mil hospitalizaciones al año (Carranza *et al.*, 2003; Orrego-Marin *et al.*, 2014). Por otra parte, en el Perú se desconocen cifras exactas de su incidencia, pero es muy probable que las cifras sean muy similares a las de EE UU (Echevarría *et al.*, 2006).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por su nombre en inglés) define a las infecciones urinarias como un proceso inflamatorio que implica la invasión y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario, con presentación de disuria, dolor suprapúbico, fiebre y urgencia miccional, aunque es muy común su forma asintomática (Orrego-Marin *et al.*, 2014), siendo más común en mujeres que en varones debido a la corta distancia entre el ano y la vagina. Por el contrario, en la primera infancia las infecciones urinarias predominan en los hombres frente a las mujeres debido a la presencia de fimosis en los niños que propicia la colonización de microorganismos en el meato urinario y en la uretra; mientras que en adultos tiene mayor frecuencia en las mujeres entre 20 y 56 años. Las diferencias en las frecuencias por sexo de las IUs disminuyen solamente después de los 65 años cuando la relación se invierte debido a la retención, incontinencia urinaria y al aumento de la hiperplasia benigna de próstata (Orrego-Marin *et al.*, 2014).

Las infecciones urinarias son causadas principalmente por bacterias Gram Negativas siendo el principal responsable *Escherichia coli* (75 a 90 % de los casos de IU), *Klebsiella sp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.* y *Staphylococcus saprophyticus* (Machado & Murillo, 2012; Orrego-Marín *et al.*, 2014; Passadouro *et al.*, 2014). *E. coli* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia de las enterobacterias, forma parte de la microbiota humana y tiene como hábitat el intestino del hombre (Carranza *et al.*, 2003). Son bacterias oportunistas ya que cuando salen de su lugar de procedencia generan diversos tipos de enfermedades.

### Figura 1

Coloración GRAM



Nota: Coloración GRAM Negativa de *Escherichia coli*.  
Tomado de Gonzales Meléndez *et al.*, 2020.

Para tratar las infecciones urinarias, los médicos recetan antibióticos de forma empírica debido a que los urocultivos tardan más de 48 horas en otorgar los resultados del microorganismo que produce la infección. Sin embargo, el uso abusivo de antibióticos baratos y de espectro limitado, una terapia inapropiada, la realización de un esquema terapéutico incompleto o prolongado y la no adherencia al tratamiento, han generado un aumento de la resistencia a los antibióticos por parte de estos microorganismos (Orrego-Marín *et al.*, 2014).

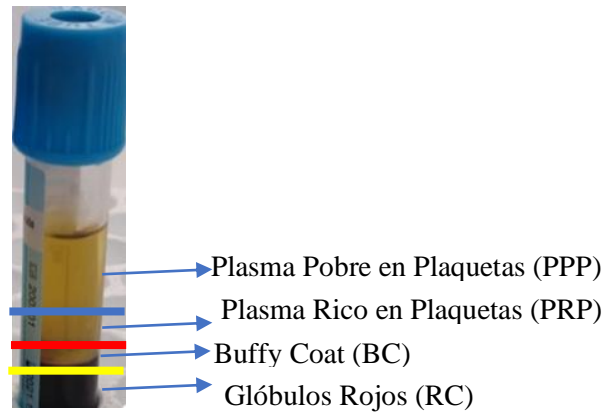
La resistencia antibiótica representa una grave amenaza para la salud pública, aumentando los costos de la atención médica y los fracasos terapéuticos, considerándose un problema mundial que afecta tanto a países desarrollados y como a países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha catalogado como un problema prioritario de la humanidad y, desde 2001, se ha instituido medidas globales para su control, destacando la vigilancia de las resistencias, la educación a los prescriptores y a los profesionales de la salud (Passadouro *et al.*, 2014).

Dentro de las medidas globales impuestas por la OMS, se encuentra la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Dentro de esta búsqueda podemos encontrar como una opción terapéutica contra las infecciones urinarias al Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

Durante los últimos 20 años, las preparaciones ricas en plaquetas autólogas han alcanzado una gran popularidad en diversos campos de la medicina, como la odontología, la cirugía oral, la ortopedia, la medicina deportiva, la dermatología, la oftalmología, la cirugía estética y plástica (Drago *et al.*, 2013; Gálvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014; Fabbro *et al.*, 2016). Su utilización se justifica debido a la liberación de una variedad de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas localizadas en los gránulos  $\alpha$  intracelulares de las plaquetas que tras su liberación después de la activación plaquetaria modulan los procesos de cicatrización de heridas y regeneración de tejidos blandos como duros.

## Figura 2

### Componentes de la sangre



Nota: Componentes de la sangre después de la centrifugación. Elaboración propia.

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un derivado sanguíneo concentrado obtenido mediante centrifugación de la sangre total que se caracteriza por poseer una alta concentración de plaquetas de 4 a 6 veces sus valores normales (Carrillo *et al.*, 2013). A partir del PRP (Fig. 2) podemos obtener diversos derivados como son el Plasma Rico en Plaquetas Rico en Leucocitos (L-PRP), el Plasma Puro Rico en Plaquetas (P-PRP), los Factores de Crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas (PRP-GF) y el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP). A pesar de ser utilizados en diversos campos de la medicina, hay pocos estudios sobre su efecto antibacteriano contra bacterias GRAM + y GRAM -. Por esta razón, este trabajo de investigación busca demostrar el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas.

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el año 2019, se estimó de 204 países que 4,95 millones de muertes estaban asociadas a la resistencia antibiótica por parte de microorganismos patógenos (Murray *et al.*, 2022), de las cuales 1,27 millones de muertes fueron directamente adjudicadas a la resistencia. La principal causa de la resistencia es la alta tasa de utilización de agentes antimicrobianos de forma empírica por el tiempo que se demora la identificación del microorganismo o de los microorganismos causante de la enfermedad.

Las infecciones urinarias están catalogadas a nivel mundial como la segunda enfermedad más frecuente en presentarse en las personas, generando aproximadamente 7 millones al año de visitas a los consultorios médicos. Principalmente es ocasionada por bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, entre otros. Para tratarlas se utilizan fármacos sintéticos, los cuales tiene efectos secundarios en los pacientes y a su vez generan microorganismos multidrogos resistentes.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente existe una amplia información sobre los diferentes derivados del Plasma Rico en Plaquetas para tratar diversas enfermedades. El L-PRP, P-PRP, PRP-GF y el PPP son derivados del PRP que se utilizan en diversas áreas medicas como medicina deportiva, traumatología, dermatología, oftalmología, entre otros.

El Plasma Rico en Plaquetas y sus derivados son utilizados para diversos tratamientos en una gran cantidad de enfermedades debido a la gran cantidad y variedad de factores de crecimiento y compuestos bioactivos que presentan los gránulos  $\alpha$  en las plaquetas. Estos compuestos factores de crecimiento y compuestos bioactivos pueden ser una alternativa farmacológica para el tratamiento de infecciones urinarias, sin presentar efectos secundarios y con un precio accesible para todas las personas.

La presente investigación se justifica porque a) es importante probar nuevos tratamientos alternativos contra las infecciones urinarias b) es necesario conocer los efectos antimicrobianos *in vitro* de los derivados del PRP sobre *Escherichia coli* aislada de muestras de orina con sospecha de infección c) hay pocos trabajos sobre los efectos antimicrobianos *in vitro* de los derivados del PRP contra *Escherichia coli* aislada de muestras de orina con sospecha de infección.

Finalmente, esta investigación como otras similares aumenta el conocimiento científico sobre los efectos antimicrobianos *in vitro* de los derivados del PRP.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y del Plasma Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar a la bacteria *Escherichia coli* de muestras urinarias humanas.
- Obtener el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) a partir de la sangre venosa.
- Contabilizar los Leucocitos, Plaquetas y Glóbulos rojos en el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y en el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l).
- Clasificar el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) con el sistema de clasificación PAW.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas por el método de Kirby- Bauer.



### 3. MARCO TEORICO

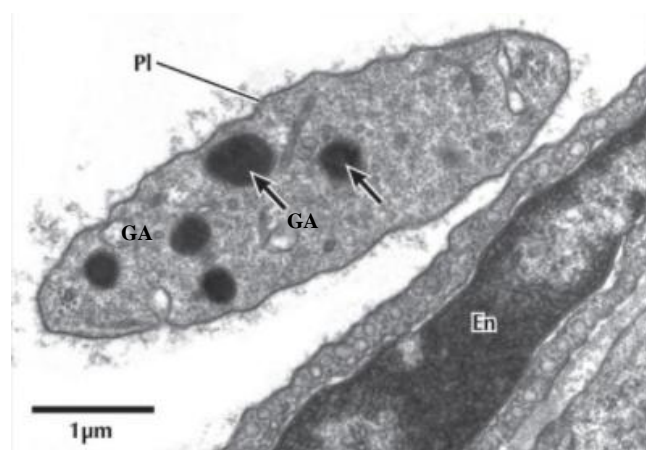
#### 3.1 PLAQUETAS

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados que proceden del citoplasma de los megacariocitos de la médula ósea (Carrillo *et al.*, 2013; Gálvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014; Rivera, 2020). Tienen forma discoide, con dimensiones aproximadamente 2-4  $\mu\text{m}$  por 0.5  $\mu\text{m}$  (Yeaman, 1997; Airasca, 2020; Ovalle & Nahirney, 2021). Su concentración normal en la sangre periférica es de 150000 a 400000 células/mL y permanecen en circulación un promedio de 10 días. De la cantidad total de plaquetas en el cuerpo, 30% permanece temporal en el bazo y el 70% restante está en circulación.

Las plaquetas contienen diversos organelos como mitocondrias, peroxisomas, ribosomas, así como glucógeno y gránulos (Carrillo *et al.*, 2013). Existen tres tipos de gránulos (Fig.3): Alfa, Delta o Densos y Lambda (Lisosomas).

#### Figura 3

Microfotografía electrónica de una plaqueta



*Nota:* PI: Plaqueta. Flechas negras: Gránulos densos. GA: Gránulos  $\alpha$  en el endotelio del vaso sanguíneo. Modificado de Ovalle & Nahirney, 2021.

Las plaquetas muestran características estructurales y funcionales peculiares asociadas a su participación en la defensa del huésped contra una infección. Por ejemplo, las plaquetas responden rápidamente a los agonistas asociados con un trauma vascular o una infección y se acumulan en sitios de daño endovascular o colonización microbiana (Yeaman, 1997). Las interacciones de las plaquetas con las proteínas del complemento y los componentes de la inmunidad humoral (leucocitos y células endoteliales) es mejorada por la activación de las plaquetas inducido por los agonistas. Asimismo, la respuesta antimicrobiana de las plaquetas es mejorada por las moléculas generadas por los leucocitos y las células endoteliales activadas.

Por otro lado, son capaces de unirse, agregarse e internalizar microorganismos, lo que mejora la eliminación de patógenos del torrente sanguíneo (Yeaman, 1997). Además, en un contexto de infección las plaquetas liberan una serie de potentes péptidos antimicrobianos para eliminar los microorganismos presentes. Estos péptidos antimicrobianos fueron identificados a través de diversos experimentos (Kahn & Flinton, 1974; Yeaman & Bayer, 1999; Tang, Yeaman & Selsted, 2002), identificando 7: Factor Plaquetario (PF-4), RANTES, Péptido Activador del Tejido Conectivo 3 (CTAP-3), Proteína Básica Plaquetaria (PBP), Timosina  $\beta$ 4 (T $\beta$ -4), fibrinopéptido A (FP-A) y Fibrinopéptido B (FP-B), localizados en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas.

De los tres tipos de gránulos secretores de plaquetas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\lambda$ ), el más abundante es el gránulo  $\alpha$ . Los gránulos  $\alpha$  son estructuras grandes, ricas en macromoléculas, comprenden entre el 10 al 15% del volumen total de las plaquetas (Fernández-Delgado *et al.*, 2012; Airasca, 2020) y encuentras entre 50 a 80 gránulos  $\alpha$  por plaqueta. De igual manera, contienen factores de crecimiento que participan en diversos procesos como el de cicatrización celular, angiogénesis, quimiotaxis endotelial, regeneración de tejidos, efecto antibacteriano, entre otros.

Dentro de los factores de crecimiento encontramos proteínas adhesivas, factores de coagulación, proteasas y antiproteasas, citoquinas, quimiocinas, proteínas antimicrobianas, glicoproteínas de membrana, condroitina, albúmina, inmunoglobulinas y otras proteínas básicas como el PF-4, la  $\beta$ tromboglobulina y las endostatinas (Fernández-Delgado *et al.*, 2012) donde destacan el factor de crecimiento transformante (TGF), PF4, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), la interleucina (IL)-1, el factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), el factor de crecimiento endotelial (VEFG), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PDEGF), el factor de crecimiento de células epiteliales (ECGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Rivera, 2020) (Tabla 1). Estos tienen una participación fundamental en la interacción entre las plaquetas y otras células a través de la liberación de sus factores de crecimiento.

**Tabla 1**

*Contenido de los gránulos alfa y su función*

Contenido	Función
<b>Quimiocinas, Citocinas</b>	Regulación de inflamación, quimiotaxis.
Factor plaquetario 4	
$\beta$ tromboglobulina	
RANTES	
Proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$	
Interleucina 1, Interleucina 8	
<b>Proteínas adhesivas</b>	Interacciones celulares, coagulación
Trombospondina 1 y 2	
Fibrinógeno	
Fibronectina	
<b>Factores de crecimiento</b>	Proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, angiogénesis, síntesis de matriz extracelular.
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	
Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ )	
Factor de crecimiento epidérmico o epitelial (EGF)	
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	
Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)	
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	
<b>Inmunoglobulinas</b>	Función inmunológica
IgA, IgE, IgM e IgG.	
<b>Factores de la coagulación (V y VIII)</b>	Producción de trombina
<b>Factor de von Willebrand</b>	Adherencia plaquetaria a la colágena del subendotelio
<b>Inhibidor del activador de Plasminógeno</b>	Inhibición de la fibrinólisis
<b>P-selectina</b>	Interacción leucocito-plaqueta

Los gránulos alfa contienen una gran cantidad de factores de crecimiento, proteínas adhesivas y factores procoagulantes. RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed and secreted.

Nota: Tomado de Rivera, 2020.

Los gránulos densos o  $\beta$  miden aproximadamente 150 nm de diámetro y son 10 veces menos abundantes que los gránulos  $\alpha$  (Airasca, 2020). Contienen adenosín difosfato (ADP), adenosín trifosfato (ATP) y serotonina (Fernández-Delgado *et al.*, 2012; Carrillo *et al.*, 2013). El ATP activa las células dendríticas para modular las vías inflamatorias, el ADP activa a las plaquetas mediante un mecanismo de retroalimentación y la serotonina recluta neutrófilos en los sitios de inflamación.

Los gránulos  $\lambda$  o lisosomas presentan un diámetro de aproximadamente 200 a 250 nm y contienen proteasas como la carboxilpeptidasa, que ayudan a destruir el coágulo formado por la acción plaquetaria.

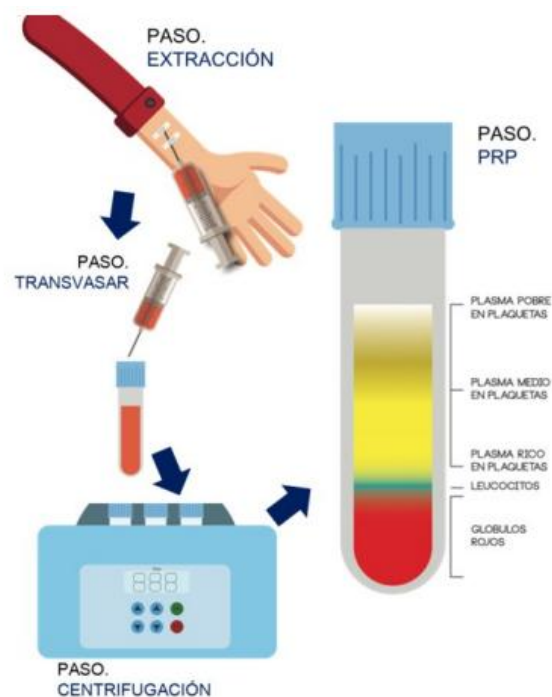
### **3.2 PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)**

El PRP (Fig. 4) es un derivado sanguíneo concentrado obtenido mediante centrifugación de la sangre total que se caracteriza por poseer una alta concentración de plaquetas (4 a 6 veces sus valores normales) (Fernández-Delgado *et al.*, 2012; Martínez-Martínez *et al.*, 2018; Rivera, 2020), cada vez es más aceptado en el campo de la medicina para el tratamiento de diversas patologías, empleado en las especialidades de ortopedia, estomatología y cirugía maxilofacial, dermatología, angiología, cirugía estética, oftalmología, medicina deportiva, medicina regenerativa, entre otros. Además, de los factores de crecimiento en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas existen otros componentes esenciales en el PRP, estos componentes son la fibrina, la fibronectina y la vitronectina, proteínas que actúan a nivel de la adhesión celular, estas proporcionan el soporte estructural necesario para la migración celular para la proliferación y crecimiento tridimensional de los tejidos sobre los que actúa (Rivera, 2020).

Antes de administrar el PRP hay que tener en cuenta algunas contraindicaciones a pesar de su inocuidad teórica: no se le puede aplicar a pacientes con infección activa, pacientes que usen anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios, pacientes con discrasias sanguíneas y pacientes que tomen inmunosupresores.

#### Figura 4

*Obtención de Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP)*



Nota: Tomado de Rivera, 2020.

Antes de administrar el PRP hay que tener en cuenta algunas contraindicaciones a pesar de su inocuidad teórica: no se le puede aplicar a pacientes con infección activa, pacientes que usen anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios, pacientes con discrasias sanguíneas y pacientes que tomen inmunosupresores.

El PRP funciona a través de la desgranulación de los gránulos en las plaquetas, los cuales contienen los factores de crecimiento (Marx, 2004), más del 95% de los factores de crecimiento son secretados en 1 hora al medio después de activarse la

coagulación (Kevy & Jacobson, 2001). Por consiguiente, el PRP debe administrarse en un estado anticoagulante dentro de los 10 minutos posteriores al inicio de la coagulación.

A partir del PRP se pueden obtener diversos derivados sanguíneos como el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), Plasma Rico en Plaquetas Rico en Leucocitos (L-PRP), Plasma Puro Rico en Plaquetas (P-PRP) y Factores de Crecimiento del Plasma Rico en Plaquetas (PRP-GF).

### **3.3 DERIVADOS DEL PRP**

Los derivados del Plasma Rico en Plaquetas se obtienen por diversas técnicas como la doble centrifugación, aspiración de leucocitos o la activación con gluconato de calcio.

