

Estudio ex vivo de la eficacia de la autoinfusión de plasma rico en células blancas en úlceras infectadas

Autora: Bibiana Trevissón Redondo

Tesis doctoral UDC / Año 2021

Directores: Prof. Dr. Daniel López López

Prof. Dr. David Sevillano Fernández

Programa de doctorado en salud y motricidad humana



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

D. David Sevillano Fernández, Profesor Asociado, pertencente ao Departamento de Microbioloxía da Universidad Complutense de Madrid e **D. Daniel López López**, Profesor Titular de Universidad, pertencente ao Departamento de Ciencias da Saúde da Universidade da Coruña, con docencia na Facultade de Enfermaría e Podoloxía.

Fan Constar que o presente proxecto de doutoramento, titulado “**Estudio ex vivo de la eficacia de la autoinfusión de plasma rico en células blancas en úlceras infectadas**”, que presenta a alumna Bibiana Trevissón Redondo para optar ao título de Doutor/a con Mención Internacional, foi elaborada baixo a nosa dirección no programa de doutoramento Saúde e Motricidade Humana e reúne os requisitos de idoneidade e calidade científica necesarios para obter un informe FAVORABLE.

E para que así conste aos efectos da súa presentación, asinamos a presente certificación.

Os Directores da tese de doutoramento

Prof. Dr. David Sevillano Fernández

Prof. Dr. Daniel López López

1. DEDICATORIA

*A mis padres, por darme más
que la vida...*

2. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, Prof. Dr. Daniel López López, por su incansable insistencia para la finalización de la tesis en tiempo y forma, ya que gracias él, esta tesis ha ido viento en popa, pero muy especialmente a Prof. Dr. David Sevillano Fernández, por su infinita paciencia, por todo lo que me ha enseñado durante el desarrollo de la tesis, y por haber sido un amigo además de un gran director de tesis, como dijo Henry Adams, historiador Americano, “El maestro que deja huella para la eternidad, nunca puede decir cuando se detiene su influencia” gracias David, de corazón.

Sin olvidarme del Prof. Dr. Luis Alou Cervera y Prof. Dra. Natalia González Hidalgo, sin su ayuda, este proyecto no hubiera sido posible.

A mi mentor, todo esto es “culpa” suya, y tengo tanto que agradecerle, siempre ahí, desde de la sombra, al otro lado de la pantalla del ordenador, o al otro lado del teléfono, siempre con una palabra de ánimo, de inspiración, siempre aumentando el conocimiento, siempre tendiendo la mano a los alumnos, siempre compartiendo conocimiento y ayudando a crecer, si hubiera más gente como usted, el mundo sería sin duda un lugar mejor.

A mi marido, por todos los días malos que he tenido, por saber llevarme y ayudarme a no decaer, por ser ese pilar que me sostiene, que me anima a seguir, porque tengo el mejor marido, el mejor amigo, el mejor compañero que se puede tener.

A mis pollitos, Javier y Álvaro, por cada instante que les he robado con este trabajo, por ser la razón por la que me levanto cada mañana, por que sus sonrisas me dan luz, y me ayudan a seguir. Gracias por enseñarme que la vida es aún más maravillosa desde que estáis en ella, os quiero “*hasta el infinito y más allá*”.

A mi hermano, por haberme enseñado que se puede querer tanto a alguien antes siquiera de conocerlo, porque pase lo que pase, y haya los kilómetros que haya, solo tendrás que llamarme y estaré ahí a tu lado, siempre, te quiero enano.

A mi pequeño gorrión, mi pepito grillo, por estar siempre ahí, nunca pensé que encontraría a una amiga tan especial, que me entiende sin hablar, gracias por llegar a mi vida para quedarte, Cris.

Y como no, a vosotros, papá, mamá, soy lo que soy gracias a vosotros, no se os olvide. Mamá; gracias por enseñarme a ser una mujer independiente, fuerte, autónoma, gracias por enseñarme que puedo ser lo que quiera ser, y gracias por estar siempre ahí, en las buenas, en las malas y en las peores. Papa, gracias por dármelo todo, por ser mi modelo a

seguir, por enseñarme que con trabajo y esfuerzo todo se consigue, en esta vida solo aspiro a llegar a ser la mitad de buena persona y buena profesional de lo que has sido tu, gracias por ser todo un ejemplo para mí, esta tesis también es vuestra.

3. RESÚMENES

3.1. RESUMO

Introdución: as úlceras do pé diabético infectadas (UPDI) son enfermidades recalcitrantes que son difíciles de controlar. A infiltración de plasma rico en plaquetas (PRP) é beneficiosa para promover a cicatrización natural das feridas, pero a súa composición depende do dispositivo concentrador e do hemograma do suxeito. O papel dos leucocitos é fundamental, controlan a infección e restablecen a curación natural e non se examinou.

Obxectivos: determinar a eficacia da PRP rica en leucocitos (LRPRP) en UPDIs e optimizar a terapia; actividade antimicrobiana, variabilidade LRPRP entre sistemas e suxeitos. Probabilidade de éxito.