#### **3.3.1 PLASMA POBRE EN PLAQUETAS (PPP)**

El Plasma Pobre en Plaquetas es obtenido después de la centrifugación, este primer paso se usa para separar la sangre en 3 capas siguiendo un gradiente en función de su peso (Dohan Ehrenfest, Rassmusson & Albrektsson., 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013): en la parte superior encontramos el plasma acelular conformado por el PPP y el PRP (Fig. 2), el buffy coat o la capa leucocitaria en el medio y en la parte inferior hallamos a los glóbulos rojos. El PPP ha sido utilizado en una diversidad de investigaciones para determinar si presenta actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* (Aggour & Gamil, 2017), *P. gingivalis* (Aggour & Gamil, 2017), *C. albicans* (Aggour & Gamil, 2017), y con efecto bacteriostático contra: *S. aureus* (Moojen *et al.*, 2008; Anitua *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2019), *S. epidermidis* (Anitua *et al.*, 2012), *E. coli* (Burnouf *et al.*, 2013), *K. pneumoniae* (Burnouf *et al.*, 2013;

Cetinkaya *et al.*, 2018), *S. aureus* resistente a meticilina (Cetinkaya *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2019), *P. aeruginosa* (Cetinkaya *et al.*, 2018), *A. actinomycetemcomitans* (Yang *et al.*, 2015), *P. gingivalis* (Yang *et al.*, 2015), *F. nucleatum* (Yang *et al.*, 2015) y redujo el biofilm de *S. aureus* (Hasan *et al.*, 2019).

### **3.3.2 PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y LEUCOCITOS (L-PRP)**

El L-PRP es una suspensión de plaquetas líquidas con leucocitos (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2012) y se consigue absorbiendo con una jeringa el PRP y la capa leucocitaria que se encuentra en el medio después de realizar el procedimiento de centrifugación. El L-PRP ha inhibido el crecimiento de bacterias como *S. aureus* resistente y sensible a meticilina, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, y *E. coli* (Mariani *et al.*, 2015; Cieślik-Bielecka *et al.*, 2018).

### **3.3.3 PLASMA RICO EN PLAQUETAS PURO (P-PRP)**

El P-PRP se obtiene extrayendo la fracción de PRP después de la centrifugación, se vuelve a centrifugar y se descarta la fracción de PPP. El P-PRP inhibió el crecimiento de *P. gingivalis* (Pham *et al.*, 2019), *E. faecalis* (Drago *et al.*, 2013), *C. albicans* (Drago *et al.*, 2013), *S. agalactiae* (Drago *et al.*, 2013; Maghsoudi *et al.*, 2017), *S. oralis* (Drago *et al.*, 2013), *Shigella sp.* (Maghsoudi *et al.*, 2017), *E. coli* (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Maghsoudi *et al.*, 2017), *S. aureus* (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Maghsoudi *et al.*, 2017), *S. epidermidis* (Maghsoudi *et al.*, 2017), *S. aureus* resistente (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Farghali *et al.*, 2019) y sensible a meticilina (Tang, Yeaman & Selsted. 2002), *Streptococcus* Grupo A (Li *et al.*, 2013), *N. gonorrhoeae* (Maghsoudi *et al.*, 2017) y con efecto bacteriostático contra: *E. coli* (Galvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014), *S. aureus* resistente y sensible a meticilina (Li *et al.*, 2013),

*Streptococcus* Grupo A (Li *et al.*, 2013) y *N. gonorrhoeae* (Li *et al.*, 2013).

### **3.3.4 FACTORES DE CRECIMIENTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS RICO (PRP-GF)**

El PRP-GF es preparado activando el PRP con cloruro de calcio (Anitua *et al.*, 2008), gluconato de calcio (Chen *et al.*, 2013), trombina + cloruro de calcio (Li *et al.*, 2013; Li & Li, 2013) y trombina (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Moojen *et al.*, 2008). Luego, se esperan 40 minutos aproximadamente para que el PRP se coagule y se introduce la aguja de una nueva jeringa estéril para extraer los factores de crecimiento. Hay muy pocos estudios que han utilizado el PRP-GF para verificar si posee actividad antimicrobiana (Anitua *et al.*, 2012)

## **3.4 SISTEMAS DE CLASIFICACIÓN DE PLAQUETAS**

En la historia del Plasma Rico en Plaquetas existen 3 principales sistemas de clasificación para poder definir y clasificar los diferentes productos producidos a partir del PPP y del PRP.

### **3.4.1 POSEIDO**

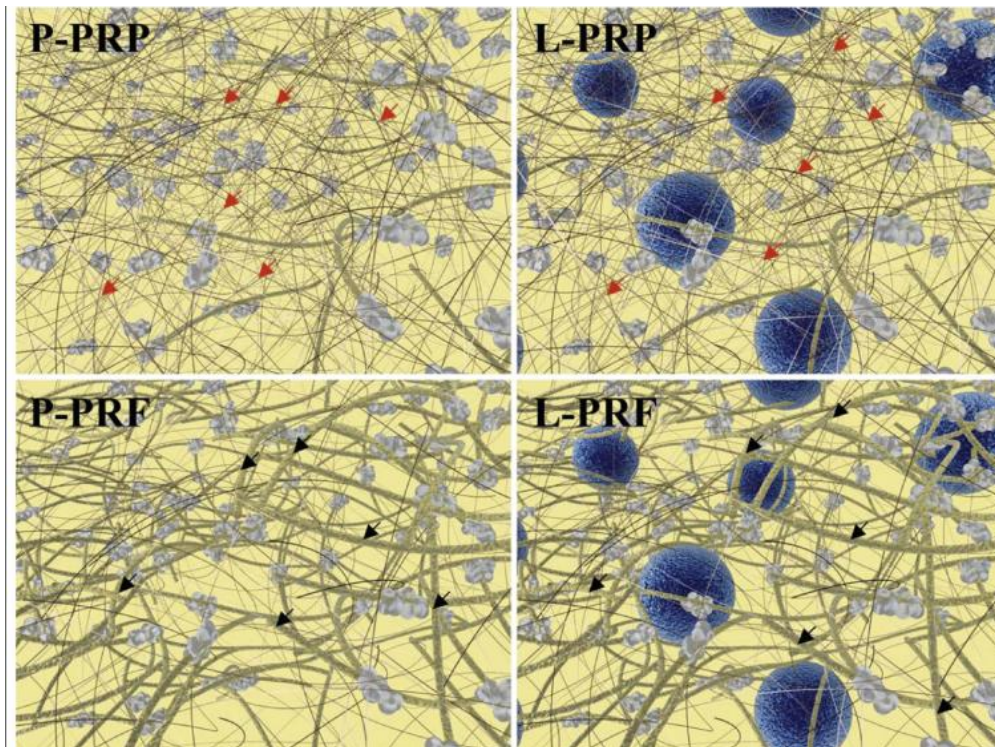
POSEIDO fue una conferencia de consenso realizada por la Organización de Periodoncia, Cirugía Oral, Estética e Implantología para establecer un sistema de clasificación de los derivados del PRP con la finalidad de poder clarificar las publicaciones sobre este tema. De esta conferencia de consenso nacieron 4 familias (Fig. 5) basados en el contenido de leucocitos y de fibrina (Dohan Ehrenfest, Rasmusson & Albrektsson., 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2014).



Tenemos las suspensiones líquidas concentradas con plaquetas: “Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP) sin leucocitos y Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos (L-PRP) Dohan Ehrenfest, Rasmussen & Albrektsson., 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2012; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2014). Por otro lado, tenemos a los biomateriales concentrados de plaquetas sólidas con una figura arquitectura de fibrina: Fibrina rica en Plaquetas Pura (P-PRF) y Fibrina Rica en Leucocitos y Plaquetas (L-PRF) (Dohan Ehrenfest, Rasmussen & Albrektsson., 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2012; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2014).

### Figura 5

*Ilustración esquemática de la matriz y la arquitectura celular de las 4 familias de concentrados de plaquetas*



Nota: Los círculos azules son leucocitos, las fibras amarillas/ marrón claro es la fibrina, las formas de color gris claro son agregados plaquetarios, las flechas rojas señalan fibrillas con un pequeño diámetro y las flechas negras señalan fibras de fibrina gruesas. Tomado de Dohan Ehrenfest, Rasmussen & Albrektsson., 2009

### 3.4.2 MISHRA

La clasificación elaborada por Mishra y colaboradores (Mishra *et al.*, 2012) está basada en los sistemas comerciales de obtención de PRP disponibles antes de la publicación de la clasificación propuesta por Dohan Ehrenfest. Ellos identificaron 4 tipos de PRP para elaborar su nuevo sistema de clasificación: tipo 1, 2, 3 y 4.

**Tabla 2**

*Clasificación del Plasma Rico en Plaquetas propuesta por Mishra y sus colaboradores*

Type	White Blood Cells	Activated?
1	Increased over baseline	No
2	Increased over baseline	Yes
3	Minimal or no WBCs	No
4	Minimal or no WBCs A: >5× platelets B: <5× platelets	Yes

Nota: Tomado de Mautner *et al.* 2015.

El PRP tipo 1 contiene una concentración de plaquetas y glóbulos blancos por encima del valor inicial y no está activado por un activador exógeno como la trombina y el calcio (Mishra *et al.*, 2012). El PRP tipo 2 presenta una concentración de plaquetas y glóbulos blanco por encima del valor inicial. No obstante, es activado con trombina o calcio.

El PRP tipo 3 solamente contiene una concentración de plaquetas por encima del valor inicial, la cantidad de leucocitos es mínima o no presenta y no es activado con trombina o calcio. El PRP tipo 4 presenta una concentración elevada de plaquetas por encima del valor inicial, los leucocitos son mínimos o no presenta y es activado por un agente exógeno.

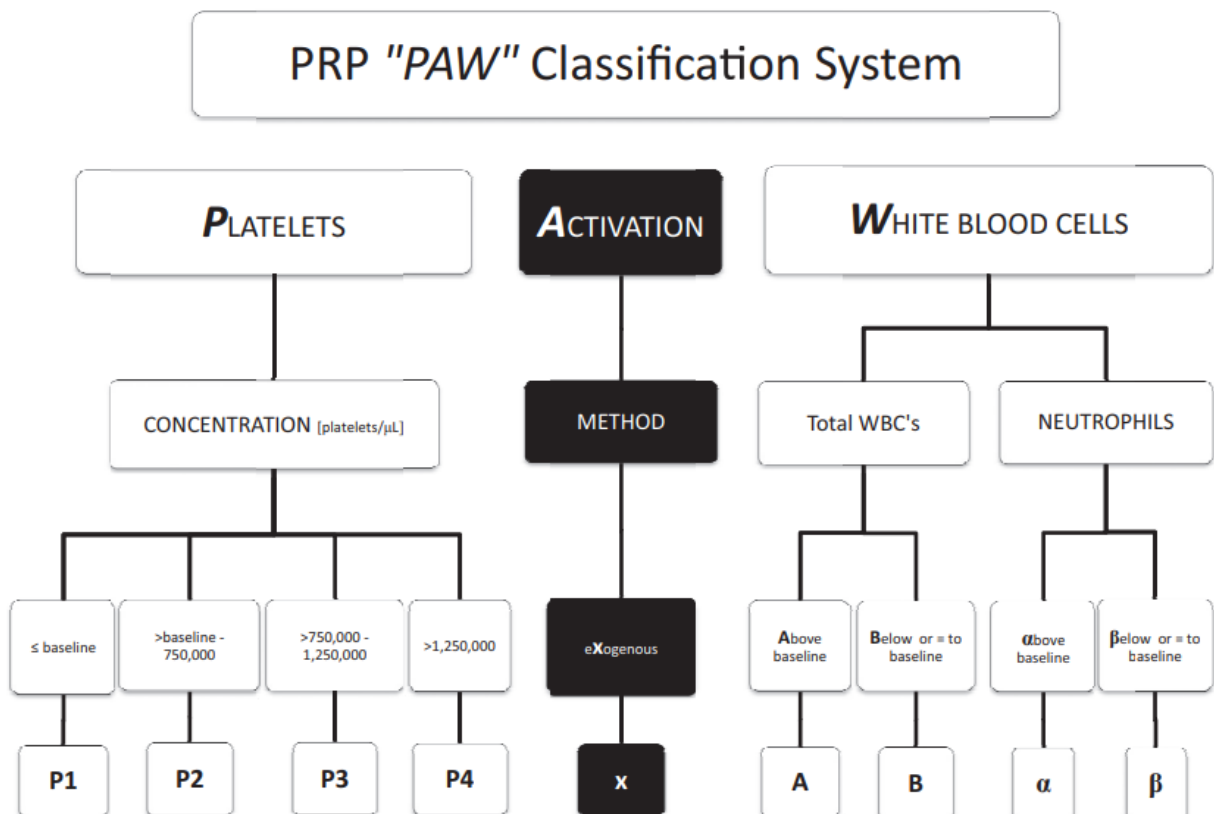
Asimismo, en este sistema de clasificación existen los subtipos A y B. El subtipo A presenta una concentración de plaquetas 5 veces mayor del valor inicial y el subtipo B presenta una concentración de plaquetas por debajo del subtipo A.

### 3.4.3 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN PAW

El sistema de clasificación PAW se basa en 3 componentes: el número absoluto de plaquetas, la manera de activación de las plaquetas y la presencia o ausencia de los glóbulos blancos (DeLong *et al.*, 2012).

**Figura 6**

*Sistema de Clasificación de Plaquetas PAW*



Nota: Tomado de DeLong JM *et al.*, 2012.

El número absoluto de plaquetas esta dividido en 4: P1, 2, 3 y 4. P1: la cantidad de plaquetas es menor o igual al valor inicial de la muestra. P2: la cantidad de plaquetas es mayor al valor inicial de la muestra hasta 750,000 plaquetas/ $\mu$ l. P3: la cantidad de plaquetas es mayor a 750,000 plaquetas/ $\mu$ l hasta 1,250,000 plaquetas/ $\mu$ l. P4: la cantidad de plaquetas es mayor a 1,250,000 plaquetas/ $\mu$ l.

En el caso de los leucocitos hay 2 categorías: A y B. La categoría A significa que la cantidad de leucocitos es mayor al valor inicial de la muestra y la categoría B que la cantidad de leucocitos es menor o igual al valor inicial de la muestra. Adicionalmente, presenta 2 categorías en el caso de los neutrófilos:  $\alpha$  y  $\beta$ . La categoría  $\alpha$  significa que la cantidad de neutrófilos es mayor al valor inicial de la muestra y la categoría  $\beta$  que la cantidad de neutrófilos es menor o igual al valor inicial de la muestra.

Finalmente, el método de activación de las plaquetas es categorizado como endógeno o exógeno. En caso de que el investigador utilice métodos de activación exógena se coloca la letra X y si utiliza el método de activación endógena no se coloca ninguna letra.

### **3.5 INFECCIONES URINARIAS**

Las Infecciones Urinarias (IUs) son un problema importante de salud que aqueja a millones de personas cada año. Es la segunda causa de infección más frecuente en los humanos, es solo superada por las infecciones de tracto respiratorio (Echevarría *et al.*, 2006; Machado & Murillo, 2012; Orrego-Marin *et al.*, 2014; Passadouro *et al.* 2014). Se estima que el 40% de las mujeres y el 12% de los hombres experimentan al menos un episodio de infección urinaria sintomática a lo largo de su vida, y entre el 27 y el 48% afectada sufren de IU recurrentes (Kot, 2019).

Son definidas por los Centers for Disease Control and Prevention como un proceso inflamatorio que implica la invasión y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario (Orrego-Marin *et al.*, 2014). No solamente la presencia de microorganismos en las vías urinarias, sino también su cuantificación en al menos  $10^5$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de orina (Echevarría *et al.*, 2006) y en el caso de los hombres sintomáticos es considerado como IU una cifra de  $10^3$  UFC/mL. No obstante, un tercio o más de las pacientes mujeres sintomáticas presentan conteos de UFC por debajo de este nivel teniendo una IU. Asimismo, los síntomas más comunes son disuria, tenesmo, dolor suprapúbico, fiebre, urgencia miccional, orina turbia o maloliente, pero también su forma asintomática es muy usual. Por otra parte, existen varios factores como el género, la edad, la raza, la circuncisión, el VIH, la diabetes, el catéter urinario, las anomalías del tracto genitourinario, el embarazo y el estado de hospitalización aumentan el riesgo significativo de presentar infecciones urinarias recurrentes (Odoki *et al.*, 2019) y si no son tratadas pueden generar complicaciones graves en el paciente como: daño renal, cicatrización renal e insuficiencia renal.

Las IUs se clasifican de diversas formas: alta o baja, aguda o crónica, no complicada o complicada, sintomática o asintomática, nueva o recurrente y comunitaria o nosocomial (Echevarría *et al.*, 2006; Orrego-Marin *et al.*, 2014; Kot, 2019; Odoki *et al.*, 2019).

### **3.5.1 INCIDENCIA**

Las IUs son una de las principales causas de consulta y de hospitalización a nivel mundial, reportándose alrededor de 150 millones de casos anualmente (Leguizamón *et al.*, 2017). Asimismo, se estima que en los Estados Unidos de Norteamérica las infecciones urinarias son causa de aproximadamente 7 millones de visitas a los médicos, 1 millón de visitas al departamento de emergencia y aproximadamente 100 000 hospitalizaciones al año (Wilson & Gaido, 2004; Carranza *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2019), lo que representa un

costo aproximadamente de \$ 1600 millones de dólares al año (Wilson & Gaido, 2004; Orrego-Marin *et al.*, 2014). Con respecto al Perú se desconocen cifras exactas de su incidencia, pero es muy probable que sean similares a las de EE.UU. (Echevarría *et al.*, 2006; Tucto, 2014).

Se estima que entre 40 y 50% de las mujeres presentan infecciones urinarias en algún momento de su vida, el 11% tendrán al menos una infección por año (Orrego-Marin *et al.*, 2014). En la primera infancia tiene mayor predominio en los hombres que en las mujeres, mientras que en adultos es más frecuente en las mujeres con edad entre 20 y 56 años (Orrego-Marin *et al.*, 2014). Más aun durante el embarazo, porque durante esta etapa, se provocan múltiples cambios anatómicos, hormonales y funcionales que ponen a la gestante en riesgo de infección del tracto urinario (Calipuy *et al.*, 2017). No obstante, posterior a los 65 años los porcentajes de incidencia de UIs se invierten debido a que los hombres comienzan a retener la orina y a presentar incontinencia urinaria por el crecimiento benigno de la próstata. De igual forma, el 10 % de pacientes cateterizados por corto tiempo (< 7 días) y el 15% de los pacientes que son cateterizados por más de 7 días desarrollan infección urinaria (Echevarría *et al.*, 2006; Tucto, 2014).

### **3.5.2 ETIOLOGÍA**

Las infecciones urinarias son causadas por microorganismos patógenos conocidos como uropatógenos, estos pueden ser bacterias u hongos. Mayormente las IUs son causadas por un solo microorganismo; sin embargo, existen casos que puede ser causadas por 2 microorganismos o hasta 3 microorganismos, conocida con infección urinaria polimicrobial.

### **3.5.2.1 BACTERIAS UROPATÓGENAS**

Las IUs son principalmente causadas por el crecimiento anormal de las bacterias uropatógenas como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.* y *Staphylococcus saprophyticus* (Machado & Murillo, 2012; Orrego-Marin *et al.*, 2014; Passadouro *et al.*, 2014; Odoki *et al.*, 2019) en el tracto urinario. Asimismo, la infección en su mayoría de casos es provocada por una sola bacteria, sin embargo, puede ser generada por dos bacterias o hasta 3 bacterias al mismo tiempo.

Las bacterias uropatógenas mencionadas anteriormente no son solamente las únicas bacterias aisladas de orinas con sospecha de infección urinaria, sino también se han aislado *Staphylococcus aureus* (Odoki *et al.*, 2019), *Citrobacter spp.* (Odoki *et al.*, 2019), *Morganella morganii* (Odoki *et al.*, 2019) y *Streptococcus bovis* (Kot, 2019). De todas las bacterias uropatógenas, la más importante es *Escherichia coli* debido a que es la bacteria que se aísla en mayor cantidad (75- 90%) de los casos de IUs reportados.