Material e métodos: desenvóléronse ensaios clínicos e ex vivo para determinar a eficacia antimicrobiana de LRPRP en organismos prevalentes de UPDIs e a variación na composición entre sistemas e suxeitos.

Resultados: as concentracións alcanzables de plaquetas e neutrófilos en LRPRP reducen ou conteñen carga orgánica ($> 2\log$ CFU/ml, plaquetas) (neutrófilos). O sistema Easy Kit é máis óptimo para obter densidades efectivas, aínda que a calidade celular do PRP-L depende do sistema, do sexo e da idade do suxeito.

Conclusiones: LRPRP restauraría o proceso de curación natural reducindo a carga de microorganismos. Despois de optimizar a terapia, calquera suxeito independentemente do sexo e a idade beneficiaríase do tratamento.

3.2. RESUMEN

Introducción: Las úlceras de pie diabético infectadas (UPDI) son afecciones recalcitrantes de difícil manejo. La infiltración de plasma rico en plaquetas (PRP) es beneficiosa por fomentar la cicatrización natural de heridas, pero su composición es dependiente del dispositivo concentrador y hemograma del sujeto. El papel de los leucocitos es determinante, controlan la infección y restauran la cicatrización natural, y no ha sido examinado.

Objetivos: Determinar la efectividad del PRP rico en leucocitos (LRPRP) en UPDIs y optimizar la terapia; actividad antimicrobiana, variabilidad del LRPRP entre sistemas y sujetos. Probabilidad de éxito.

Material y Métodos: Se desarrollaron ensayos clínicos y *ex vivo* para determinar la eficacia antimicrobiana del PRP-L en organismos prevalentes de UPDIs y la variación de composición entre sistemas y sujetos.

Resultados: Concentraciones de plaquetas y neutrófilos alcanzables en LRPRP-reducen la biocarga ($>2\log$ UFC/ml, plaquetas) o la contienen (neutrófilos). El sistema Easy Kit es más óptimo para obtener densidades efectivas aunque la calidad celular del PRP-L depende del sistema y del sexo y edad del sujeto.

Conclusiones: El LRPRP restauraría el proceso natural de cicatrización por reducción de la biocarga de microorganismos. Tras optimizar la terapia, cualquier sujeto con independencia del sexo y edad, se beneficiaría del tratamiento.

3.3. ABSTRACT

Introduction: Infected diabetic foot ulcers (IDFUs) are recalcitrant ulcers with complicated clinical management. Platelet-rich plasma (PRP) infiltration is beneficial by promoting natural wound healing, but its composition is highly dependent on the concentration device and blood count of the subject. The role of leukocytes is decisive, they control infection and restore natural healing but it has not been examined.

Objectives: To determine the effectiveness of the PRP rich in leukocytes (LRPRP) in DFIs and to optimize the therapy; antimicrobial activity, LRPRP variability between systems and subjects. Probability of clinical success.

Material and Methods: Clinical and ex vivo trials were developed to determine the antimicrobial efficacy of LRPRP in prevalent organisms of DFIs and the compositional variation according to systems and subjects.

Results: Achievable platelet and neutrophil concentrations in LRPRP reduce ($> 2\log$ CFU/ml, platelets) or contain (neutrophils) bioburden. The Easy Kit system is more optimal to obtain effective densities, although the cellular quality of LRPRP depends on the system and the sex and age of the subject.

Conclusions: LRPRP would restore the natural healing process by reducing the bioburden of microorganisms. After optimizing therapy, any subject regardless of gender and age would benefit from treatment.

ÍNDICE

1. DEDICATORIA.....	5
2. AGRADECIMIENTOS.....	9
3. RESÚMENES	13
3.1. RESUMO	15
3.2. RESUMEN	16
3.3. ABSTRACT.....	17
ÍNDICE.....	19
4. PRÓLOGO.....	27
5. REGISTRO DE FIGURAS, TABLAS Y ABREVIATURAS	31
5.1. TABLAS.....	33
5.2. IMÁGENES	35
5.3. ABREVIATURAS.....	38
6. INTRODUCCIÓN.....	41
6.1. DIABETES MELLITUS.....	43
6.1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN.....	43
6.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	44
6.1.3. COMPLICACIONES.....	44
6.1.3.1. Complicaciones de la piel.....	44
6.1.3.2. Complicaciones oculares	44
6.1.3.3. Neuropatía	45
6.1.3.4. Cetoacidosis	45
6.1.3.5. Nefropatía	45
6.2. PIE DIABÉTICO	46
6.2.1. LA NEUROPATÍA DIBÉTICA.....	46
6.2.2. LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA.....	48
6.2.3. INFECCIÓN.....	48
6.2.4. ALTERACIONES BIOMECÁNICAS	49
6.2.5. LESIONES DE PIE DIABÉTICO	50
6.2.6. ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO	51
6.2.6.1. Tratamiento úlcera de pie diabético	53

6.2. <i>SANGRE ENTERA</i>	55
6.3. <i>PLASMA RICO EN PLAQUETAS</i>	56
6.3.1. Definición.....	56
6.3.2. Aplicaciones	56
6.3.3. Preparación del PRP	57
6.3.4. Composición del PRP:.....	60
6.3.4.1. Plaquetas.....	60
6.3.4.2. Células blancas de sanguíneas	62
6.3.5. Resultados de la terapia PRP.....	64
7. HIPÓTESIS	67
7.1. <i>Pregunta de investigación</i>	69
7.2. <i>Hipótesis que se plantea</i>	70
8. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS.....	73
8.1. <i>Justificación del estudio</i>	75
8.2. <i>Objetivos del estudio</i>	76
8.2.1. Objetivo principal	76
8.2.2. Objetivos específicos:.....	76
9. MATERIAL Y MÉTODOS	77
9.1. <i>Generales</i>	79
9.1.2. Periodo de realización del estudio	79
9.1.3. Características generales de la muestra.....	79
9.1.4. Selección de los participantes.....	80
9.1.5. Procedimiento recogida de datos	80
9.1.6. Aspectos éticos y legales.....	80
9.2. <i>ENSAYO CLINICO CRUZADO PRELIMINAR PARA LA COMPA-</i> <i>RACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACION DE</i> <i>PRP EN SUJETOS SANOS. SELECCION DEL DISPOSITIVO</i>	81
9.2.1. Estudio y participantes.....	81
9.2.2. Obtención de la muestra y métodos de preparación de PRP .	81
9.2.3. Preparación del PRP	82
9.2.4. Procesamiento de las muestras y análisis de los datos	83
9.2.5. Análisis estadístico	83

9.3. Caracterización de los factores modificadores de la calidad del concentrado de plaquetas y leucocitos obtenido con el dispositivo candidato. Análisis de la variabilidad entre individuos:	85
9.3.1. Estudio y participantes	85
9.3.2. Obtención de la muestra, sistema de separación de la sangre y protocolo de preparación de plasma rico en plaquetas y leucocitos	86
9.3.3. Procesamiento de las muestras y análisis de los datos.....	87
9.3.4. Análisis estadístico	87
9.4. Efecto antimicrobiano de plaquetas y neutrófilos.....	89
9.4.1. Participantes	89
9.4.2. Reactivos y soluciones.....	89
9.4.3. Obtención de las muestras y preparación de PRP	90
9.4.4. Neutrófilos.....	91
9.4.5 Suero humano	93
9.4.6. Microorganismos y medios de cultivo	93
9.4.7 Procedimiento experimental.....	94
9.4.7.1. Actividad antimicrobiana de los neutrófilos (PMNs)	94
9.4.7.2. Actividad antimicrobiana de las plaquetas	95
9.4.8. Curvas de muerte bacteriana	96
9.4.9. Medida del efecto antimicrobiano	97
9.4.10 Modelado dosis-respuesta	97
9.4.11. Análisis estadístico	98
10. RESULTADOS.....	101
10.1 Ensayo clínico cruzado preliminar para la comparación de diferentes métodos de preparación de PRP en sujetos sanos.....	103
10.1.1. Concentración de plaquetas y leucocitos en sangre y en PRP..	103
10.1.2. Composición del concentrado de leucocitos obtenido con los diferentes métodos de preparación de PRP.....	105
10.1.3. Caracterización de los factores modificadores de la calidad del concentrado de plaquetas y leucocitos obtenido con el dispositivo candidato. Análisis de la variabilidad entre individuos:	107
10.1.4. Análisis de la variabilidad del concentrado de acuerdo al avance de la edad	110

10.1.5. Variabilidad en la eficiencia de captura de células entre grupos de edad.....	111
10.1.6. Análisis de la variabilidad del concentrado entre sujetos de acuerdo al dimorfismo sexual	113
10.1.7. Variabilidad en la eficiencia de captura de células entre individuos de diferente género	115
10.1.8. Análisis de la variabilidad del concentrado entre sujetos de acuerdo a la evolución del dimorfismo hormonal con la edad	119
10.2 <i>Aproximación ex vivo para establecer el efecto antimicrobiano de neutrófilos y plaquetas</i>	123
10.2.2. Hemograma basal de los participantes	123
10.2.3. Concentración de neutrófilos.....	124
10.2.4. Actividad antimicrobiana de los neutrófilos.....	124
10.2.5. Medida del efecto antimicrobiano de los PMNS	129
10.2.6. Modelo dosis respuesta de los PMNs.....	133
10.2.7. Probabilidad de éxito de la infusión del concentrado leucocitario en úlceras infectadas	140
10.2.8. Actividad antimicrobiana de las plaquetas	144
10.2.8.1. Recuento de células sanguíneas en los concentrados sanguíneos conseguidos con el sistema clasico prp (Wego Clasic prp kit)	144
12.3.7 Recuento de bacterias antes y después de la exposición a plaquetas	145
10.2.8.3. Medida del efecto antimicrobiano de las plaquetas ...	148
12.3.9. Modelo dosis-respuesta de las plaquetas	150
11. DISCUSIÓN	157
11.1. <i>Efecto antimicrobiano de neutrófilos y plaquetas</i>	164
11.2. <i>Sistemas de concentración de la sangre. Selección y análisis de factores modificadores del preparado final</i>	170
11.3. <i>Montecarlo; probabilidad de éxito de la terapia</i>	178
12. CONCLUSIONES	181
12. <i>CONCLUSIONES</i>	183