#### **3.5.2.1.1 *Escherichia coli* UROPATÓGENA**

*Escherichia coli* uropatógenas (UPEC, por su nombre en inglés) son un grupo heterogéneo de *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC, por su nombre en inglés) que parecen originarse en el intestino (Kot, 2019). Asimismo, las cepas de *E. coli* aisladas de animales de granja portan genes de virulencia responsables de las infecciones urinarias en los seres humanos; por lo que, estos animales pueden ser reservorios de las UPEC.

Las ExPEC pueden subsistir en el tracto digestivo sin causar alguna enfermedad en el sistema digestivo. No obstante, las cepas de ExPEC presentes en otros sitios, como el sistema nervioso central, la sangre o el tracto urinario, pueden causar enfermedades graves (Kot, 2019). Por otro lado, se han identificado cuatro principales filogrupos de UPEC (A, B1, B2, D) en función de las islas de patogenicidad genómica (PAI, por su nombre en inglés), siendo las cepas que integran a los grupos B2 y D las que se aíslan con mayor frecuencia en las infecciones urinarias humanas (Kot *et al.*, 2016).

Las áreas periuretrales, vaginal y la uretra son colonizadas por las UPEC, que luego alcanzan a la vejiga y se adhieren al epitelio superficial utilizando adhesinas fimbriales y no fimbriales (Mann *et al.*, 2017). Las bacterias adheridas pueden internalizarse en las células facetarias uroepiteliales y luego pueden ingresar al citoplasma, replicarse y formar comunidades bacterianas intracelulares (Mann *et al.*, 2017), siendo una fuente de reservorios intracelulares inactivos. Las comunidades bacterianas intracelulares pueden ser eliminados por medio de la exfoliación de las células facetarias de la superficie de la vejiga y su excreción con la orina. No obstante, el remanente de bacterias puede formar una biopelícula resistente a los mecanismos inmunitarios y a los agentes antimicrobianos. Determinada cantidad de bacterias logran escapar de las biopelículas y se convierten en forma móviles que se diseminan en el músculo detrusor de la vejiga o incluso suben hacia los riñones, inflamándolos (pielonefritis). De igual forma, pueden diseminarse desde el tracto urinario al torrente circulatorio y causar bacteriemia.



### 3.5.2.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

La asignación de la especie de un aislamiento microbiano proveniente de una muestra sospechosa de infección urinaria es de vital importancia en la práctica de microbiología clínica, teniendo en cuenta que el objetivo es identificar al microorganismo responsable del proceso infeccioso para aplicar una terapia antimicrobiana eficaz.

Dentro de la práctica diaria, el laboratorio de microbiología tiene 3 métodos para lograr identificar al agente infeccioso o a los agentes infecciosos que generan la infección urinaria: 1. Métodos fenotípicos o tradicionales. 2. Métodos Moleculares. 3. Métodos basados en proteómica. Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles (Olmos *et al.*, 2010; Asadi Karam *et al.*, 2019). No obstante, este método presenta limitaciones para poder identificar ciertos microorganismos que son difíciles de cultivar. Por lo que se refiere a los métodos moleculares, estos permiten soslayar algunas de estas limitaciones. Sin embargo, tienen un costo elevado y se necesita de personal capacitado para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar concentrados en laboratorios o centros de referencia.

Finalmente, los métodos basados en proteómica necesitan de equipos sofisticados (espectrofotómetro de masas) y personal altamente capacitado para su aplicación en la microbiología clínica. Es un nuevo método basado en el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (Cercenado & Cantón, 2011) que se está implementando en los laboratorios microbiológicos con el fin de identificar no solamente los microorganismos patógenos de infecciones urinarias sino también

microorganismos patógenos para otro tipo de enfermedades como tuberculosis, toxoplasmosis, onicomicosis, entre otros.

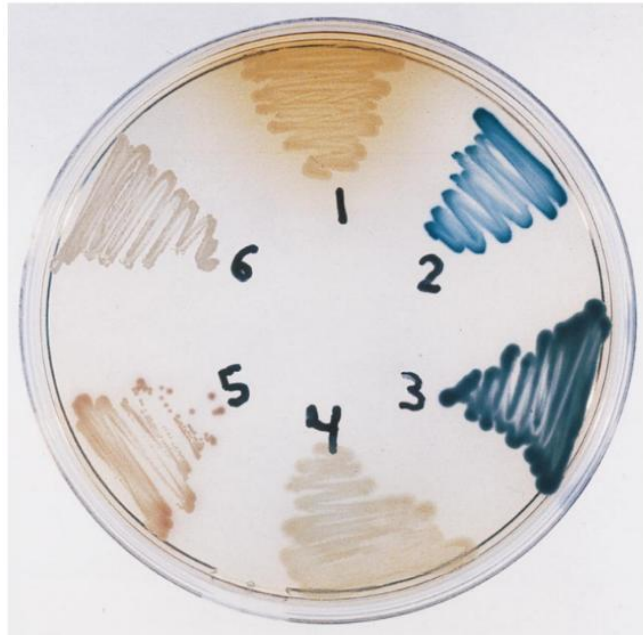
### **3.5.2.2.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS**

Los métodos fenotípicos son los más utilizados en los laboratorios de microbiología clínica para identificación de microorganismos patógenos de muestras urinarias debido a su bajo costo y fácil realización. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica se basan en las características “observables” de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas (Olmos *et al.*, 2010; Cercenado & Cantón, 2011). El método de diagnóstico que más se elige es el cultivo, cuando es factible; permitiendo el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación y el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana.

El cultivo tradicional para identificar y diferenciar microorganismos patógenos en una muestra con sospecha de infección urinaria implica la utilización de 3 medios: Agar MacConckey, CLED y Agar Sangre con sus correspondientes pruebas bioquímicas. Por ello, la experiencia del microbiólogo es de suma importancia para la elección de la prueba o de la batería de pruebas de forma secuencial (Cercenado & Cantón, 2011). Sin embargo, en el mercado existen una variedad disponible de medios cromogénicos para la identificación y diferenciación de patógenos urinarios (Oyaert *et al.*, 2018) como el Medio CHROMOagar Orientación (Fig. 7).

## Figura 7

Reacciones de color específicas de microorganismos en el CHROMOagar Orientación



Nota: 1, *P. mirabilis*; 2, *E. faecalis*; 3, *K. pneumoniae*; 4, *P. aeruginosa*; 5, *E. coli*; 6; *S. aureus*. Tomado de Samra *et al.*, 1998.

El Medio CHROMOagar Orientación ofrece la identificación presuntiva simultánea de bacterias GRAM positivas y negativas y de levaduras en un solo medio mediante distintos colores de las colonias producidas por reacciones de enzimas específicas del género o la especie con un sustrato cromogénico adecuado (Merlino *et al.*, 1996; Samra *et al.*, 1998). Asimismo, permite la diferenciación e identificación de *Escherichia coli* y *Enterococcus* sin pruebas de confirmación (Becton, 2019).

### **3.5.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO***

El efecto antimicrobiano *in vitro* de cualquier producto químico o biológico se obtiene mediante el empleo de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En general, existen tres métodos para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana: dilución en caldo, dilución en agar y el método de difusión en disco (Biemer, 1973).

El método de dilución en caldo y el método de dilución en agar presentan una excelente correlación con la respuesta clínica, ambos métodos solamente han sido empleados por los laboratorios clínicos hasta determinado punto debido a su complejidad y a la excesiva cantidad de tiempo técnico para completarlos. Por otra parte, el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) goza de una inmensa popularidad en los laboratorios clínicos por su relativa simplicidad y capacidad para evaluar múltiples agentes antimicrobianos en cada bacteria aislada.

#### **3.5.3.1 MÉTODO DE KIRBY-BAUER**

El propósito del método de Kirby- Bauer o difusión en disco es determinar la sensibilidad o la resistencia de bacterias patógenas aeróbicas o anaeróbicas facultativas a varios compuestos antimicrobianos (Hudzicki, 2009), con la finalidad de ayudar al médico a elegir la mejor opción de tratamiento antibiótico para su paciente. El método implica la colocación de discos de papel impregnados con antimicrobianos sobre la superficie del agar que previamente ha sido sembrado con las bacterias que se van a evaluar (Biemer, 1973).

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

**Tang, Yeaman & Selsted.** En su artículo “Antimicrobial Peptides from Human Platelets”, *Infection and Immunity* 70:6524-6533 (2002). Evaluaron las posibles actividades antimicrobianas de las proteínas plaquetarias. Los péptidos antimicrobianos fueron aislados y purificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase reversa. Los péptidos que fueron purificados y presentaron actividad antimicrobiana (evaluada frente a *Escherichia coli* con el método de pozos en agar) fueron caracterizados por espectrometría de masas, análisis de aminoácidos y determinación de secuencias. Estos análisis permitieron identificar siete péptidos antimicrobianos liberados por trombina de las plaquetas humanas: Factor Plaquetario 4 (PF-4), RANTES, Péptido activador de tejido conjuntivo 3 (CTAP-3), Proteína básica plaquetaria, Timosina  $\beta$ -4 (T- $\beta$ 4), Fibrinopéptido B (FP-B) y Fibrinopéptido A (FP-A). Los 7 péptidos identificados fueron probados contra bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y hongos (*Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*). Cada péptido mostro actividad contra al menos dos organismos. Los autores concluyen que las plaquetas presentan una función antimicrobiana directa en respuesta a traumatismos o a inflamación.

**Bielecki et al., 2007.** Publicaron “Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances”, *The Journal of Bone and Joint Surgery Br* 89:417-420 (2007). Analizaron el efecto antibacteriano del Plasma Rico en Plaquetas en gel (PRP + trombina bovina + Cloruro de Calcio al 10%) contra *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a meticilina, *Escherichia coli* BLEE, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* BLEE, *Enterococcus faecalis*, y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. El PRP en gel inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*; no obstante, no pudo inhibir a *K. pneumoniae*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. En esta última cepa, el gel pareció inducir su crecimiento *in vitro*. Concluyen que la combinación de propiedades inductivas y antimicrobianas del gel puede ser utilizado para el tratamiento contra la pseudoartrosis y la cicatrización tardía.

**Moojen et al., 2008.** En su artículo “Antimicrobial Activity of Platelet-Leukocyte Gel against *Staphylococcus aureus*”, Journal of Orthopedic Research 26:404-410 (2008). Investigaron la actividad antimicrobiana del Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos activado con trombina autóloga (PLG-AT, por su nombre en inglés), Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos activado con trombina bovina (PLG-BT, por su nombre en inglés), Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) frente a *Staphylococcus aureus* utilizando el ensayo de muerte bacteriana. Asimismo, determinaron la contribución de la mieloperoxidasa (MPO, por su nombre en inglés) de los leucocitos en el efecto antimicrobiano. El PLG-AT, PLG-BT, PRP y PPP tuvieron un efecto bacteriostático contra *S. aureus* y no pudieron encontrar una correlación entre la liberación de MPO y la actividad bacteriostática. Concluyendo que el PLG podría ser utilizados para combatir infecciones postoperatorias.

**Anitua et al., 2012.** En su artículo publicado “Antibacterial effect of plasma rich in growth factor (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains”, Clinical and Experimental Dermatology 37:652-657 (2012). Evaluaron los posibles efectos del Plasma Rico en Plaquetas y en Factores de Crecimiento (PRP-GF) frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* sensible y resistente a la meticilina. Asimismo, estudiaron la incorporación de los leucocitos al PRP-GF. Las diferentes formulaciones de PRP-GF (F1, F2, F3 y F3+ leucocitos) fueron enfrentadas a ambas cepas estafilocócicas contando el número de colonias bacterianas supervivientes tras la incubación a las 0, 4 y 8 h. Descubrieron que las 4 formulaciones tenían un fuerte efecto bacteriostático, especialmente en las primeras 4 h después de la aplicación del bioproducto y también presentaron un efecto antibacteriano a las 4 h para tres de las cuatro cepas, con la excepción de *S. epidermidis* sensible a la meticilina. Concluyeron que las diferentes formulaciones del bioproducto podrían utilizarse contra las infecciones postoperatorias y de heridas.

**Burnouf et al., 2013.** Publicaron “Antimicrobial activity of platelet (PLT)- poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent- treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria”, *Transfusion*, (2012). Evaluaron la actividad antimicrobiana del Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma rico en Plaquetas en gel (PG) y un biomaterial hecho a base de un lisado de plaquetas (S/D PRP) con disolvente/detergente (1% de Tri-n-butilo fosfato/ 1% de tritón X-45) puros y de complementados por un tratamiento de calor bajo condiciones asépticas. Para la evaluación antimicrobiana emplearon el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, método de recuento en placa y el método spiking contra *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10147), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y *Bacillus subtilis* (ATCC 21778). El PPP, PRP, PG y el S/D PRP de complementados no presentaron actividad antimicrobiana. Asimismo, los bioproductos sin de complementar (puros) no tuvieron actividad antimicrobiana contra *E. cloacae*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. epidermidis*. No obstante, presento actividad antimicrobiana contra *E. coli* durante 48 horas y contra *P. Aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* después de 3 horas de haber añadido el PRP, PPP, S/D PRP O PG. Concluyeron que el complemento plasmático es responsable de la actividad del PPP, PRP, PG y S/D PRP contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, pudiendo ser utilizados para optimizar el control de las infecciones en las heridas.

**Chen et al., 2013.** Publicaron el artículo “Antibacterial effect of Autologous Platelet-Rich Gel derived from subjects with Diabetic Dermal Ulcers *In Vitro*”, *Journal of Diabetic Research*, (2013). Investigaron el efecto *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas en Gel (PG, por su nombre en inglés), Plasma Rico en Plaquetas en Gel combinado con apocinina (PG-APO), Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y como control el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) y el Buffer Fosfato Salino (PBS, por su nombre en inglés) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la prueba de eficacia antimicrobiana. El PG y PG-APO mostraron fuerte actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. Asimismo, el PG, PG-APO y el PRP tuvieron efecto antimicrobiano contra *E. coli* y *P.*

aeruginosa. Por otro lado, el PBS y el PPP no mostraron ningún efecto antibacteriano. Como conclusión, los autores soportan que la combinación de PG más antibióticos pueden tener un efecto antibacteriano sinérgico contra las infecciones polimicrobiales en las úlceras de pie diabético.

**Drago et al., 2013.** En su artículo “Antimicrobial activity of pure platelet rich plasma against microorganism isolated from oral cavity”, BMC Microbiology 13:47-51, (2013). Determinaron el efecto antibacteriano del Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP) contra *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* y *Pseudomonas aeruginosa* (microorganismos de la cavidad oral) empleando el método de microdilución en serie doble para encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por su nombre en inglés). El P-PRP pudo inhibir el crecimiento de *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. agalactiae* y *S. oralis*. Sin embargo, no inhibió cepas de *P. aeruginosa*. Como conclusión los autores mencionan que el P-PRP podría ser utilizada para combatir infecciones postoperatorias.

**Gálvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014.** Realizaron una tesis de Doctorado titulada “Efecto antibacteriano *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas contra Bacterias Gram Positivas y Negativas”, presentado para optar el título de Doctorado en Medicina en la Universidad Dr. José Matías Delgado, (2014). Obtuvieron Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP) y el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) activados con gluconato de calcio ( $C_{12}H_{22}CaO_{14}$ ) al 10% para estudiar su posible efecto antibacteriano contra dos bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp.*) y dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) empleando el método de dilución en tubos, el conteo de colonias viables en placas y la determinación de unidades formadoras de colonias (UFC). El P-PRP y el PPP activados no mostraron efecto antibacteriano contra *P. aeruginosa*, en cuanto al Conteo de UFC no hallaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de bacterias Gram positivas estudiadas. Sin embargo, encontraron una diferencia estadísticamente



significativa en *E. coli*. Concluyendo que existe una tendencia de efecto antibacteriano sobre todo en *E. coli*.

**Intravia et al., 2014.** Publicaron el Artículo titulado “In vitro evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood”, Muscles, Ligaments and Tendons Journal (2014). Investigaron las propiedades antibacterianas dos preparaciones diferentes de Plasma Rico en Plaquetas (PRP): Baja Concentración de Glóbulos Blancos y Plaquetas (PRPLP, por su nombre en inglés) y Alta Concentración de Glóbulos Blancos y Plaquetas (PRPHP, por su nombre en inglés) contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Propionibacterium acnes* utilizando el método de ensayo de muerte por tiempo. Encontraron que los dos productos disminuyeron significativamente el crecimiento bacteriano a las 8 horas de las 4 cepas empleados y a las 24 horas para *S. epidermidis*, MRSA y *P. acnes*. A pesar de las diferencias en la concentración de plaquetas y de glóbulos blancos, no se observaron diferencias en la actividad antibacteriana entre las dos preparaciones mencionan los autores.

**Mariani et al., 2015.** En su artículo “Leucocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-Rich Plasma *in vitro*”, BMC Microbiology 15:149-164 (2015). Compararon la actividad microbicida *in vitro* de las plaquetas y el Plasma Rico en Plaquetas Rico en Leucocitos (L-PRP) con el Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP) y la contribución de los leucocitos a las propiedades microbicidas. El P-PRP y el L-PRP fueron enfrentados contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* empleando el ensayo de placa y el recuento bacteriano. Asimismo, cuantificaron la liberación de proteínas microbicidas utilizando la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) en sándwich. Ambos bioproductos inhibieron el crecimiento bacteriano por un máximo de 4 h de incubación (efecto bacteriostático) y lograron identificar 8 péptidos (MIP-1 $\alpha$ , RANTES, GRO- $\alpha$ , IL-8, NAP-2, SDF-1 $\alpha$  e IL-6 con fuerte potencial microbicida.

Encontraron actividad antimicrobiana *in vitro* similar entre preparaciones que contienen leucocitos (L-PRP) o que no contienen (P-PRP) y descubrieron 3 nuevos péptidos antimicrobianos: NAP-2, SDF-1 $\alpha$  e IL-6.

**Yang et al., 2015.** Publicaron el artículo “Antimicrobial Activity of Platelet-Rich Plasma and Other Plasma Preparations Against Periodontal Pathogens”, Journal of Periodontology 86:310-318 (2015). Evaluaron las actividades antimicrobianas del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Empobrecido en Plaquetas (PDP, por su nombre en inglés), Plasma Rico en Plaquetas y en Factores de Crecimiento (PRP-FG) y Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) activados con Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) contra *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum* utilizando el ensayo de muerte por tiempo y determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC). Todas las preparaciones del plasma inhibieron el crecimiento bacteriano de las bacterias estudiadas, mostrando mayor actividad el PRP. Los autores concluyen que el PRP tiene propiedades antimicrobianas y que sería recomendable aplicarlo en sitios quirúrgicos periodontales por su efecto regenerativo y antibacteriano.

**Aggour & Gamil, 2017.** En su artículo “Antimicrobial Effects of Platelet-Rich Plasma against Selected Oral and Periodontal Pathogens”, Polish Journal of Microbiology 66:31-37 (2017). Investigaron si el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) activado con Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>) o sin activar presentaba propiedades antimicrobianas *in vitro* contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* utilizando el método modificado de pozos de agar. Encontraron que el PRP y el PPP activado (de los pacientes y de los controles) inhibían eficazmente el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *C. albicans*. No obstante, no inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Por otro lado, hallaron una diferencia estadísticamente significativa entre el PRP y el PPP activado, lo cual indicaba que las bacterias presentaban mayor susceptibilidad al PRP que al PPP. El PRP y el PPP sin activar presentaron zonas negativas de inhibición contra los microorganismos estudiados. Concluyeron que

el PRP es una sustancia que se puede utilizar contra los patógenos orales y periodontales.