12. CONCLUSIONS.....	186
13. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	189
13.1. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	191
13.2. CURSOS	192
14. BIBLIOGRAFÍA	193

4. PRÓLOGO

En esta memoria abordamos mediante una aproximación “ex vivo” la efectividad del concentrado autólogo de plaquetas y de células blancas en el tratamiento de las úlceras de piel y partes blandas infectadas, y en particular, en el tratamiento de la úlcera infectada del pie diabético que con frecuencia pone en situación de riesgo al paciente. En el apartado de la introducción desglosaremos los aspectos más relevantes de la diabetes mellitus, una enfermedad prevalente a nivel mundial que afecta a más de 420 millones de personas. Un porcentaje amplio de esta población sufrirá graves secuelas como consecuencia de las complicaciones infecciosas de las úlceras de partes blandas particulares de esta patología, que preceden al 85% de las amputaciones mayores que sufren los diabéticos.

A continuación abordaremos los aspectos más relevantes de la terapia regenerativa basada en la infusión autóloga de plasma rico en plaquetas (PRP). Una terapia alternativa que ha cosechado importantes éxitos clínicos en diferentes campos de la medicina que, no obstante, en los últimos años está suscitando un cierto recelo debido a las serias inconsistencias de eficacia obtenidas para determinadas aplicaciones clínicas. En gran parte estas inconsistencias derivan del desconocimiento de la composición celular y proteómica del PRP así como de los mecanismos que conducen a la eficacia del tratamiento. Pero también debido al gran desconocimiento sobre las propiedades de los sistemas comerciales habitualmente empleados para la preparación del PRP y sus consecuencias en la composición final de los productos finales. La composición del PRP es determinante para definir adecuadamente las aplicaciones médicas potenciales y por este motivo dedicaremos un pequeño apartado de la memoria a explicar las variables metodológicas e inherentes al sujeto que ayudarían a optimizar el tratamiento con PRP.

La información dilatada y actual que manejamos en esta introducción, es la meramente necesaria para que cualquier lector pueda comprender el punto de vista que imprimo en la discusión de esta memoria de acuerdo a los resultados obtenidos, soportados por una seria y rigurosa metodología de trabajo.

5. REGISTRO DE FIGURAS, TABLAS Y ABREVIATURAS

5.1. TABLAS

Tabla 1. Características de las lesiones de pie diabético:	44
Tabla 2. Protocolo de trabajo empleado con los métodos de preparación de PRP a.....	75
Tabla 3. Curvas experimentales y volúmenes empleados de las distintas fracciones en microlitos. Por orden de incorporación	88
Tabla 4. Recuento de plaquetas y leucocitos (células x106/ml) en sangre periférica y en el PRP obtenido con los diferentes métodos de concentración.	96
Tabla 5. Factor de incremento (cociente PRP:SP) de neutrófilos, linfocitos y monocitos en los concentrados leucocitarios obtenidos con los diferentes métodos de concentración de PRP propuestos	99
Tabla 6. Hematocrito basal y recuento de células x106/ml en los productos finales (PRP-L) obtenidos con el sistema Easy Kit	100
Tabla 7. Datos demográficos y análisis descriptivo de la población de estudio clasificada por grupos de edad	102
Tabla 8. Concentración de plaquetas y CBs (celulas x106/ml) en SP y en los productos finales (PRP-L) obtenidos con Easy kit en los grupos control y de adultos mayores.....	104
Tabla 9. Datos demográficos y análisis descriptivo de la población de estudio clasificada por géneros	106
Tabla 10. Concentración de plaquetas y CBs (células x106/ml) en SP y en los productos finales (PRP-L) obtenidos con Easy kit según el género de los sujetos	108
Tabla 11. Recuento de células sanguíneas (media células x106/ml \pm DE; mediana [RI] en sangre periférica y en los productos finales (PRP-L) de hombres y mujeres clasificados de acuerdo a la edad de corte.	113
Tabla 12. Datos descriptivos de los voluntarios (n=3).....	115
Tabla 13 . Hemograma simplificado (células x106/ml) de los participantes en el estudio.....	116
Tabla 14. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC PMNs en presencia de suero sin	

inactivar para SASM, SARM y E. coli. Los parámetros de la ecuación para P. aeruginosa reflejan la variabilidad en la respuesta entre voluntarios.	130
Tabla 15. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC PMNs en presencia de suero inactivado para SASM, SARM y E. coli. Los parámetros de la ecuación para P. aeruginosa reflejan la variabilidad en la respuesta entre voluntarios.....	130
Tabla 16. Concentración mínima de PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactivado requerida para conseguir el efecto perseguido.....	131
Tabla 17. Concentración mínima de PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactivado requerida para conseguir el efecto perseguido en P. aeruginosa de acuerdo a la respuesta en cada voluntario.....	132
Tabla 18. Porcentaje de pacientes que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de neutrófilos obtenido con los diferentes dispositivos comerciales en úlceras infectadas por las cepas ensayadas. PA; P. aeruginosa	134
Tabla 19. Porcentaje de pacientes, según sexo y edad, que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de neutrófilos obtenido con Easy kit en úlceras infectadas por las cepas ensayadas	135
Tabla 20. Recuento de células sanguíneas tras concentrar con el dispositivo.....	136
Tabla 21. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC plaquetas para cada una de las cepas estudiadas.....	145
Tabla 22. Concentración mínima de plaquetas necesaria para conseguir un efecto antimicrobiano equivalente a una reducción de la carga basal de 0, 1, 2 y 3 logaritmos tras 5 horas de incubación A; S. aureus. B; E.coli y Paeruginosa.....	145
Tabla 23. Porcentaje de pacientes que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de plaquetas obtenido con los diferentes dispositivos comerciales en úlceras infectadas por las cepas ensayadas.....	147
Tabla 24. Porcentaje de pacientes, según sexo y edad, que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de plaquetas obtenido con Easy kit en úlceras infectadas por las cepas ensayadas	148

5.2. IMÁGENES

Figura 1. Amputación menor en paciente diabético. Fuente propia.....	41
Figura 2. Úlcera provocada por fractura dedo en garra. Fuente propia.....	43
Figura 3. Úlcera bajo tejido hiperqueratósico.....	44
Figura 4. Fracciones sanguíneas obtenidas tras centrifugación de la sangre periférica. Fuente propia.	51
Figura 5. Protocolo de extracción de plasma rico en plaquetas y leucocitos del sistema comercial Easy PRP. Fuente propia.....	79
Figura 6. Representación esquemática del proceso de preparación de PRP. Fuente propia.....	83
Figura 7. Concentrado de PMNs. Fuente propia.....	85
Figura 8. PMNs vistos por cuadrantes durante el recuento microscópico. Fuente propia.....	86
Figura 9. Preparación de las curvas experimentales. Fuente propia.....	87
Figura 10. Sembrado en las placas de las cepas propuestas frente a los PMNs y plaquetas. Fuente propia.....	90
Figura 11. Capacidad de los diferentes métodos para concentrar plaquetas y leucocitos de la sangre (relación PRP:SP)	97
Figura 12. Concentración de neutrófilos, linfocitos y monocitos ($\times 10^6$ / ml) en SP y en los productos finales obtenidos por los diferentes sistemas examinados	98
Figura 13. Recuento de células sanguíneas en SP y en los productos finales concentrados por el sistema Easy kit. A; Plaquetas. B; CBs.....	100
Figura 14. Factor de concentración de células (cociente PRP:SP) del sistema. En porcentaje se indica el cociente de variación.....	101
Figura 15. Factor de incremento de plaquetas y CBs (cociente PRP: SP) en los grupos control y de adultos mayores. Panel superior; plaquetas y CBs. Panel inferior; fracciones de CBs.....	105
Figura 16. Factor de incremento celular (cociente PRP:SP) en hombres y mujeres empelando Easy kit.	108

Figura 17. Relación entre el cociente PRP:SP con la densidad de la línea celular en SP (A; plaquetas y CBs. B; neutrofilos, linfocitos y monocitos) y con el CLR (C; neutrofilos, linfocitos o monocitos : CBs)	110
Figura 18. Factor de concentración celular (PRP: SP) en los grupos de sexo-edad con Easy-kit. Panel superior; hombres. Panel inferior; mujeres	114
Figura 19. Variabilidad en el recuento de bacterias de SASM y SARM entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con PMNs ...	118
Figura 20. Variabilidad en el recuento de bacterias de E. coli y P. aeruginosa entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con PMNs.....	119
Figura 21. Recuento medio de bacterias viables de SASM, SARM, E. coli y P. aeruginosa al comienzo y después de la incubación en las curvas control y en presencia de PMNs con suero sin inactivar e inactivado, agrupando a los tres sujetos que participaron en el estudio.	120
Figura 22. Variabilidad del efecto antimicrobiano observado en las curvas experimentales entre sujetos frente a P. aeruginosa. A modo de comparación se incluye la variabilidad sobre la cepa SASM	123
Figura 23. Efecto antimicrobiano medio, agrupando todos los sujetos, de los componentes del suero sin inactivar o inactivado frente a las cepas de ensayo	124
Figura 24. SASM. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	126
Figura 25. SARM. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	126
Figura 26. E. coli. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	127
Figura 27. P. aeruginosa. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	127
Figura 28 . Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las especies. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	129
Figura 29. Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las	