**Maghsoudi et al., 2017.** En su artículo publicado “Inhibitory activities of Platelet Rich Plasma and Platelet Poor Plasma on the Growth of Patogenic Bacteria”, Iranian Journal of Pathology 12(1):79-87 (2017). Analizaron el impacto del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Rico en Plaquetas Puro (P-PRP) y Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella sp.* y *Serratia sp.* utilizando el método de microdilución en serie para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), el método de difusión en pozos y el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Asimismo, compararon su efecto con el cloranfenicol y la penicilina. El PPP no inhibió el crecimiento de ninguna bacteria estudiada. Por otro lado, el PRP y el P-PRP inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Shigella sp.*, *S. agalactiae* y *S. epidermidis*, siendo el P-PRP el que generaba mayor inhibición, y no generaron inhibición en las demás cepas. Como conclusión, los autores pueden afirmar que existe una fuerte correlación entre la concentración de las plaquetas y su actividad antibacteriana.

**Çetinkaya et al., 2018.** Publicaron el artículo “Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria: *in vitro* antibacterial study”, European Journal of Trauma and Emergency Surgery 45: 555-565 (2018). Examinaron la actividad antibacteriana *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) activado con Trombina, del Plasma Pobre Plaquetas (PPP) y como control el Buffer Fosfato Salino (PBS, por su nombre en inglés) contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina, *Klebsiella pneumonie* productora de betalactamasa de espectro extendido y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer y la prueba de eficacia antimicrobiana. El PRP activado con trombina y el PPP inhibieron significativamente el crecimiento de *S. aureus* resistente a meticilina,

*K. pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido y *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos y mostraron una actividad limitada contra *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina. Concluyeron que el PRP podría ser utilizado como una opción para el tratamiento de infecciones en el pie diabético.

**Cieślík-Belecka et al., 2018.** En su artículo “Antibacterial activity of Leukocyte- and Platelet Rich Plasma: An *In Vitro* study”, Biomed Research International (2018). Estudiaron la actividad antimicrobiana del Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos (L-PRP, por su nombre en inglés) y el Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos en gel (L-PG, por su nombre en inglés) contra *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (ATCC 44300), *Staphylococcus aureus* sensible a Meticilina (ATCC 25923), *Escherichia coli* productora de Betalactamasa de espectro extendido (ATCC 35218), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* productora de Betalactamasa de espectro extendido (ATCC 700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) empleando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. El L-PRP y el L-PG mostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* resistente y sensible a la meticilina, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*. No mostraron actividad contra *E. coli* y *K. pneumoniae* productora de Betalactamasas de espectro extendido. Concluyen que el L-PRP y el L-PG podría utilizarse para tratar diversas infecciones en el área clínica y la trombina en concentraciones altas (activador) aumenta el efecto antimicrobiano.

**Eryilmaz et al, 2018.** Publicaron el artículo “Antibacterial Effectiveness of Platelet Products (PRP, PPP, PCP, y PCF) on *M. catarrhalis* and *S. aureus*, a Causative Agent of Acute and Chronic Sinusitis, Respectively”, Eur J Rhinol Allergy (2018). Evaluaron la eficacia antibacteriana del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), Plasma Concentrado en Plaquetas (PCP) y el Concentrado de Factor derivado de Plaquetas No Coagulante (PCF) contra *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus* en condiciones *in vitro* empleando el método de Concentración Inhibitoria Mínima (MIC, por su nombre en inglés). El PRP y el PPP mostraron actividad antimicrobiana en todas las

concentraciones probadas contra ambas cepas, el PCP solo mostro actividad antimicrobiana en la dilución 1:1 mientras que el PCF no mostro ninguna actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana mostrada por el PRP y PPP contra ambas cepas los hacen candidatos para utilizarlos contra la sinusitis aguda o crónica.

**Kour et al., 2018.** En su artículo titulado “Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Injectable Platelet-rich Fibrin on the Standard Strains *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*”, Contemporary Clinical Dentistry, (2018);9: S325-30. Compararon el efecto antimicrobiano del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Fibrina (PRF) y del Plasma Rico en Plaquetas y Fibrina Inyectable (I-PRF) contra 2 microorganismos patógenos periodontales: *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* empleando el método de difusión en pozos. El I-PRF tuvo la zona de inhibición más amplia cuando se enfrentó contra *P. gingivalis* en comparación del PRP y PRF; en cambio el PRP tuvo la mayor zona de inhibición contra el *A. actinomycetemcomitans* en comparación del I-PRF y PRF. Concluyeron que los tres concentrados de plaquetas PRP, PRF e I-PRF tienen efecto antimicrobiano contra los 2 patógenos orales; sin embargo, el PRP e I-PRF son más activos en comparación que el PRF.

**Pham et al., 2019.** Publicaron el artículo “Antimicrobial Effect of Platelet-Rich Plasma against *Porphyromonas gingivalis*”, International Journal of Dentistry 2019:1-6 (2019). Evaluaron si existía una diferencia en el efecto antimicrobiano del PRP de voluntarios sanos y de voluntarios con periodontitis crónica contra *P. gingivalis* empleando el método de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, por su nombre en inglés), el ensayo de adhesión bacteriana y el ensayo de susceptibilidad de biopelícula. Descubrieron que todas las muestras de PRP tenían la capacidad de inhibir el crecimiento de la bacteria estudiada. El MIC (expresado como fracción de PRP) fue  $\frac{1}{2}$  y no pudo evitar el crecimiento del biofilm por parte de la bacteria. Como conclusión el PRP puede ser utilizado como un complemento

al tratamiento periodontal y que no hubo diferencias significativas entre el PRP de voluntarios sanos o voluntarios como periodontitis. Ambos PRP mostraron propiedades antibacterianas.

**Ezzroug Ezzraimi et al., 2022.** En su artículo “The Antibacterial Effect of Platelets on *Escherichia coli* Strains”, *Biomedicines* (2022), 10, 1533. Estudiaron la interacción entre plaquetas y cepas seleccionadas de *E. coli* para evaluar el efecto antibacteriano de las plaquetas y los efectos de la activación plaquetaria. Evaluaron dos concentrados de plaquetas: Plasma Rico en Plaquetas (PRP) suspendido en buffer fosfato salino (PBS, por su nombre en inglés) y el sobrenadante del PRP después de ser activado mediante incubación con la cepa J53 contra 5 cepas clínicas de *E. coli* resistente a la colistina y 5 cepas de laboratorio sensibles a la colistina. El PRP suspendido en PBS y el sobrenadante de PRP activado inhibieron el crecimiento de 3 cepas clínicas de *E. coli* resistente a la colistina. Sin embargo, promovieron el crecimiento de las 7 cepas restantes. Concluyeron que sus resultados muestran una interacción bidireccional entre plaquetas y las cepas de *E. coli* cuya expresión depende de la cepa bacteriana involucrada.

## **4.2 ANTECEDENTES NACIONALES**

**Huapaya Lazo & Noriega Castañeda, 2008.** En su artículo titulado “Efecto Inhibidor del Crecimiento Bacteriano *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas”, *Kiru* 5:2-23 (2008). Determinaron el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Rico en Plaquetas (PRP) activado con trombina bovina y PRP combinado con ampicilina (500 mg) sobre *Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en disco Kirby-Bauer y el método de difusión de pozos de agar. El PRP no tuvo ningún efecto inhibidor del crecimiento bacteriano con ninguno de los dos métodos microbiológicos utilizados. Concluyeron que el PRP no tienen un efecto antibacteriano *in vitro* contra *S. aureus*.

## **5. HIPÓTESIS**

### **5.1 GENERAL**

El Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq$  400000 Plt/ $\mu$ l) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq$  400000 Plt/ $\mu$ l) poseen efecto antimicrobiano *in vitro* contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas.

### **5.2 ESPECÍFICA**

- El Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq$  400000 Plt/ $\mu$ l) produce iguales efectos antimicrobianos *in vitro* que el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq$  400000 Plt/ $\mu$ l) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 LUGAR DE EJECUCIÓN**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del Centro Médico Ecosalud-Diagnóstico Clínico y Medicina Regenerativa. Localizado en la Av. General Borgoño 165-167, Pueblo Libre -15084, Lima 21, Perú.

### **6.2 DISEÑO METODOLÓGICO**

El diseño de la investigación es de tipo experimental: prospectivo y longitudinal ya que se manipuló y se sometió a prueba las variables. Es experimental ya que el investigador tiene el manejo de la variable independiente y puede manipularla de manera intencional. Es prospectivo, ya que la recolección de datos se realizó luego de planificar el estudio. Es longitudinal, ya que en este diseño se hizo más de una medición.

### **6.3 VARIABLES**

#### **6.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE**

- Conteo Basal de Plaquetas de cada muestra.

#### **6.3.2 VARIABLE DEPENDIENTE**

- Halo de Inhibición.



## 6.4 OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida	Escala	Valor
Conteo basal de plaquetas	Número de plaquetas en muestra	Es la cantidad de plaquetas que se encuentra en cada muestra	P1 P2 P3 P4	Conteo de plaquetas por debajo de 150,000 plt/uL Conteo de plaquetas entre 150,000- 750,000 plt/uL Conteo de plaquetas entre 750,000- 1,250,000 plt/uL Conteo de plaquetas mayor a 1,250,000 plt/uL	Número de plaquetas	De Intervalos	<150,000 plt/ $\mu$ L 150,000 – 750,000 plt/ $\mu$ L 750,000 – 1,250,000 plt/ $\mu$ L > 750,000 plt/ $\mu$ L
Halo de Inhibición	Inhibición del microorganismo uropatógeno por las plaquetas	Es el halo generado por la inhibición del microorganismo por el efecto antimicrobiano de las plaquetas	1 2	Presencia del halo de inhibición  Ausencia del halo de inhibición	Presencia Ausencia	Nominal	Inhibe  No inhibe

## 6.5 MUESTREO

La toma de muestra sanguínea se realizó a 6 voluntarios: 4 mujeres y 2 hombres en el Centro Médico ECOSALUD-Medicina Regenerativa.

## 6.6 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

### 6.6.1 AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS

#### 6.6.1.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de orina fueron recolectadas siguiendo las indicaciones del Centro Médico ECOSALUD. Las muestras de orina fueron procesadas de acuerdo al protocolo del Laboratorio de Diagnóstico Clínico del Centro Médico ECOSALUD. Una vez concluido el procesamiento de las muestras, estas se incluyeron en el trabajo de investigación. Para la utilización de las muestras, los datos de los pacientes fueron borrados y se rotuló la muestra con una letra para proteger la privacidad del paciente.

### **6.6.1.2 COLORACIÓN GRAM**

Se uso un asa de 10 uL para colocar una gota de orina sobre un portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente (Osorio Jamanca, 2020). Luego, se realizó la coloración GRAM (Anexo 4) a las muestras. Por último, las láminas se observaron con un microscopio óptico compuesto utilizando el objetivo de 100X (de inmersión). Se observó un promedio de 20 campos y se consideró como bacteriuria significativa la presencia de dos o más bacterias GRAM – y/o GRAM + (Osorio Jamanca, 2020). Asimismo, se realizó un examen completo de orina, donde principalmente observamos el sedimento urinario en búsqueda de gérmenes (Anexo 5).

### **6.6.1.3 AISLAMIENTO DE *Escherichia coli***

El procesamiento de la muestra se realizó siguiendo el protocolo detallado en el Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias (Sacsquispe & Ventura, 2001) y el Manual de Procedimientos de Urocultivo de la Sociedad Científica Peruana de Microbiología (Soto, Guillén & Rojas, 2012). Se esterilizó el asa de siembra acercando el filamento a la llama del mechero Bunsen. Antes de cargar la muestra en el asa de siembra, esta se dejó enfriar para evitar la destrucción por el calor de los microorganismos presentes. A continuación, cerca al mechero de gas, se abrió la tapa del frasco con la muestra de orina. Luego, el asa calibrada de 1 uL se introdujo en la muestra de orina y se sembró por el método de estrías en las placas que contienen agar Cromogénico Orientation (CHROMagar™ Orientation) (Anexo 6). Finalmente, las placas fueron incubadas a  $37\text{ °C} \pm 2$  por 24 horas.

A las 24 horas de incubación, las placas fueron examinadas y se seleccionaron las colonias de tamaño mediano a grande, de rosado oscuro a rosa, transparentes, con o sin halos en el medio circundante

(Merlino *et al.*, 1996; Samra *et al.*, 1998) para realizar la evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* del PPP y PRP.

#### **6.6.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA**

De cada voluntario se obtuvo 44 mL de sangre de la vena braquial (12 tubos de tapa celeste BD Vacutainer) utilizando el sistema BD Vacutainer, cada tubo contiene 1 mL del anticoagulante citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) al 3,2%. Los tubos fueron invertidos 5 veces para homogenizar la sangre con el anticoagulante.

#### **6.6.3 CENTRIFUGACIÓN DE LA MUESTRA**

Para la centrifugación de la muestra se realizó una modificación al protocolo de Gálvez & Guerrero, 2014. Los tubos fueron centrifugados a 1500 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente utilizando una centrifuga analógica (800D Centrifuge-Boeco). La segunda centrifugación fue a 3000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente.

#### **6.6.4 OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO POBRE EN PLAQUETAS (PPP)**

Los tubos fueron centrifugados a 1500 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron transportados a la Cabina de Flujo Laminar Horizontal (BIOBASE Horizontal BBS-H1100) previamente esterilizada. Dentro de la Cabina de Flujo Laminar Horizontal, con una jeringa de 10 mL estéril se aspiró los dos tercios superiores de las muestras (PPP) (Fig. 2, Anexo 2). Luego, se vaciaron en un tubo de centrifuga de 15 mL y con una jeringa nueva de 10 mL estéril se procedió a extraer el tercio restante (PRP). El PRP fue agregado al tubo de 15 mL que contenía el PPP y se centrifugo a 3000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente (Anexo 3). Finalmente, después de la segunda centrifugación se utilizó una nueva jeringa de 10 mL estéril

para extraer los dos tercios superiores del tubo de 15 mL. Esta fracción extraída viene a ser el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP).

#### **6.6.5 OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO RICO EN PLAQUETAS (PRP)**

Los tubos fueron centrifugados 1500 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente y fueron transportados a la Cabina de Flujo Laminar Horizontal (BIOBASE Horizontal BBS-H1100) previamente esterilizada. Dentro de la Cabina de Flujo Laminar Horizontal, con una jeringa de 10 mL estéril se aspiró los dos tercios superiores de las muestras (PPP) (Fig. 2, Anexo 2). Luego, se vaciaron en un tubo de centrifuga de 15 mL y con una jeringa nueva de 10 mL estéril se procedió a extraer el tercio restante (PRP). El PRP fue agregado al tubo de 15 mL que contenía el PPP y se centrifugo a 3000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, después de la segunda centrifugación se utilizó una nueva jeringa de 10 mL estéril y se extrajo el tercio restante del tubo de 15 mL (Anexo 3). Esta fracción extraída viene a ser el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP).

#### **6.6.6 CONTEO DE LEUCOCITOS Y PLAQUETAS**

La fracción de PPP y PRP obtenida de cada voluntario fue analizada en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del Centro Médico Ecosalud contabilizando los leucocitos (Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos) y las plaquetas empleando un analizador hematológico automatizado (Alphatec Scientific 53 Pro) para su clasificación con el sistema PAW (Galvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014, Delong *et al.*, 2012).

### **6.6.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro* DEL PPP y DEL PRP CONTRA *Escherichia coli* AISLADA DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS**

La determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) fue realizado por el método de Kirby Bauer (Sacsquispe & Velásquez, 2002; Bielecki *et al* 2007; Lalitha, 2012; Yang *et al.*, 2015)

#### **6.6.7.1 MÉTODO DE KIRBY BAUER**

##### **6.6.7.1.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

Se utilizó una asa bacteriológica para coger 5 colonias bien definidas de *Escherichia coli* aisladas en el medio Orientación y se inocularon en 5 mL de Caldo Tripticasa de Soya (TSB, por su nombre en inglés). Luego, se incubó a 37 °C entre 2-6 horas hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland (Sacsquispe & Velásquez, 2002). Finalmente, por comparación visual se ajustó la turbidez del inóculo hasta el tubo 0.5 de la escala de McFarland (Equivalente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL).

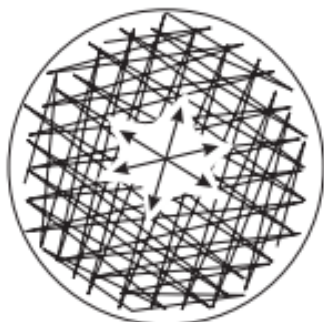
##### **6.6.7.1.2 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS**

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión y se rotó varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo (Sacsquispe & Velásquez, 2002). Seguidamente, con el hisopo se inoculó en la superficie seca de la placa de Mueller Hinton realizando estrías en tres direcciones (Fig. 8) y se esperó entre 3 a 5 minutos para evitar

cualquier exceso de humedad. La inoculación de las placas se realizó por triplicado.

### **Figura 8**

*Direcciones del sembrado del inóculo sobre la superficie del agar*



Nota: Tomado de Sacsquispe & Velásquez, 2002.

#### **6.6.7.1.3 APLICACIÓN DE LOS DISCOS**

Después del secado de la placa, se colocó con la ayuda de una pinza estéril 4 discos de prueba de sensibilidad antimicrobiana (6 mm de diámetro) sobre la superficie del agar. Cada disco fue presionado suavemente para asegurar un contacto completo con la superficie del agar (Sacsquispe & Velásquez, 2002; Cieślik-Bielecka *et al.*, 2018). Antes de ser colocados los discos en la placa, se empleó una micropipeta para recubrir cada disco con un compuesto de prueba. Los siguientes compuestos de prueba se utilizaron para el recubrimiento de los discos de sensibilidad antimicrobiana: D1, 100 uL de PPP; D2, 100 uL PRP. 3D, 100 uL de Buffer Fosfato (Control negativo); 4D, Ciprofloxacina 5ug (Control Positivo).

Posterior a la colocación de los discos de prueba de sensibilidad antimicrobiana en la superficie del agar se esperó 15 minutos para que el producto fuera absorbido; luego, las placas fueron transportadas a la incubadora para colocarlas en posición invertida a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 16 a 18 horas en condiciones aeróbicas. Terminado el tiempo de

incubación, se midió los diámetros de inhibición alrededor de cada disco.

La colocación de los discos de prueba de sensibilidad antimicrobiana se realizó por triplicado.

#### **6.6.7.1.4 LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN**

Los diámetros de las zonas de inhibición (incluyendo el diámetro del disco) se midieron utilizando una regla. En el caso del disco de Ciprofloxacina, el diámetro de inhibición fue interpretado utilizando la tabla N° 11 (Anexo 7) y la sensibilidad de la cepa para el antibiótico Ciprofloxacina (CLSI.2020) fue reportada como Sensible (S), Intermedio (I) o Resistente (R).

#### **6.6.7.2 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Para procesar todos los datos se utilizó el programa SPSS Statistic 25 para el cálculo de la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar ( $SD, \pm$ ), la mediana y la varianza para el diámetro de las zonas de inhibición. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para verificar si los datos presentaban una distribución normal. Asimismo, se empleó la prueba de Levine para verificar si las varianzas eran homogéneas. Finalmente, la prueba T para dos muestras independientes se realizó para constatar si el PPP producía los mismos efectos antimicrobianos que el PRP contra *Escherichia coli* aislada de las muestras urinarias humanas. Valores de probabilidad  $p \leq 0,05$  se consideraron significativos.