cepas de <i>S. aureus</i> . Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.....	130
Figura 30. Simulación de Montecarlo (n=1000 sujetos) a partir de los datos medios de neutrófilos obtenidos en los 26 voluntarios en el ensayo clínico con el dispositivo Easy kit.....	133
Figura 31. Variabilidad en el recuento de bacterias entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con plaquetas.....	138
Figura 32. Recuento medio de bacterias viables al comienzo y después de la incubación en las curvas control y en presencia de plaquetas agrupando a los tres sujetos que participaron en el estudio.....	139
Figura 33. Efecto antimicrobiano medio, agrupando todos los sujetos, en presencia y ausencia de plaquetas frente a las cepas ensayadas.....	141
Figura 34. Modelado dosis respuestas para <i>S. aureus</i> . A; MSSA. B; MRSA. C; Mu3. D; Mu-50.....	143
Figura 35. Modelado dosis respuesta para cepas diferentes de <i>S. aureus</i> . A; <i>E. coli</i> . B; <i>P. aeruginosa</i>	144
Figura 36. Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las especies.....	144
Figura 37. Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las cepas de <i>S. aureus</i>	144
Figura 38. Simulación de Montecarlo (n=1000 sujetos) a partir de los datos medios de plaquetas obtenidos en los 26 voluntarios en el ensayo clínico con el dispositivo Easy kit.....	146

5.3. ABREVIATURAS

Úlceras de pie diabético infectadas (UPDI)
Plasma rico en plaquetas (PRP)
Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (LRPRP)
Organización Mundial de la Salud (OMS)
Diabetes Mellitus (DM)
Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)
Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)
MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)
Cetoacidosis diabética (CAD)
Internacional Working of The Diabetic Foot (IWGDF)
Úlceras de pie diabético (UPD)
Asociación americana de diabetes (ADA)
Índice tobillo brazo (ITB)
Perfusión, extensión, profundidad, infección y sensibilidad (PEDIS)
Infectious Diseases Society of America's (IDSA)
Estafilococos coagulasa negativos (ECN)
S. aureus resistentes a meticilina (SARM)
Preparado Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)
Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento (PRPGF)
Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)
Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (LPPRP)
Factores de crecimiento (FC)
CaCl₂ (cloruro de calcio)
Leucocitos polimorfonucleares (PMNs)
Virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH)
Etilendiaminotetraacético (EDTA)
Leucocitos (CBs)
Desviación estándar (DE)
Rango intercuartílico (RI)

Sangre perriférica (SP)

T-student's (T-test)

U de Mann-Whitney (U-test)

Staphylococcus aureus sensible a meticilina (SASM)

Unidades formadoras de colonias (UFC)

Concentración (C)

Logaritmos (Log)

Suma de cuadrados (SS)

Grados de libertad (DF)

Indice de masa corporal (IMC)

Coficiente neutrofilos, linfocitos o monocitos (CLR)

Inmunoglobulinas (Ig)

6. INTRODUCCIÓN

6.1. DIABETES MELLITUS

6.1.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la diabetes como una alteración metabólica principalmente caracterizada por una elevación de la glucemia y por complicaciones microvasculares y cardiovasculares que reducen la calidad de vida por el aumento sustancial de la morbilidad y la mortalidad asociada con la enfermedad (1).

Las causas pueden producir DM son la alteración de la acción de la insulina o los defectos de secreción o ambas, y se clasifica en las siguientes categorías generales:

- Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1): debido a la destrucción de las células β pancreáticas, produce la ausencia absoluta de insulina.
- Autoinmunitaria. Representa el 5-10% de las personas con diabetes.
- Idiopática
- Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2): debida a un defecto progresivo en la secreción de insulina sobre una resistencia a la insulina.
- Otros tipos específicos de diabetes:
- Defectos genéticos en las células β : defectos monogénicos en la función de las células β , mutaciones de transmisión autosómica dominante que alteran la secreción de insulina. Son conocidas como formas MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young).
- Defectos genéticos en la acción de la insulina: Resistencia a la insulina tipo A, Leprechaunismo, Síndrome de Rabson-Mendenhall.
- Inducidas por fármacos o sustancias químicas: glucocorticoides, interferón-alfa, pentamidina, ácido nicotínico, diazóxido, tiazidas, hidantoínas, hormona tiroidea, agonistas beta-adrenérgicos, antipsicóticos atípicos, vacor (raticida)...
- Infecciones: rubeola congénita, citomegalovirus.
- Otros síndromes genéticos asociados con diabetes: síndrome de Down, síndrome de Klinefelter y síndrome de Turner entre otros.
- Enfermedades pancreáticas exocrinas: pancreatitis, traumatismo, pancreatectomía, neoplasia, fibrosis quística, hemocromatosis, pancreatopatía fibrocalculosa...