## **6.7 ASPECTOS ÉTICOS**

Todas las actividades propuestas en este proyecto de investigación se llevarán a cabo con las pautas y principios éticos de la Declaración de Helsinki (Rickham, 1964). Todos los participantes que accedan a participar en el proyecto fueron informados sobre el propósito, el método de investigación y firmaron el consentimiento informado (Anexo 1). Asimismo, se asegurará el anonimato de los voluntarios dentro a través de la codificación de sus muestras.



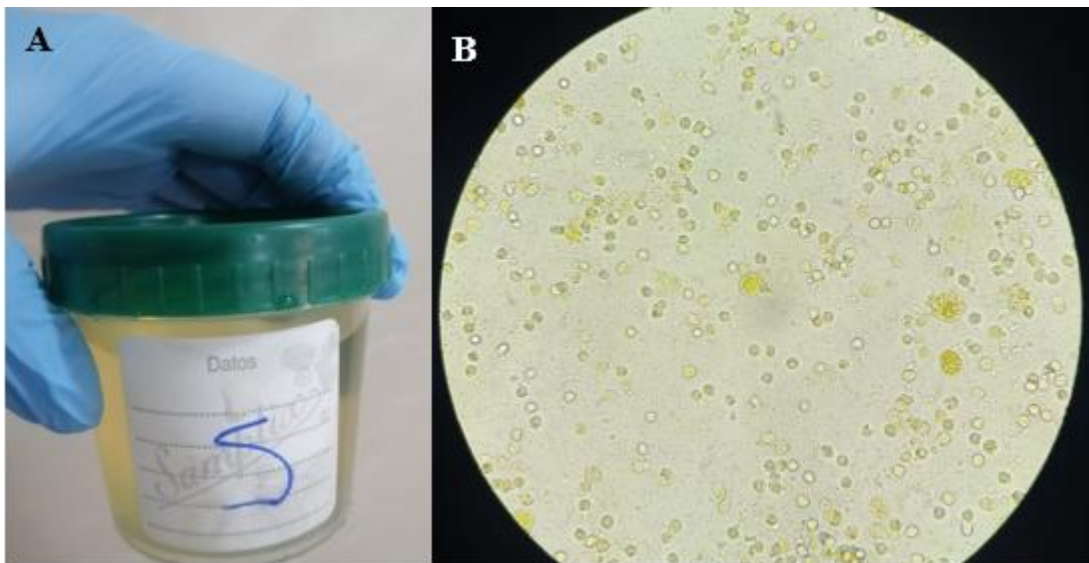
## 7. RESULTADOS

### 7.1 AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS

La muestra urinaria humana S presentó gran cantidad de leucocitos y de gérmenes en el examen microscópico (Fig. 9). Por tal motivo fue seleccionada para realizarle la coloración GRAM y sembrarla en el agar Cromogénico Orientación (CHROMagar™ Orientation).

#### Figura 9

*Muestra urinaria humana S utilizada para el aislamiento de E. coli.*

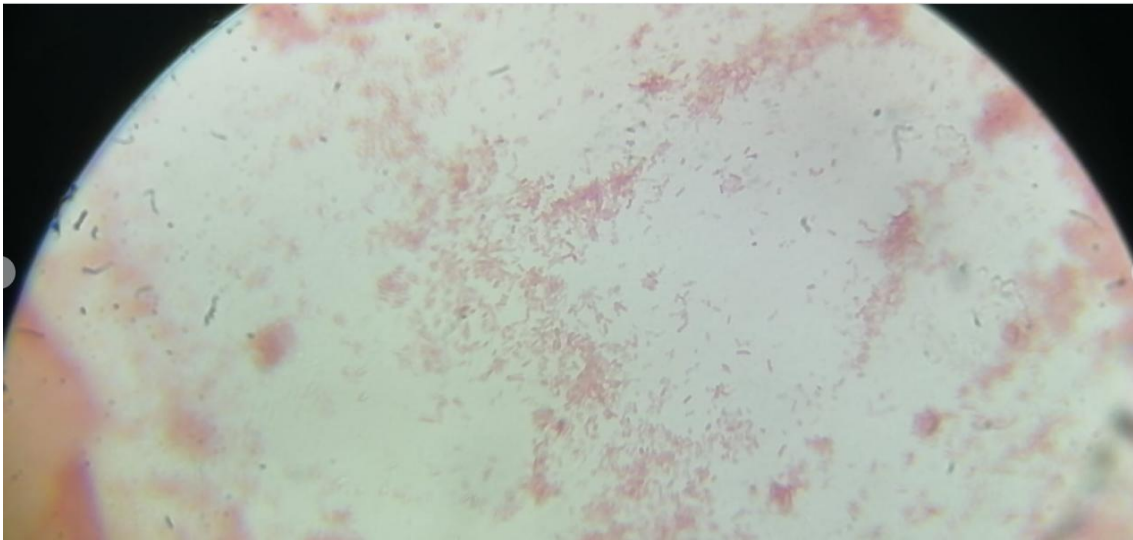


Nota: A: Muestra Urinaria Humana S; B: Gran Cantidad de Leucocitos y Gérmenes.

La coloración GRAM de la muestra urinaria humana S mostró la presencia de una gran cantidad de bacilos GRAM – (Fig. 10).

## Figura 10

*Coloración GRAM de la Muestra urinaria humana S*



Nota: Gran cantidad de Bacilos GRAM -

La muestra urinaria humana S fue sembrada en el agar Cromogénico Orientación (CHROMagar™ Orientation) e incubada a 37 °C por 18 – 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se encontró colonias de color rosa oscuro a rojizo (Fig.11). Asimismo, se le realizó una coloración GRAM a las colonias que crecieron en el medio cromogénico orientación obteniendo bacilos GRAM -.

## Figura 11

*Colonias de Escherichia coli en el CHROMOagar orientación*



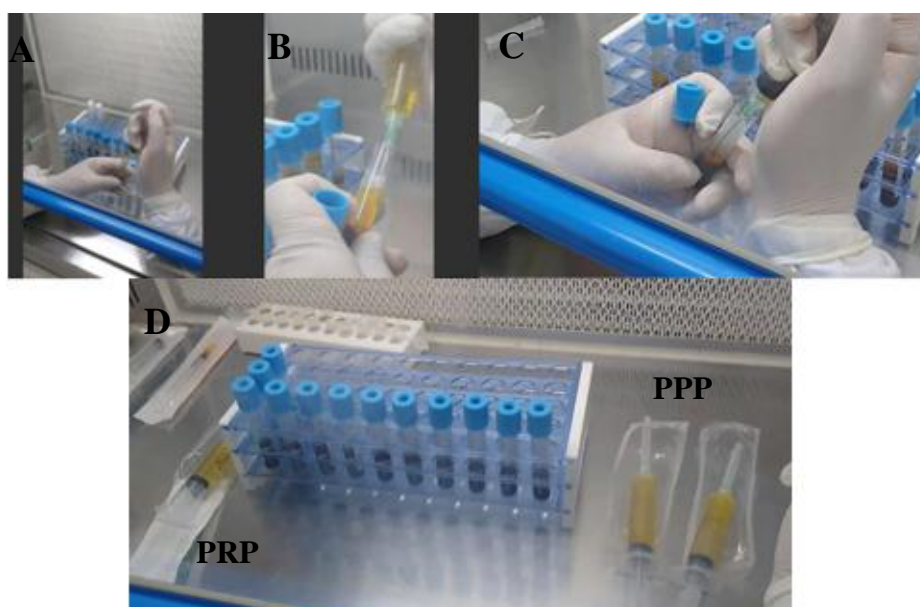
La coloración GRAM y las colonias de color rosa oscuro a rojizo en el medio cromogénico orientación de la muestra urinaria humana S nos indica que la bacteria aislada es *Escherichia coli*.

## 7.2 OBTENCIÓN DEL PLASMA HUMANO POBRE EN PLAQUETAS (PPP $\leq 400000$ PLT/ $\mu$ L) Y DEL PLASMA HUMANO RICO EN PLAQUETAS (PRP- $\geq 400000$ PLT/ $\mu$ L)

A los 6 voluntarios se les extrajo 44 mL de sangre de la vena braquial (12 tubos de tapa celes BD Vacutainer conteniendo el anticoagulante citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) al 3,2%) para centrifugarlos a 1500 RPM por 10 minutos y después a 3000 RPM por el mismo tiempo y así se obtuvo la fracción del Plasma Humano. A partir de la fracción de Plasma Humano de cada voluntario, se extrajo el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (Fig.12 A, B y D) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (Fig.12 C y D). En el caso del PPP se pudo obtener entre 9 a 10 mL por voluntario y en el caso del PRP entre 5 a 6 mL. Por cada voluntario se obtuvo 2 muestras dando un total de 12 muestras (1 de PPP y 1 de PRP).

### Figura 12

*Extracción del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP)*



Nota: A y B: Extracción de PPP. C: Extracción de PRP. D: Productos Finales

### 7.3 CONTEO DE LEUCOCITOS Y PLAQUETAS

El conteo de leucocitos (Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos) y plaquetas fue realizado a través de un analizador hematológico automatizado - Alphatec Scientific 53 Pro. De las 12 muestras obtenidas, 7 muestras: A, B, C, D, E, F y G fueron categorizadas como Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y 5 muestras: H, I, J, K y L como Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) teniendo en consideración la cantidad de plaquetas obtenidas. En el caso de los leucocitos (Glóbulos Blancos Totales) se encontró su presencia en 8 muestras: C, D, E, H, I, J, K y L y en los neutrófilos solo se encontró en 1 muestra: E. Además, en la tabla 3 se muestra el conteo promedio de eritrocitos, leucocitos y plaquetas del PPP.

**Tabla 3**

*Cantidad de Plaquetas, Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos en el Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP)*

Muestra	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Activación	Glóbulos Blancos	
			Glóbulos Blancos Totales ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )
A	393.33± 87.37	No	0	0
B	303.33± 41.63	No	0	0
C	100.00± 34.64	No	0.05± 0.08	0
D	175.00± 7.07	No	0.05± 0.07	0
E	306.67± 20.82	No	0.17± 0.01	0.03± 0.05
F	50± 36.06	No	0	0
G	173.33± 5.77	No	0	0

\*Los valores están dados como la media y la desviación estándar.

Asimismo, en la tabla 4 se muestra el conteo de eritrocitos, leucocitos y plaquetas del PRP de los 6 voluntarios.

**Tabla 4**

*Cantidad de Plaquetas, Glóbulos Blancos Totales y Neutrófilos en el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP)*

Muestras	Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Activación	Glóbulos Blancos	
			Glóbulos Blancos Totales ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )
H	590.00± 85.44	No	0.14± 0.04	0
I	620.00± 17.32	No	0.15± 0.06	0
J	870.00± 26.46	No	0.07± 0.07	0
K	811.33± 68.07	No	0.04± 0.07	0
L	600.00± 42.43	No	0.06± 0.08	0

\*Los valores están dados como la media y la desviación estándar.

#### **7.4 CLASIFICACIÓN DEL PPP Y DEL PRP CON EL SISTEMA DE CLASIFICACIÓN PAW**

Las 12 muestras fueron clasificadas con el Sistema de Clasificación PAW de acuerdo a su cantidad de plaquetas, glóbulos blancos totales, neutrófilos y si fueron activados exógenamente o endógenamente (Fig.6). En la tabla 5 se muestra la clasificación de las 12 muestras.

**Tabla 5**

*Clasificación de las 7 muestras de Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y de las 5 muestras de Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) de acuerdo al Sistema de Clasificación PAW*

Muestra	PAW
A	P1- B $\beta$
B	P1- B $\beta$
C	P1- B $\beta$
D	P1- B $\beta$
E	P1- B $\beta$
F	P1- B $\beta$
G	P1- B $\beta$
H	P2- B $\beta$
I	P2- B $\beta$
J	P3- B $\beta$
K	P3- B $\beta$
L	P2- B $\beta$

Nota: P: Cantidad de Plaquetas; B: Cantidad de Glóbulos Blancos Totales,  $\beta$ : Cantidad de Neutrófilos.

#### **7.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL PPP Y DEL PRP CONTRA *Escherichia coli* AISLADA DE MUESTRAS URINARIAS HUMANAS POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER**

La tabla 6 muestra los resultados de los antibiogramas realizados de las 12 muestras: 7 discos recubiertos con PPP y 5 discos recubiertos con PRP contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas. Las zonas de inhibición producidas por el PPP oscilaron entre 13.3 mm y 19 mm y por el PRP entre 9.7 mm y 18.7 mm de diámetro. El PBS usado como control negativo no presento

halos de inhibición y la ciprofloxacina que fue utilizada como control positivo presento halos de inhibición entre 24.8 mm y 28.3 mm de diámetro.

**Tabla 6**

*Halos de inhibición (mm) en el agar Mueller- Hinton (Merck, Alemania) de Escherichia coli aislada de muestras urinarias humanas*

Muestras	PBS (mm)	PPP (mm)	PRP (mm)	Ciprofloxacina 5ug (mm)
A	0	15± 1	-	24.8 ± 0.5
B	0	13.3± 2.08	-	27.8± 2.21
C	0	16.3± 1.53	-	27.3± 1.53
D	0	19± 1.53	-	26.3± 1.26
E	0	17± 1	-	27.3± 1.53
F	0	18.3± 3.79	-	27± 1
G	0	19.3± 2.08	-	27± 1
H	0	-	10.3± 0.58	28.3± 1.53
I	0	-	9.7± 0.58	28.3± 1.53
J	0	-	15.3± 1.53	24.8 ± 0.5
K	0	-	14± 3.47	27.8± 2.21
L	0	-	18.7± 0.58	26.3± 1.26

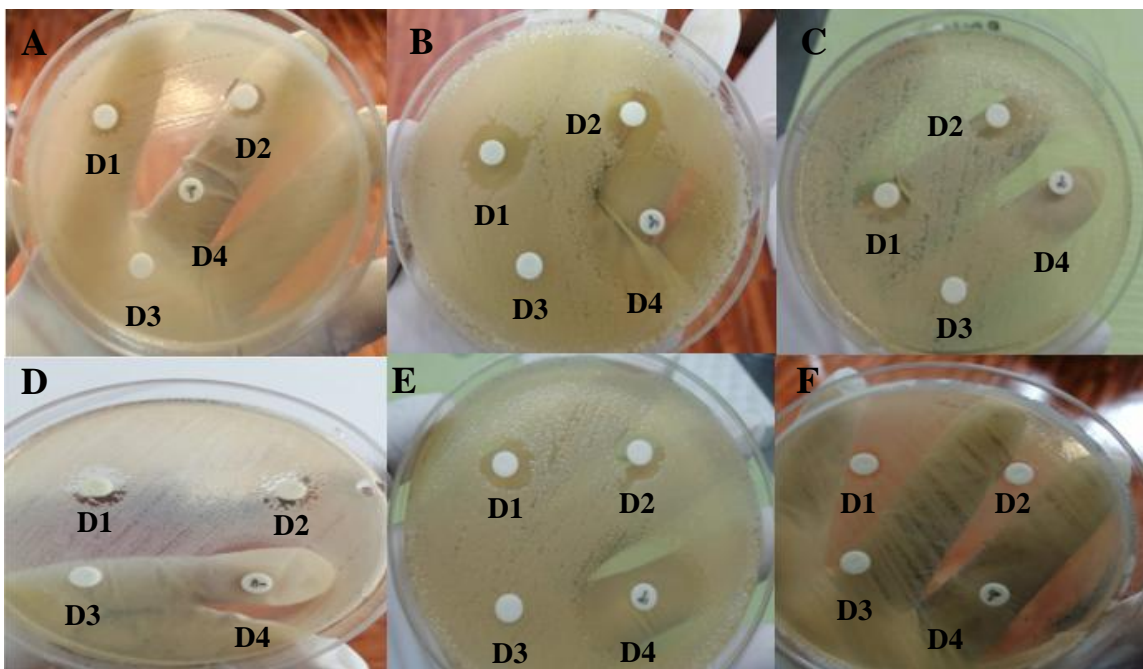
\*Los valores están dados como la media y la desviación estándar. PBS = Buffer Fosfato Salino, PPP = Plasma Humano Pobre en Plaquetas, y PRP = Plasma Humano Rico em Plaquetas.

El PPP y el PRP inhibieron a la bacteria *Escherichia coli* con un diámetro promedio de 16,7 mm y 12,3 mm, respectivamente. Mientras que los discos de ciprofloxacina (5µg) inhibieron drásticamente a la bacteria con un halo promedio

de 26.9 mm, siendo *Escherichia coli* considerada como una cepa sensible contra este antibiótico (anexo 7).

### Figura 13

*Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana contra Escherichia coli aislada de muestras urinarias humanas*



Nota: A: Muestras H e I; B: Muestras B y K; C: Muestras D y L; D: Muestras A y J; E: Muestras C y E; F: Muestras F y G; D1: PPP; D2: PRP; D3: PBS, D4: Ciprofloxacina.

### 7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diámetro del halo de inhibición del PPP presento una media de 16,7, una mediana de 17, una varianza de 4,04y una desviación estándar de 2,01 (Tabla 7) y del PRP presento una media de 13,6, una mediana de 14, una varianza de 13,79 y una desviación estándar de 3,71 (Tabla 7).



**Tabla 7**

*Análisis Estadísticos descriptivos de los halos de inhibición del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y del Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP)*

**Descriptivos**

Tipos de Plasma Humano		Estadístico	Desv. Error		
Diámetro del Halo	PPP	Media	16,700	,7597	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	14,841	
			Límite superior	18,559	
		Media recortada al 5%	16,761		
		Mediana	17,000		
		Varianza	4,040		
		Desv. Desviación	2,0100		
		Mínimo	13,3		
		Máximo	19,0		
		Rango	5,7		
		Rango intercuartil	3,3		
		Asimetría	-,741	,794	
		Curtosis	-,270	1,587	
		PRP	Media	13,600	1,6607
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,989
	Límite superior			18,211	
	Media recortada al 5%		13,533		
	Mediana		14,000		
Varianza	13,790				
Desv. Desviación	3,7135				
Mínimo	9,7				
Máximo	18,7				
Rango	9,0				
Rango intercuartil	7,0				
Asimetría	,345	,913			
Curtosis	-1,198	2,000			

La prueba de Shapiro-Wilk para el PPP dio una significancia (P) de 0,704 y para el PRP de 0,644 (Tabla 8); por lo que la significancia al ser  $\geq$  a 0,05 indica que nuestros datos de los diámetros de los halos de inhibición contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas presentan una distribución normal.

**Tabla 8***Prueba de Shapiro-Wilk*

Pruebas de normalidad							
	Tipos de Plasma Humano	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
→ Diámetro del Halo	PPP	,170	7	,200*	,947	7	,704
	PRP	,213	5	,200*	,937	5	,644

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.  
a. Corrección de significación de Lilliefors

Nota: \*P > 0.05

Asimismo, la prueba de Levine de dio una significancia (P) de 0,151 (tabla 9), lo que nos indica que los datos de los diámetros de los halos de inhibición del PPP y del PRP contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas presentan varianzas homogéneas. Por lo que se cumple con los 2 principios para poder aplicar la prueba de T de Student para muestras independientes.

**Tabla 9***Prueba de Levine*

		Prueba de Levine de igualdad de varianzas	
		F	Sig.
Diámetro del Halo	Se asumen varianzas iguales	2,419	,151
	No se asumen varianzas iguales		

Nota: \*P > 0.05

Finalmente, se aplicó la prueba T de Student para muestras independientes al tener datos menores a 50. La prueba dio una significancia (P) de 0,090 (tabla 10) denotando que el PPP produce iguales efectos antimicrobianos que el PRP contra *Escherichia coli*.

**Tabla 10**

*Prueba T de Student para muestras independientes*

		Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior	
Diámetro del Halo	Se asumen varianzas iguales	2,419	,151	1,879	10	,090	3,1000	1,6499	-,5763	6,7763	
	No se asumen varianzas iguales			1,697	5,683	,143	3,1000	1,8262	-1,4297	7,6297	

Nota: \*P = 0.151

## 8. DISCUSIÓN

En la parte final de la década de 1990, los concentrados de plaquetas fueron ampliamente estudiados por varios autores desde que se introdujeron en el campo de cirugía oral y maxilofacial. No obstante, a partir del año 2000 ganó mayor popularidad en distintos campos médicos como la odontología, cirugía oral, ortopedia, medicina deportiva, dermatología, cirugía estética y plástica (Drago *et al.*, 2013; Fabbro *et al.*, 2016). El motivo de uso se deriva en la liberación de factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas, almacenadas en sus gránulos  $\alpha$  intracelulares, que modulan la cicatrización de heridas tanto en tejidos duros y blandos (Drago *et al.*, 2013; Fabbro *et al.*, 2016; Maghsoudi *et al.*, 2017). Además, que presentan propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. En concordancia con lo mencionado anteriormente, el presente estudio determinó el efecto antimicrobiano *in vitro* del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y del Plasma Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) contra *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias humanas.

El cultivo sigue siendo el patrón de oro del diagnóstico microbiológico de una IU, ya que permite aislar los microorganismos causantes y realizar el estudio de sensibilidad para dirigir el tratamiento (Zboromyrska Y, de Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 2019.). No obstante, a la hora de elegir un medio de cultivo para efectuar un aislamiento bacteriano tenemos que conocer las limitaciones de cada uno. Para el aislamiento de *Escherichia coli* de muestras urinarias se empleó el Medio Cromogénico Orientación debido a que en investigaciones previas (Merlino *et al.*, 1996; Hengstler, KA., Hammann R & Fahr AM. 1997; Samra *et al.*, 1998.) sobre el desempeño del medio para el aislamiento, la diferenciación y el recuento de patógenos de las IUs ha demostrado ser superior a los medios diferenciales comúnmente usados, como el agar CLED o la combinación de agar Sangre y MacConckey. La caracterización microscópica de la cepa aislada de la muestra urinaria S dio como resultado bacilos GRAM- (Fig.9) y su cultivo en el medio Cromogénico Orientación mostró colonias de color rosa oscuro a rojizo (Fig. 11) que es la morfología descrita por Merlino (Merlino *et al.*, 1996) y Samra (Samra *et al.*, 1998) y Becton (Becton, 2019).

La obtención del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP) se puede realizar mediante kits comerciales o prepararlo de forma manual en el laboratorio. Dentro de los kits comerciales existen dos categorías: alta concentración de plaquetas como Biomet GPS II y III y de baja concentración de plaquetas como Cascade PRP therapy. No obstante, los kits comerciales son muchos más costosos que realizar la preparación del PRP en un laboratorio (Dhurat & Sukesh. 2014). La metodología general para obtener el PPP y el PRP involucra la recolección de la sangre completa con anticoagulantes, seguido de uno o dos pasos de centrifugación (Do Amaral *et al.*, 2016).

Es importante elegir correctamente el anticoagulante que se utilizará para la obtención del PPP y del PRP debido a que su potencial regenerativo depende de la cantidad de plaquetas viables que puedan liberar factores de crecimiento al medio externo y evitar su aglomeración o el daño en ellas. Dentro del mercado existen varios tubos con anticoagulantes que se pueden utilizar para obtener el PPP y el PRP como tubos con CTAD (mezcla de citrato, teofilina, adenosina y dipiridamol), ACD (citrato trisódico, ácido cítrico y dextrosa), citrato (citrato de sodio), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y heparina.

No obstante, Marx y Anitua recomiendan utilizar citrato o ACD-A para preparar el PRP (Aizawa *et al.*, 2020) ya que el ACD-A es utilizado para la recolección de plaquetas en la aféresis y el citrato es el anticoagulante comúnmente utilizado para evaluaciones diagnósticas de las plaquetas (Dhurat & Sukesh. 2014). Asimismo, se puede utilizar el CTAD por mantener la viabilidad de las plaquetas en un nivel muy alto (Lei, Gui, & Xiao.2009; Hua, Lai, Zhenjun & Guie. 2015). Por otro lado, la mayoría de autores están de acuerdo en no usar EDTA porque puede dañar la membrana de las plaquetas (Dhurat & Sukesh. 2014) y su uso enfrenta problemas éticos por ser señalado como un contaminante persistente en ambientes naturales, y su impedimento de ser usado en ciertos países (Do Amaral *et al.*, 2016). De igual forma, la heparina no es adecuada para la preparación del PRP porque puede dañar a las plaquetas. Teniendo en cuenta la información previa de cada anticoagulante y que en el Perú no venden los tubos con ACD-A y CTAD, se optó en este trabajo por utilizar como anticoagulante al citrato en su forma de citrato de sodio al 3,6% para producir el PPP y el PRP.

En la literatura actual existen varios protocolos que describen las condiciones ideales para la centrifugación de las muestras para la obtención del PPP y del PRP. Estos diversos protocolos se han optimizado con respecto a diferentes variables del proceso, como el volumen de sangre procesada, el muestreo, el número de giros, el periodo de tiempo de centrifugación y el rango de la aceleración centrífuga (Dhurat & Sukesh. 2014; Perez *et al.*, 2014). De todas estas variables, son 3 las variables que pueden influir en la integridad de las plaquetas junto con su composición y eficacia: número de giros, aceleración centrífuga y el período de tiempo del centrifugado (Perez *et al.*, 2014).

Asimismo, para obtener el PPP y el PRP existen 3 métodos: centrifugación simple, centrifugación doble y aféresis (Tamimi, Montalvo, Tresguerres & Jerez. 2007). Sin embargo, las 3 técnicas de separación aumentan significativamente la concentración de las plaquetas. Aunque, actualmente existe una controversia entre cuál de los 3 métodos utilizar para la producción de PPP y PRP, ya que muchos autores como Anitua y Mazzocca prefieren la centrifugación simple para obtener PRP porque concentran mayor cantidad de plaquetas que la centrifugación doble (Anitua *et al.*, 2008; Mazzocca *et al.*, 2012). No obstante, Dhurat observó que la centrifugación doble produce mayor cantidad de plaquetas que la centrifugación simple (Dhurat & Sukesh. 2014). De igual forma, Tamimi pudo obtener mayor cantidad de plaquetas utilizando la centrifugación doble (Tamimi, Montalvo, Tresguerres & Jerez. 2007). Similarmente, Marx y colaboradores afirmaron que es necesaria una técnica de doble centrifugación para concentrar realmente las plaquetas de la sangre autóloga (Marx *et al.*, 1998), debido a que la centrifugación simple produce una mezcla de PPP con PRP con un bajo recuento de plaquetas. Por tal motivo, en este trabajo empleamos la centrifugación doble para poder concentrar la mayor cantidad de plaquetas en el PRP.

La fracción obtenida de PRP a través de la doble centrifugación consiguió una concentración de plaquetas máxima de 2.4 veces sobre el valor basal de la muestra utilizada, siendo estas similares a Tamimi y colaboradores (Tamimi, Montalvo, Tresguerres & Jerez. 2007), Mazzocca y colaboradores (Mazzocca *et al.*, 2012), Kececi y colaboradores (Kececi, Ozsu & Bilgir. 2014). Para ser considerado como PRP terapéutico, Marx propuso que las concentraciones de plaquetas sean de 1000

x  $10^3/\mu\text{l}$  (Mazzocca *et al.*, 2012). En la presente investigación, el PRP J obtuvo la cantidad más alta de plaquetas ( $870 \pm 26.46 \times 10^3/\mu\text{l}$ ), lo que cumple aproximadamente con este criterio. No obstante, Mazzucco y colaboradores definieron que concentraciones  $> 200 \times 10^3/\mu\text{l}$  como suficiente para obtener un efecto terapéutico (Mazzucco, Balbo, Cattana, Guaschino, & Borzini. 2009). Teniendo en cuenta el criterio definido por Mazzucco y sus colaboradores, los PPP A, B y E y los PRP H, I, J, K y L cumplen con este criterio.

Por otra parte, la concentración de glóbulos blancos totales en todas las muestras (Tabla 3 y 4) fueron muy bajos. En la literatura hay discrepancia por si su presencia en el PRP tiene algún beneficio. Los defensores de PRP que contiene altas concentraciones de glóbulos blancos creen que la presencia de estos proporciona una protección natural contra infecciones y respuestas alérgicas (Dohan Ehrenfest, Rasmussen & Albrektsson., 2009; Cieřlik-Bielecka *et al.*, 2018), mientras que los detractores sostienen que el PRP con leucocitos o sin leucocitos presentan el mismo efecto (Mariani *et al.*, 2014). Semejantemente, la concentración de neutrófilos fue muy baja solamente para 1 muestra: PPP E. En este caso los neutrófilos pueden ser perjudiciales porque destruyen los alrededores de los tejidos, inclusive sino está lesionado (Perez *et al.*, 2014). Por consecuencia, en este trabajo se decidió no incluir altas cantidades de glóbulos blancos ni de neutrófilos. Sin embargo, se debería de incluir ambas variables en investigaciones futuras para ver si tienen algún efecto contra diferentes tipos de microorganismos patógenos.

La mayoría de técnicas para obtener PRP a menudo se reagrupan de forma errónea bajo el termino histórico de “Plasma Rico en Plaquetas”. La literatura disponible sobre este tema es considerable, pero los resultados publicados son a menudo contradictorios (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013), convirtiéndose en un tema muy difícil de interpretar por la gran cantidad de técnicas de preparación, terminología y usos potenciales que generan productos diferentes con propiedades biológicas diferentes que no se pueden comparar entre artículos. Debido a esto se crearon diversos sistemas de clasificación para mejorar y clarificar las publicaciones correspondientes con este tema. Dentro de la diversidad de sistemas de clasificación tenemos 3 principales: POSEIDO, Mishra y PAW. No obstante, han

aparecido 3 nuevos sistemas de clasificación: DEPA (Magalon *et al.*, 2016), PLRA (Mautner *et al.* 2015) y MARSPILL (Lana *et al.*, 2017), que sería necesario considerar en futuros trabajos de investigación con PRP.

El Sistema de Clasificación POSEIDO se basa en el contenido celular y arquitectura de fibrina del producto (Dohan Ehrenfest, Rasmusson & Albrektsson 2009; Dohan Ehrenfest *et al.*, 2013), categorizándolos en 4 familias: Plasma Puro Rico en Plaquetas (P-PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos (L-PRP), Plasma Puro Rico en Plaquetas y Fibrina (P-PRF) y el Plasma Puro Rico en Plaquetas, Leucocitos y Fibrina (L-PRF). Dejando afuera 3 parámetros vitales como son la cantidad de plaquetas, leucocitos y las proporciones de los diferentes tipos de leucocitos. Además, este sistema no otorga una codificación a los bioproductos para compararlo con otros artículos publicados.

Luego, tenemos el sistema de clasificación propuesto por Mishra y colaboradores (Mishra *et al.*, 2012) para el campo de la medicina deportiva. Este sistema se basa en 3 parámetros: la concentración de plaquetas, la presencia de leucocitos y el estado de activación, teniendo 4 tipos de PRP: Tipo 1 (no se encuentra activado y su concentración de plaquetas y leucocitos está por encima del valor inicial), Tipo 2 (está activado y su concentración de plaquetas y leucocitos están aumentados, Tipo 3 (no se encuentra activado, presenta una alta concentración de plaquetas y presenta una cantidad mínima o no presenta leucocitos) y Tipo 4 (se encuentra activado, presenta una alta concentración de plaquetas y presenta una cantidad mínima o no presenta leucocitos). Además, tiene dos subtipos: A (la concentración de plaquetas es 5 veces mayor que el valor inicial) y B (la concentración de plaquetas es menor a 5 veces el valor inicial). Aunque este sistema contempla 3 variables y refleja los sistemas disponibles para producir PRP en el 2006, no considera que la tecnología fue evolucionando para obtener productos de PRP específicos ni las subpoblaciones de leucocitos como los neutrófilos. Por ejemplo, desde que se publicó la clasificación de Mishra, el método de doble centrifugado fue desarrollado para producir altas concentraciones de plaquetas (>5x) con pocos o ningún neutrófilo o sin glóbulos rojos (Mautner *et al.* 2015).



Por último, tenemos el sistema de clasificación PAW (Delong *et al.*, 2012) creado para la medicina ortopedista se basa en 4 variables: concentración de plaquetas, leucocitos, neutrófilos y el estado de activación. En el caso de la concentración de plaquetas hay 4 categorías: P1 ( $\leq$  valor inicial), P2 ( $>$  valor inicial  $-750\ 000$  plt/ $\mu$ l), P3 ( $> 750\ 000$  plt/ $\mu$ l  $-1\ 250\ 000$  plt/ $\mu$ l) y P4 ( $> 1\ 250\ 000$  plt/ $\mu$ l). El estado de activación presenta 2 categorías: endógeno (no se coloca nada) y exógeno (se coloca una X). En la concentración de leucocitos existen 2 categorías: A ( $<$  valor inicial) y B ( $\geq$  valor inicial) y en la concentración de neutrófilos tenemos 2 categorías:  $\alpha$  ( $<$  valor inicial) y  $\beta$  ( $\geq$  valor inicial). Por lo que al tener bien definidos los parámetros para cada una de las variables se puede codificar los productos de cada PRP obtenido y así poder comparar los resultados con otros artículos. Por ejemplo, una preparación que consta de  $900\ 000$  plt/ $\mu$ l con un contenido de leucocitos y neutrófilos por encima de los valores iniciales se documentará como P3-A (Delong *et al.*, 2012).

Conociendo las ventajas y desventajas de cada sistema de clasificación se optó por utilizar el sistema de clasificación PAW porque considera las 4 variables involucradas en la preparación del PRP. Asimismo, se podría agregar 1 o más variables como la cantidad de glóbulos rojos como lo sugiere Mautner y colaboradores (Mautner *et al.* 2015) y/o el método de preparación y cantidad de vueltas como lo sugiere Lana y colaboradores (Lana *et al.*, 2017). Con el sistema de clasificación PAW se pudo codificar las 12 muestras empleadas en este trabajo, obteniendo concentraciones de plaquetas entre P1 hasta P3, concentraciones de leucocitos y neutrófilos por debajo del valor inicial. Resultados similares a Arthrex (Arthrex. 2011) y Castillo y colaboradores (Castillo, Pouliot, Kim & Dragoo. 2011) entre otros.

Las infecciones urinarias causadas por bacterias y su resistencia a los fármacos es uno de los principales desafíos de la medicina moderna. A pesar de una amplia gama de métodos de diagnósticos disponibles y potentes antimicrobianos, las infecciones urinarias asociadas a *Escherichia coli* siguen siendo un problema desafiante. Para enfrentar este importante desafío es necesario contar con nuevos tratamientos alternativos. Es aquí donde la aplicación de PRP podría ingresar como un nuevo tratamiento alternativo.

Las plaquetas son los principales componentes del PRP (Cetinkaya *et al.*, 2018), ellas son las primeras en tener contacto con los microorganismos antes de empezar a realizar sus funciones hemostáticas. Además, inician un mecanismo de defensa contra los patógenos invasores por medio de la internalización de bacterias y secreción de péptidos microbicidas (Huapaya-Lazo & Noriega Castañeda. 2008). Se han descubierto 7 péptidos microbicidas que poseen las plaquetas: Fibrinopéptido A (FP-A), Fibrinopéptido B (FP-B), Timosina  $\beta$ -4 (T $\beta$ -4), Proteína Básica Plaquetaria (PBP), Péptido Activador del Tejido Conectivo – 3 (CTAP-3), RANTES y el Factor Plaquetario-4 (FP-4) (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Chen *et al.*, 2013). Los mecanismos que pueden emplear estos péptidos microbicidas son: contacto con la membrana bacteriana, cambiar la permeabilidad de la membrana e ingresar a la célula e inhibir la síntesis de moléculas grandes (Chen *et al.*, 2013). No obstante, no son los únicos mecanismos que pueden utilizar las plaquetas para tener una función de defensa contra las bacterias. Estas funciones incluyen navegación hacia el quimioatrayente inflamatorio N-fMetLeuPhe, expresión del Fragmento Constante (Fc) y receptores del complemento C3a/C5a, y la capacidad de generar metabolitos de oxígeno antimicrobianos, incluidos superóxido, peróxido de hidrógenos y radicales libres de hidroxilo (Tang, Yeaman & Selsted. 2002; Bielecki *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013; Maghsoudi *et al.*, 2017; Cieřlik-Bielecka *et al.*, 2018).

Estudios sobre los efectos antimicrobianos *in vitro* del PPP y del PRP han aumentado dramáticamente en la última década. Sin embargo, existen resultados controvertidos en los estudios sobre el efecto antimicrobiano del PPP y del PRP contra *E. coli*. Bielecki y colaboradores (Bielecki *et al.*, 2007), Burnouf y colaboradores (Burnouf *et al.*, 2013), Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2013) Galvez y Guerrero (Galvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014), Mariani y colaboradores (Mariani *et al.*, 2015), Maghsoudi y colaboradores (Maghsoudi *et al.*, 2017) y Ezzraimi y colaboradores (Ezzraimi *et al.*, 2022) encontraron actividad antimicrobiana por parte del PRP contra *E. coli*, concordando con los resultados de esta investigación. Por otra parte, Li y colaboradores (Li *et al.*, 2013) y Cieřlik-Bielecka (Cieřlik-Bielecka *et al.*, 2018) no encontraron actividad antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* por parte del PRP. Esta controversia se debe a la terminología relativa al uso de los concentrados plaquetarios que evalúan sus

propiedades antimicrobianas. Asimismo, esta inconsistencia puede estar relacionada con las diferencias en las cepas bacterianas y en los enfoques de prueba (Li *et al.*, 2013).

El PPP tenía poca o nula actividad antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* en los estudios antes mencionados. Caso contrario a los resultados de este trabajo de investigación donde se evidenció un efecto antimicrobiano por parte del PPP contra *E. coli*. Este efecto es debido a que el PPP producido presenta concentraciones plaquetarias entre 50000 hasta 393333 plt/ $\mu$ l, las cuales están por debajo del criterio de selección para un PRP (PPP es  $\leq$  400000 plt/ $\mu$ l). De igual forma, el efecto antimicrobiano puede ser producido por péptidos antimicrobianos y otros factores similares presentes en la fisiología normal del plasma (Galvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014).