- Endocrinopatías: Síndrome de Cushing, acromegalias, feocromocitoma, glucagonoma, hipertiroidismo, somatostatinoma, aldosteronoma
- Diabetes Mellitus Gestacional: diabetes diagnosticada en el embarazo, que suele corregirse tras el parto, pero a pesar de su corrección riesgo elevado de sufrir DM2 franca en el futuro (2,3).

6.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

La OMS estima que, globalmente, el número de personas que padece diabetes se ha incrementado sustancialmente entre 1980 y 2014, pasando de 108 a 422 millones de adultos mayores de 18 años. La prevalencia global de la diabetes ha aumentado desde el 4,7% en 1980 al 8,5% en 2014 (4). Este aumento constante es debido al crecimiento de la población, el aumento de la esperanza de vida y el aumento del riesgo de desarrollar DM2 con la edad avanzada (5).

La diabetes causa la muerte de 1,5 millones de personas en el mundo, el 3% de las muertes en España son causadas por la diabetes (4).

6.1.3. COMPLICACIONES

6.1.3.1. *Complicaciones de la piel*

Los pacientes con diabetes están más predispuestos a padecer enfermedades dérmicas como; infecciones bacterianas, infecciones por hongos y picazón, además de padecer enfermedades dérmicas que les afectan únicamente como la dermatopatía diabética, necrobiosis lipídica diabetorum, ampollas diabéticas y xantomatosis eruptiva (6).

6.1.3.2. *Complicaciones oculares*

Las personas con diabetes tipo 1 y tipo 2 presentan un mayor riesgo de complicaciones oculares y neuropatía periférica. Las afecciones principales son el glaucoma, las cataratas, la retinopatía proliferativa, la no proliferativa y el edema macular (7).

6.1.3.3. *Neuropatía*

La neuropatía diabética, degeneración que causa en los nervios la diabetes afecta aproximadamente la mitad de todas las personas con diabetes. Esta neuropatía puede afectar a cualquier nervio corporal o provocar una neuropatía periférica o neuropatía autonómica (8).

6.1.3.4. *Cetoacidosis*

La cetoacidosis diabética (CAD) es una complicación grave que puede desembocar en coma diabético o incluso la muerte de la persona.

Esta complicación aparece cuando existe un déficit de insulina y las células no obtienen la glucosa que necesitan para obtener energía, se comienza a producir una combustión de grasa para la obtención de energía, lo que produce cetonas, sustancias químicas producto de la descomposición de la grasa para ser usada como energía. Cuando se produce una acumulación de cetonas en sangre, se produce la CAD (9).

6.1.3.5. *Nefropatía*

Los riñones a través de las nefronas filtran la sangre eliminando las sustancias de deshecho. La diabetes provoca el engrosamiento de estas nefronas que pierden su capacidad de filtración, lo que desemboca en una enfermedad renal (10).

6.2. PIE DIABÉTICO

El Documento de Consenso Internacional de Pie Diabético del año 2007, editado por el Internacional Working of The Diabetic Foot (IWGDF) define el pie diabético como la infección, ulceración y destrucción de los tejidos profundos, asociado a anomalías neurológicas (pérdida de sensibilidad al dolor) y vasculopatía periférica de diversa gravedad en las extremidades inferiores, resultante de la interacción de diferentes factores inducidos por una hiperglucemia mantenida y no controlada.

Las úlceras de pie diabético (UPD) se desarrollan en un 15 a 25% de los pacientes con DM y aproximadamente el 15-20% de esos pacientes requieren amputaciones como vemos en la figura 1 (11) esto provoca que sea una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el paciente con diabetes. El pie diabético es consecuencia tanto de complicaciones microvasculares (neuropatía) como macrovasculares (enfermedad arterial periférica) juntas o por separado. Las deformidades en el pie (tanto anatómicas como funcionales) e infecciones también tienen un papel importante para el riesgo de ulceración de estos pacientes (12).

Según la ADA, el riesgo de úlcera o amputaciones está incrementando en personas con factores de riesgo como: pobre control glucémico, neuropatía periférica, tabaquismo, deformidad en el pie, heloma preulcerativo, antecedente de úlcera y/o amputación, enfermedad vascular periférica y enfermedad renal (especialmente pacientes en programa de diálisis) (12).

6.2.1. LA NEUROPATÍA DIABÉTICA

La neuropatía diabética es considerada el factor principal en la aparición de úlceras diabéticas (13). Afecta al 50% de los pacientes con más de 15 años de evolución (14). La neuropatía aumenta con la edad y el tiempo de evolución de la enfermedad, y estos pacientes tienen tres veces más de riesgo de sufrir ulceraciones (15).

Figura 1. Amputación menor en paciente diabético. Fuente propia.



La clasificación de la neuropatía está basada en el conjunto de alteraciones del sistema nervioso periférico producido por la hiperglucemia mantenida, la más utilizada desde 1997 es la propuesta por Thomas:

- Simétricas: Relineuropatía sensitiva motora, neuropatía autónoma, neuropatía proximal simétrica de las extremidades inferiores.
- Focal y múltiple: Neuropatía craneal, Mononeuropatía múltiple (reticulopatía diabética) y de las extremidades.
- Mixtas (16).