El presente estudio fue realizado para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del PPP y del PRP contra *E. coli* empleando el método de discos de sensibilidad o Kirby-Bauer. Este método fue utilizado por su bajo costo y su estandarización a nivel mundial. No hubo diferencias significativas ( $p = 0,090$ ) entre el efecto antimicrobiano del PRP y del PPP. Este resultado es explicado por la presencia de plaquetas en el PPP. Además, por la presencia de moléculas antimicrobianas generadas por ruptura ya sea de plaquetas o glóbulos blancos durante el proceso de centrifugación (Moojen *et al.*, 2008; Galvez Escobar & Guerrero Ruiz, 2014). Asimismo, se empleó el PBS como un control negativo al no producir halo de inhibición contra *E. coli* y como control positivo se empleó la ciprofloxacina, un antibiótico que se receta para tratar infecciones urinarias, produciendo halos de inhibición entre 24.8 hasta 28.3 mm, mientras que el PPP y el PRP produjeron halos de inhibición entre 9.3 hasta 19.3 mm, siendo estos halos más grandes que los presentados por Cieślik-Bielecka y colaboradores (Cieślik-Bielecka *et al.*, 2018) contra *E. coli*.

La limitante principal que tuvo el estudio fue el costo económico de los materiales. Este no permitió realizar pruebas complementarias como la Concentración Mínima Inhibitoria o el ensayo de muerte bacteriana.

## 9. CONCLUSIONES

- La bacteria *Escherichia coli* fue aislada de muestras urinarias empleando el método de aislamiento por medio cromogénico (CHROMOagar Orientación). Presentando colonias de color rosa oscuro a rojizo y la coloración GRAM -.
- El Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP  $\leq 400000$  Plt/ $\mu$ l) y el Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP-  $\geq 400000$  Plt/ $\mu$ l) se pudo producir por el método de doble centrifugado a partir de la sangre venosa de los voluntarios. De lo cuales, 7 muestras fueron catalogadas como PPP y 5 muestras como PRP.
- La concentración mínima, máxima y promedio de plaquetas en los 7 PPP fue de  $50000 \times 10^3/\mu$ l,  $393333 \times 10^3/\mu$ l y  $214.523 \times 10^3/\mu$ l, respectivamente. En el caso de los 5 PRP fue de  $590 \times 10^3/\mu$ l,  $870 \times 10^3/\mu$ l y  $698.666 \times 10^3/\mu$ l, respectivamente.
- La concentración mínima, máxima y promedio de glóbulos blancos totales en los 7 PPP fue de  $0 \times 10^3/\mu$ l,  $0.05 \times 10^3/\mu$ l y  $0.03 \times 10^3/\mu$ l, respectivamente. En el caso de los 5 PRP fue de  $0.04 \times 10^3/\mu$ l,  $0.15 \times 10^3/\mu$ l y  $0.09 \times 10^3/\mu$ l, respectivamente.
- Solamente la muestra E presento neutrófilos en una concentración de  $0.03 \times 10^3/\mu$ l.
- Las 12 muestras empleadas en este trabajo de investigación pudieron ser clasificadas con el Sistema PAW (Tabla 5).
- El PPP y el PRP inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* aislada de muestras urinarias. Produciendo zonas de inhibición entre 9,3 mm y 19,3 mm.
- No hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) entre el efecto antimicrobiano del PPP y del PRP. Por lo que, ambos produjeron el mismo efecto contra la bacteria.

## 10.RECOMENDACIONES

- Aumentar la cantidad de muestras sanguíneas.
- Contabilizar las plaquetas, glóbulos blancos totales y neutrófilos de manera manual.
- Utilizar el Sistema de Clasificación MARSPILL para codificar los PPP y PRP que se quieran emplear en estudios de susceptibilidad antimicrobiana.
- Probar métodos comerciales para la obtención del Plasma Rico en Plaquetas.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de otros bioproductos como el Plasma Rico en Plaquetas y Leucocitos (L-PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Fibrina (PRF), Plasma Rico en Plaquetas, Leucocitos y Fibrina (L-PRF) y Factores de crecimiento (GF-PRP) contra *Escherichia coli* uropatógena.
- Emplear otras cepas uropatógenas en ensayo de susceptibilidad antimicrobiana con PRP o sus derivados.
- Realizar otras pruebas de susceptibilidad antimicrobiana como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o el ensayo de muerte bacteriana.

## 11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggour RL, Gamil L. (2017). Antimicrobial effects of platelet-rich plasma against selected oral and periodontal pathogens. *Pol J Microbiol*, 66(1):31–37.
2. Ahmed SS, Shariq A, Alsalloom AA, Babikir IH, Alhomoud, BN. (2019). Uropathogens and their antimicrobial resistance patterns: Relationship with urinary tract infections. *Int. J. Health Sci.* 13. pp 48–55.
3. Airasca AL. (2020). Biología de las plaquetas: características funcionales y estructurales. Volumen plaquetario medio en diferentes procesos proinflamatorios [Tesis Doctoral]. Córdoba, Argentina. Sistema de Bibliotecas, Universidad Católica de Córdoba.
4. Aizawa H, Kawabata H, Sato A, Masuki H, Watanabe T, Tsujino T, Isobe K, Nakamura M, Nakata K & Kawase T. (2020). A comparative study of the effects of anticoagulants on pure platelet-rich plasma quality and potency. *Biomedicines*, 8(3), 42.
5. Anitua, E. *et al.* (2008). Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 84. pp 415–421.
6. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. (2012). Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*, 37:652–657.
7. Arthrex. (2011). ACP: Autologous conditioned plasma double syringe system. Brochure LB0810F. Naples, FL: Arthrex, 2011.
8. Asadi Karam MR, Habibi M, Bouzari S. (2019). Urinary tract infection: Pathogenicity, antibiotic resistance and development of effective vaccines against Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol.*108:56–67.
9. Becton – Dickinson Company. (2019). BD™ CHROMagar™ Orientation Medium. Germany.
10. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. (2007) Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an *in vitro* study. *J Bone Joint Surg Br.* 89(3):417–420.

11. Biemer JJ. (1973). Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Annals of Clinical Laboratory Science*. 3:135–140.
12. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW. (2013). Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* 53, pp. 138-146.
13. Calipuy A, Ortiz M, Parraguez M, Zambrano R. (2017). Aislamiento e identificación de bacterias uropatógenas en muestras urinarias de mujeres atendidas en una clínica 64 particular de Lima. Perú. *Revista de investigación apuntes científicos estudiantiles de enfermería*. 1(1): 1-9.
14. Carranza MA, Rodríguez D, Díaz, J. (2003). Etiología y resistencia bacteriana de las infecciones urinarias en pacientes hospitalizados en el Centro Médico Naval entre enero y diciembre del 2003. *Rev. Soc. Per, Med. Inter*, 16(3): 5-13.
15. Carrillo P, Gonzalez A, Macias S. (2013). Plasma rico en plaquetas ¿Herramienta versátil de la medicina regenerativa? *Cir Cir*, 81:74-82.
16. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ & Dragoo, JL. (2011). Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *The American journal of sports medicine*, 39(2), 266-271.
17. Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2da Ed. SEIMC. 2003-2011. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiología>.
18. Cetinkaya RA, Yenilmez E, Petrone P, *et al.* (2018). Platelet-rich plasma as an additional therapeutic option for infected wounds with multi-drug resistant bacteria: in vitro antibacterial activity study. *Eur J Trauma Emerg Surg*, pp. 1–11.
19. Cieślik-Bielecka, A. *et al.* (2018). Antibacterial activity of leukocyte- and platelet-rich plasma: an *in vitro* study. *Biomed. Res. Int.* 2018.
20. Chen L, Wang C, Liu H, Liu G, Ran X. (2013). Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from subjects with diabetic dermal ulcers *in vitro*. *J Diabetes Res*. 2013;269527.
21. CLSI. (2020). M100- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30<sup>th</sup> ed. *CLSI supplement M100*. Wayne PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*. USA.

22. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. (2013) Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol*, 13: 47.
23. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. (2012). Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 28:998–1009.
24. Do Amaral RJFC, da Silva NP, Haddad NF, Lopes LS, Ferreira FD, Cappelletti PA., de Mello W, Cordeiro-Spinetti, E & Balduino A. (2016). Platelet-rich plasma obtained with different anticoagulants and their effect on platelet numbers and mesenchymal stromal cells behavior *in vitro*. *Stem cells international*, 2016.
25. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) *Trends Biotechnol*, 27:158–67.
26. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, *et al.* (2012). Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) *Curr Pharm Biotechnol*. 13:1145–1152.
27. Dohan Ehrenfest DM, *et al.* (2012). In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: Platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*, 13:1131–7.
28. Dohan Ehrenfest DM, Sammartino G, Shibli JA, Wang HL, Zou DR, Bernard JP. (2013). Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma - PRP, or Platelet-Rich Fibrin - PRF): the international classification of the POSEIDO. *POSEIDO*, 1:17–27.
29. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. (2014). Classification of platelet concentrates (platelet-rich plasma-PRP, platelet-rich fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, Ligament Tendons J*. 4: 3–9.
30. Dhurat R & Sukesh M. (2014). Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 7(4), 189.



31. Echevarría J, Sarmiento E, Osoreo F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta Méd Perú*, 23(S1):26-31.
32. Eryılmaz A, Ertuğrul B, Basal Y, Bolaman Z, Ömürlü İK, & Sakarya S. (2018). Antibacterial Effectiveness of Platelet Products (PRP, PPP, PCP, and PFC) on *M. catarrhalis* and *S. aureus*, a Causative Agent of Acute and Chronic Sinusitis, Respectively. *Allergy*, 1, 27-31.
33. Ezzaroug Ezzraimi A, *et al.* (2022). The Antibacterial Effect of Platelets on *Escherichia coli* Strains. *Biomedicines*, 10(7), 1533.
34. Fabbro MD, Bortolin M, Taschieri S, Ceci C, Weinstein RL. (2016). Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets*, 27(4):276–285.
35. Farghali, HA, AbdElKader, NA, AbuBakr, HO, Aljuaydi, SH, Khattab, MS, Elhelw, R, Elhariri, M. (2019). Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. *Sci Rep*, 9(1):12722.
36. Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barrios M. (2012). Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la Medicina Regenerativa. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 28(3): 200-216.
37. Gálvez Escobar JR, Guerrero Ruiz DL. (2014). Efecto antibacteriano *in vitro* del plasma rico en plaquetas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [Tesis Doctoral]. Antiguo Cuscatlán, La Libertad. Red Bibliotecaria Matías, Universidad Dr. José Matías Delgado.
38. Gómez CP, Plata M, Sejnau J, Rico CL, Vanegas S. (2009). Resistencia de la *E. coli* en urocultivos de pacientes con sospecha de infección urinaria intra y extra-hospitalaria en la Fundación Santa Fe de Bogotá. *Urol Colomb*, 18(1): 53-8.
39. Gonzales Meléndez RC, Elizalde Cuevas B, Cortés Cruz ME, Orduña Sánchez, M. (2020). Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. UNAM, FES Zaragoza, noviembre de.
40. Hasan A, Heiba A, Metwally L, Kishk R, Kamel N. (2019). Antimicrobial effect of platelet rich plasma and platelet gel against staphylococcus aureus isolated from surgical site infections: An in vitro study. *Egypt J Med Microbiol*, 28(2): 113-20.

41. Hua L, Lai G, Zhenjun, L, & Guie M. (2015). The study of anticoagulants selection in platelet-rich plasma preparation. *Chinese Journal of Plastic Surgery*, 31(4), 295-300.
42. Huapaya Lazo CE, Noriega Castañeda JR. (2008). Efecto inhibitor del crecimiento bacteriano *in vitro* del plasma rico en plaquetas. *Kiru*, 5(1):2–23.
43. Hengstler, KA., Hammann R & Fahr AM (1997). Evaluation of BBL CHROMagar orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2773-2777.
44. Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. ASM Microbe Library 2009, cited 01/05/22.
45. Intravia J, *et al.* (2014). *In vitro* evaluation of the anti-bacterial effect of two preparations of platelet rich plasma compared with cefazolin and whole blood. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 4(1), 79.
46. Kahn RA & Flinton LJ. (1974). The relationship between platelets and bacteria. *Blood*, 44:715–21.
47. Kececi Y, Ozsu S, & Bilgir O. (2014). A cost-effective method for obtaining standard platelet-rich plasma. *Wounds*, 26(8), 232-238.
48. Kevy S, Jacobson M. (2001). Preparation of growth factors enriched autologous platelet gel. Proceedings of the 27th Annual Meeting of Service Biomaterials, April.
49. Kot B. (2019). Antibiotic resistance among uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Microbiol*, 68:403–415.
50. Kot B, Wicha J, Gruzewska A, Piechota M, Wolska K, Obrębska M. (2016). Virulence factors, biofilm-forming ability, and antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* strains isolated from hospitalized patients. *Turk J Med Sci*.46(6):1908–1914.
51. Kour P, Pudukalkatti PS, Vas AM., Das S, & Padmanabhan S. (2018). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and injectable platelet-rich fibrin on the standard strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Contemporary clinical dentistry*, 9(Suppl 2), S325.

52. Lalitha, MK. (2012). *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*, <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>.
53. Lana JFS. D, Purita J, Paulus C, Huber SC, Rodrigues BL, Rodrigues AA, Rodrigues MH, Santana JL, Madureira A, Malheiros-Luzo C, Dias-Belangero W & Annichino-Bizzacchi, JM. (2017). Contributions for classification of platelet rich plasma—proposal of a new classification: MARSPILL. *Regenerative Medicine*, 12(5), 565-574.
54. Leguizamón M, Samudio M, Aguilar G. (2017). Sensibilidad antimicrobiana de enterobacterias aisladas en infecciones urinarias de pacientes ambulatorios y hospitalizados del Hospital Central del IPS. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 15(3):41-9.
55. Lei H, Gui, L, & Xiao R. (2009). The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clinical biochemistry*, 42(13-14), 1452-1460.
56. Li H, Hamza T, Tidwell JE, Clovis N, Li B. (2013). Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection. *Adv Healthc Mater*. 2:1277–84.
57. Li H, & Li B. (2013). PRP as a new approach to prevent infection: preparation and *in vitro* antimicrobial properties of PRP. *J Vis Exp*. (74): e5035.
58. Machado JE, Murillo MM. (2012). Evaluación de sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes en primer nivel de atención en salud de Pereira. *Rev Salud Pública*, 14(4): 710-9.
59. Maghsoudi O, Ranjbar R, Mirjalili SH, *et al.* (2017). Inhibitory activities of platelet-rich and platelet-poor plasma on the growth of pathogenic bacteria. *Iran J Pathol*, 12:79-87.
60. Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry EJ, Bottomley AL. (2017). Metabolic adaptations of uropathogenic *E. coli* in the urinary tract. *Front Cell Infect Microbiol*, 7:241.
61. Mariani E, Filardo G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M & Facchini, A. (2014). Platelet-rich plasma affects bacterial growth *in vitro*. *Cytotherapy*, 16(9), 1294-1304.
62. Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Di Matteo B, Filardo G. (2015). Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of platelet-rich plasma *in vitro*. *BMC Microbiol* 15. pp. 149-162.

63. Martínez-Martínez A, Ruiz-Santiago F, García-Espinosa J. (2018). Plasma rico en plaquetas: ¿mito o realidad? *Radiología*, 60(6):465-75.
64. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE & Georgeff, KR. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85(6), 638-646.
65. Marx RE. (2004) Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62:489-496.
66. Mautner K, *et al.* (2015). A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R*, 7: S53–S59.
67. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, Arciero R & Beitzel, K. (2012). Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *JBJS*, 94(4), 308-316.
68. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, & Borzini P. (2009). Not every PRP- gel is born equal Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP- gel preparations: Fibrinet®, RegenPRP- Kit®, Plateltex® and one manual procedure. *Vox sanguinis*, 97(2), 110-118.
69. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraud L, Veran J & Sabatier, F. (2016). DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ open sport & exercise medicine*, 2(1).
70. Merlino J, Siarakas S, Robertson G J, Funnel G R, Gottlieb T, Bradbury R. (1996). Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol*. 34:1788–1793.
71. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. (2012). Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol*, 13:1185–1195.
72. Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, Overdeest EP, van Zundert A, Knappe JT, Castelein RM, Creemers LB, Dhert WJ. (2008). Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res*, 26:404–410.
73. Murray CJ, *et al.* (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet* 399. P629-655.

74. Odoki M, *et al.* (2019). Prevalence of bacterial urinary tract infections and associated factors among patients attending hospitals in Bushenyi District, Uganda. *Int J Microbiol.* 2019:4246780.
75. Olmos AF, Gracia de la Fuente C, Nieto JS, Ramos SV. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 601-608.
76. Orrego-Marin CP, Henao-Mejia CP, Cardona-Arias JA. (2014). Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. *Acta Médica Colombiana*, 39(4):353.
77. Osorio Jamanca MÁ. (2020). Comparación de un agar sangre modificado y pruebas rápidas spot con un medio cromogénico para la identificación presuntiva de uropatógenos-Hospital Nacional Docente Madre Niño “San Bartolomé” [Tesis de Licenciatura]. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica.
78. Ovalle WK & Nahirney PC. (2021). Netter Histología Esencial con Correlación Histopatológica. Vol. 3. Barcelona, España. Elsevier. 551 p. Cap.7. Sangre y Médula Ósea.
79. Oyaert M, Van Meensel B, Cartuyvels R, Frans J, Laffut W, Vandecandelaere P, De Beenhouwer H BILULU Study Group. (2018). Laboratory diagnosis of urinary tract infections: Towards a BILULU consensus guideline. *J Microbiol Methods*, 146:92–99.
80. Passadouro R, Fonseca R, Figueiredo F, Lopes A, Fernandes C. (2014). Avaliação do perfil de sensibilidade aos antibióticos na infecção urinária da comunidade. *Acta Med Port*, 27:737–42.
81. Pham TAV, Tran TTP, Luong NTM. (2019) Antimicrobial effect of platelet-rich plasma against *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Dent.* 2019:7329103.
82. Perez AG, Lana, JFS, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD & Santana MHA. (2014). Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *International Scholarly Research Notices*, 2014.
83. Pietruszka, P.; Chruścicka, I.; Duś-Ilnicka, I.; Paradowska-Stolarz, A. (2021). PRP and PRF—Subgroups and Divisions When Used in Dentistry. *J. Pers. Med.* 11, 944

84. Rivera, Z. (2020). Factores de crecimiento en el plasma: herramienta terapéutica en dermatología. *Revista Digital de Postgrado*. 9(3).
85. Rickham PP. (1964). Human Experimentation. Code of Ethics of the World Medical Association. *Declaration of Helsinki*. *Br Med J*. 2(5402): 177.
86. Sacsquispe, R & Velásquez, J. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud. pp. 9-68.
87. Sacsquispe R & Ventura G. (2001). Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Lima, Perú: Instituto Nacional de Salud. pp. 32-85.
88. Samra Z, Heifetz M, Talmor J, Bain E, Bahar J. (1998). Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 990-994.
89. Soto P, Guillén A & Rojas R. (2012). Manual de Procedimientos para el cultivo de orina (Urocultivo). Lima, Perú: Sociedad Científica Peruana de Microbiología.
90. Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, & Jerez LB. (2007). A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 65(6), 1084-1093.
91. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. (2002). Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*, 70: 6515-7.
92. Tucto Succhil SJ. (2014). Evaluación de la Resistencia Bacteriana según MIC 90 de Escherichia coli uropatógena aisladas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope–EsSalud, durante Octubre 2010 a Agosto 2013 [Tesis de Licenciatura]. Trujillo, Perú. Biblioteca Digital – Dirección de Sistemas de Informática y Comunicación – Universidad Nacional de Trujillo.
93. Wilson ML & Gaido L. (2004). Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin. Infect. Dis.* 38:1150–1158.
94. Yang, LC, Hu SW, Yan M, Yang J J, Tsou SH, Lin YY. (2015). Antimicrobial activity of plasma-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens. *Journal of Periodontology* 86, 310–318.
95. Yeaman, MR. (1997). The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin. Infect. Dis.* 25, 951-968.

96. Yeaman MR, Bayer AS. (1999). Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Res. Updates* 2, 116–126.
97. Zboromyrska Y, de Cueto López M, Alonso-Tarrés C, Sánchez-Hellín V. 2019. 14b. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. Zboromyrska Y (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

## **12.ANEXOS**

### **ANEXO 1**

#### **Consentimiento informado**

##### **Información general**

El Plasma Rico en Plaquetas es un derivado sanguíneo concentrado obtenido mediante centrifugación de la sangre total que se caracteriza por poseer una alta concentración de plaquetas (4 a 6 veces sus valores normales), cada vez es más aceptado en el campo de la medicina para el tratamiento de diversas patologías, siendo empleado en las especialidades de ortopedia, estomatología y cirugía maxilofacial, dermatología, angiología, cirugía estética, oftalmología, medicina deportiva, medicina regenerativa, entre otros.

##### **El procedimiento**

Se obtendrá 44 mL de sangre de la vena braquial (12 tubos de tapa celeste BD Vacutainer) utilizando el sistema BD Vacutainer, cada tubo contiene 1 mL del anticoagulante citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) al 3,2%. Los tubos serán invertidos 5 veces para homogenizar la sangre con el anticoagulante. La toma de muestra se realizará en 3 ocasiones durante un mes.



## Consentimiento Informado

Yo \_\_\_\_\_ doy mi consentimiento para que me extraigan 44 mL de sangre de la vena braquial (12 tubos de tapa celeste BD Vacutainer) utilizando el sistema BD Vacutainer.

---

Se me ha proporcionado esta hoja de información, he comprendido el significado del procedimiento y sus riesgos inherentes. Declaro estar debidamente informado de acuerdo a los artículos.

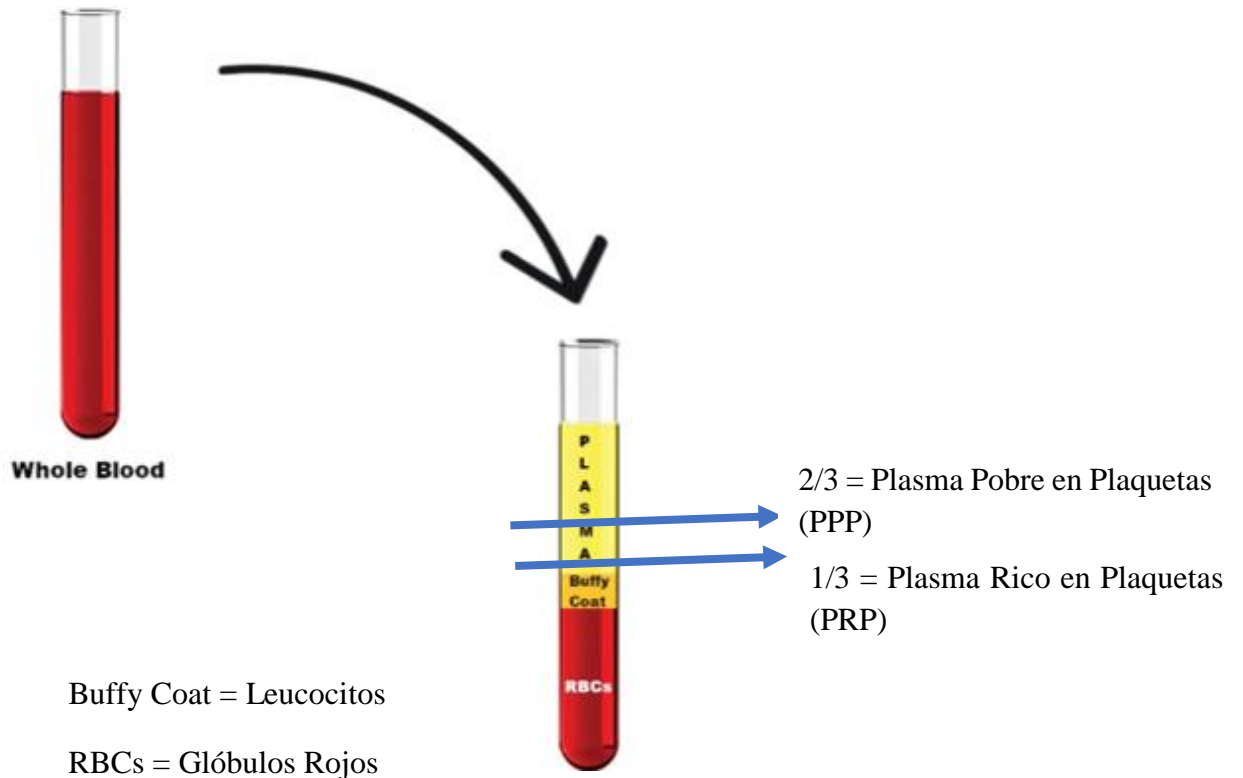
He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas en la charla informativa sobre el procedimiento con el MSc. Sandro Juniors Jibaja Cáceres. **He tomado la decisión de forma libre y voluntaria.**

Siendo las \_\_\_\_\_ del día \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

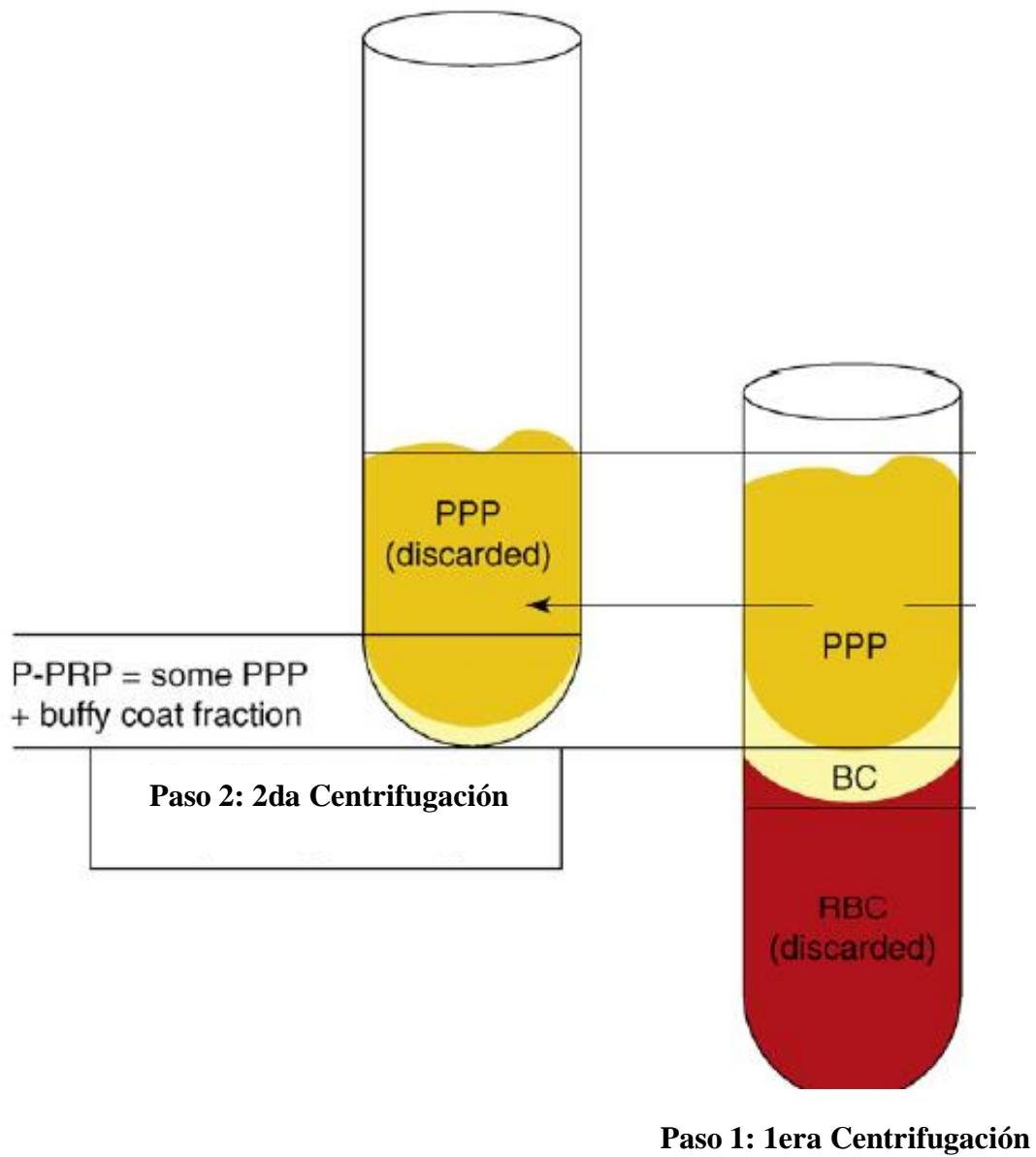
FIRMA

## ANEXO 2



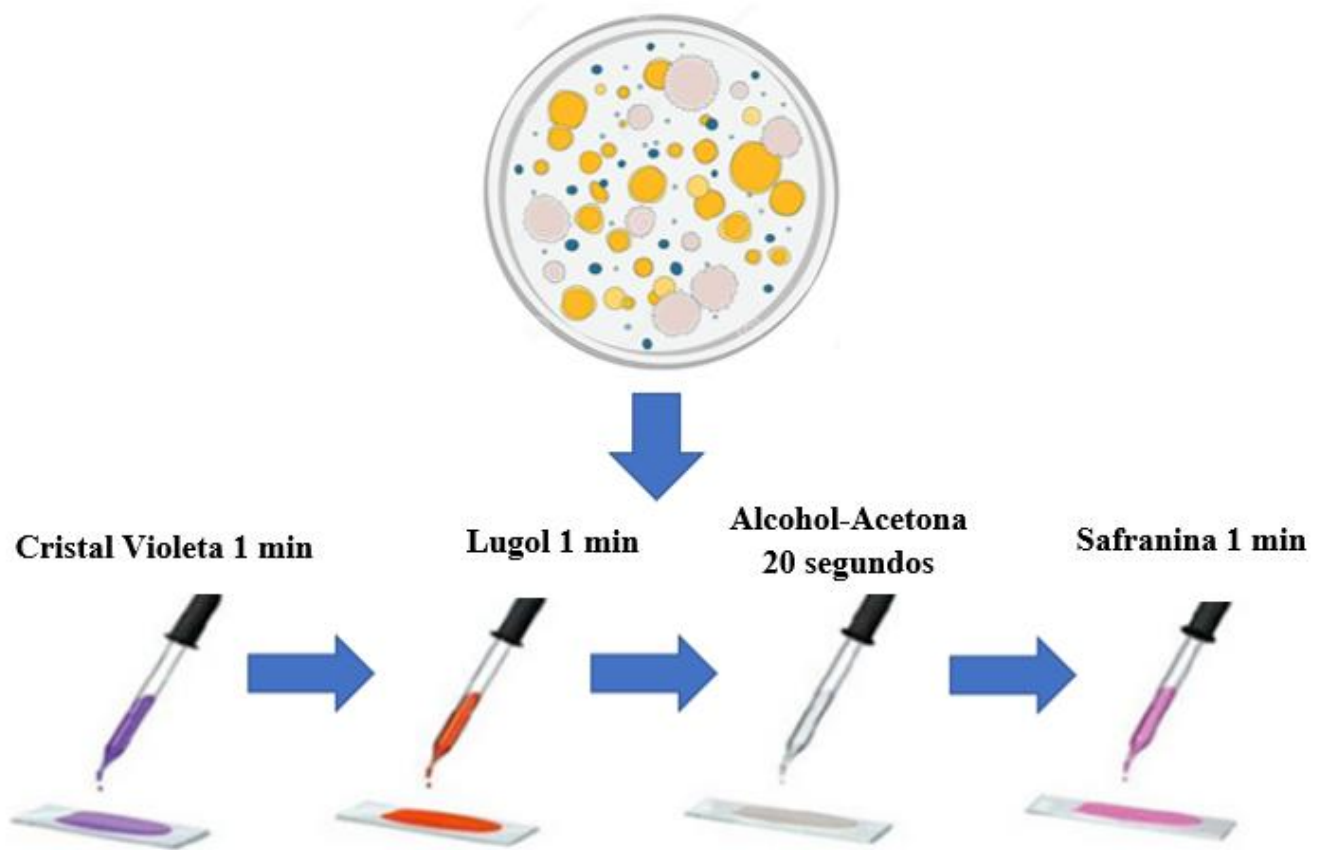
*Nota:* Hemoderivados del Plasma Rico en Plaquetas: PPP, LRP y PPP.  
Modificado de Pietruszka P, Chruścicka I, Duś-Ilnicka I, Paradowska-Stolarz A. 2021.

### ANEXO 3



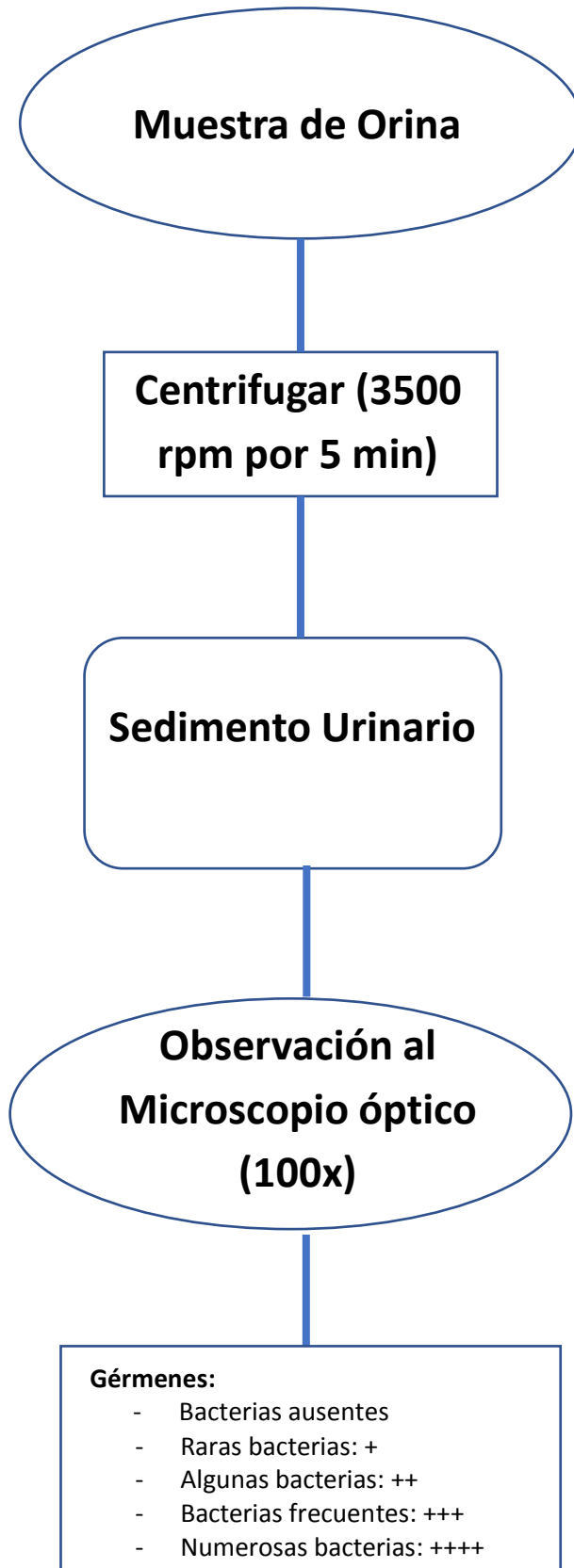
*Nota:* Obtención del Plasma Humano Pobre en Plaquetas (PPP) y Plasma Humano Rico en Plaquetas (PRP). Modificado de Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. 2009.

## ANEXO 4



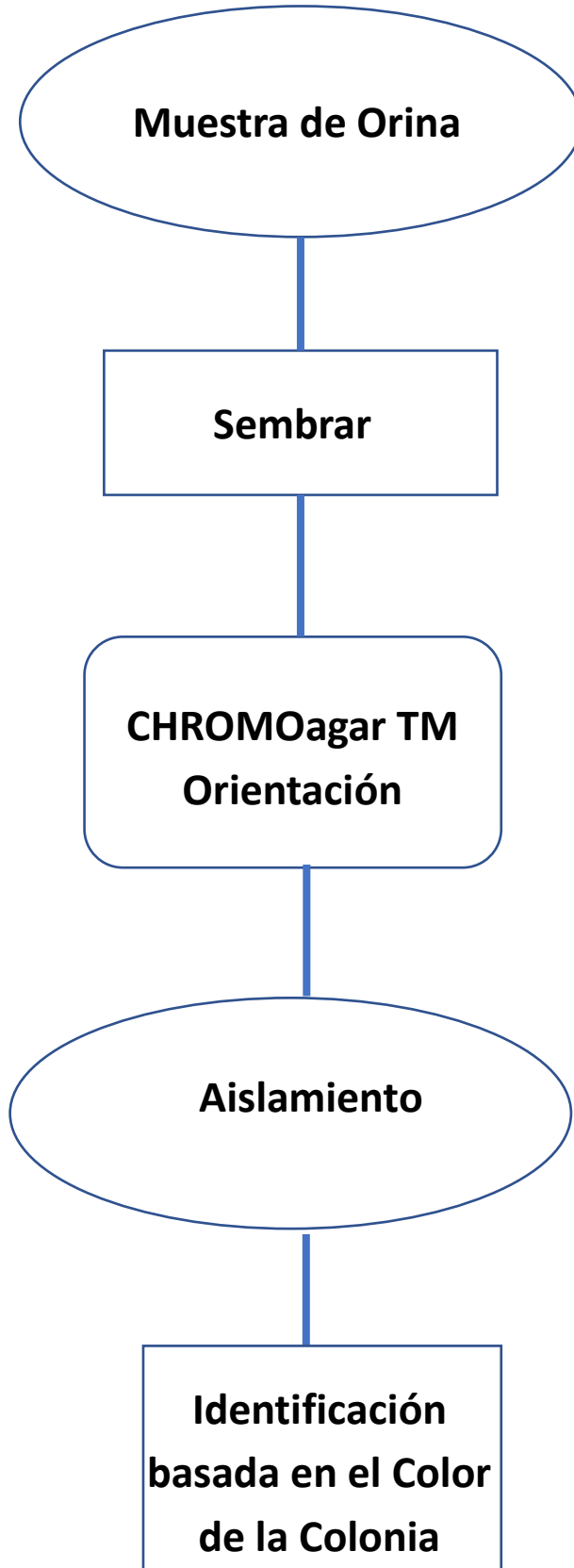
*Nota:* Procedimiento para realizar una coloración GRAM. Elaboración Propia.

## ANEXO 5



*Nota:* Flujograma para la observación de la bacteriuria significativa en muestras de orina. Elaboración Propia.

## ANEXO 6



Nota: Flujograma para el aislamiento de *Escherichia coli*. Elaboración Propia.

## ANEXO 7

Tabla N.º 11: Puntos de Corte para Disco Difusión para Enterobacterias (CLSI 2020).

QUINOLONES AND FLUOROQUINOLONES for <i>Enterobacteriaceae</i> except <i>Salmonella</i>						
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥ 26	–	22–25	≤ 21
B	Levofloxacin	5 µg	≥ 21		17–20	≤ 16
			S		I	R

*Nota:* Tomado de CLSI. 2020.