Los síntomas más frecuentes son; la disminución de la sensibilidad, la hipostesia o la anestesia. Para diagnosticarlos es necesaria una exploración sensitiva que estudie la sensibilidad táctil superficial, profunda, vibratoria y térmica (17).

Además, la neuropatía genera alteraciones biomecánicas que descompensan la marcha, estas derivan en desequilibrios musculares, atrofia y deformidades en el pie que limitan la movilidad y aumentan la presión (18).

Los síntomas de la neuropatía vienen determinados por una disfunción nerviosa periférica que cursa con ardor o dolor tipo quemazón, dolor punzante, calambres, adormecimiento, hormigueo, anodinia o hiperalgesia y sensaciones anormales de frío y calor (19).

6.2.2. LA ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA

La oclusión es infrainguinal y tiene una afectación extensa en arterias tibiales, conservando la femoral superficial y poplítea generalmente y con arterias pedias y peronea distal permeables, así como las plantares. La femoral profunda a nivel proximal también presenta afectación (20).

La enfermedad vascular es un agravante del pie diabético, se ha clasificado en macro y microangiopática. En la microangiopatía aparece un engrosamiento de la membrana basal afectando los procesos celulares y aumentando la permeabilidad capilar provocando trastornos en la respuesta inflamatoria y de inmunidad específica (21).

El método no invasivo más utilizado para detectar la enfermedad es el índice tobillo-brazo (22), los valores normales se encuentran entre 0,91-1,3; valores menores o iguales a 0,90 son sugestivos de afectación vascular, valores de entre 0,41-0,90 indican enfermedad arterial periférica leve- moderada, mientras que valores por debajo de 0,41 indican enfermedad arterial periférica grave, aunque hay que tener en cuenta que la calcificación arterial, eleva anormalmente el ITB por la falta de compresión (22).

6.2.3. INFECCIÓN

La infección actúa como agravante de las úlceras de pie diabético, cuando esta aparece peligra el miembro y hasta la vida del paciente (23).

Las características de una úlcera infectada son; mal olor, isquemia local, dolor aumentado, secreción purulenta, calor, rubor, dolor o induración y cavitación.

No todas las características indica infección, pero su presencia puede sugerir la gravedad de la misma (24).

6. Introducción

La infección afecta tanto a los tejidos blandos como a los óseos (osteomielitis) y puede evolucionar hacia una necrosis. Entre el 50- 60% de las infecciones de UPD cursan con osteomielitis, y de ellas un 10-30% acabarán en amputación (25).

6.2.4. ALTERACIONES BIOMECÁNICAS

La alteración de la distribución de las presiones es el causante del aumento de presión sobre zonas con riesgo de ulceración. El dedo en martillo y el hallux valgus provocan cambios estructurales del pie y con ello aumento de las zonas de presión, que relacionado con la neuropatía diabética aumentan el riesgo de ulceración como vemos en la figura 2 (26).

Figura 2. *Úlcera provocada por fractura dedo en garra. Fuente propia.*



Las deformidades digitales están provocadas por desequilibrios musculares y los cambios estructurales (26,27) junto a este desequilibrio aparece también un aumento de la actividad osteoclástica que ocasiona reabsorción ósea y atrofia (27), la disminución de la movilidad articular unida a las deformidades óseas y los aumentos de presión en zonas no preparadas aumentan la sobrecarga y conllevan a la aparición de hiperqueratosis y con ellas el riesgo de aparición de úlceras neuropáticas como vemos en la figura 3 (28).

Figura 3. *Úlcera bajo tejido hiperqueratósico.*



6.2.5. LESIONES DE PIE DIABÉTICO

Las lesiones del pie diabético vienen determinadas por:

- Neuropatías 55%
- Isquemia 10%
- Neuroisquemia 35% (29).

Atendiendo al origen fisiopatológico, las lesiones presentan características muy particulares (tabla 1).

Tabla 1. *Características de las lesiones de pie diabético:*

	NEUROPÁTICA	NEUROISQUÉMICA	ISQUÉMICA
Sensibilidad	Afectada	Afectada	Intacta
Localización	Áreas de presión	Periférica	Periférica
Piel perilesional	Hiperqueratosis	Sana o frágil a plano	Frágil a plano / Cianosis
Lecho	Tejido granulación / Esfacelo	Esfacelo / pálido	Pálido / necrótico
Coloración	Normal / hiperémico	Palidez/ Cianosis	Palidez / Cianosis
Temperatura	Normal	Normal/ Disminuída	Disminuída
Raspado	Sangra	No sangra o muy leve	No sangra/muy leve
Dolor	No	No	Si
Pulsos	Conservados	Ausentes	Ausentes

6.2.6. ÚLCERAS DE PIE DIABÉTICO

Se considera úlcera de pie diabético aquella alteración clínica de base etiopatogénica neuropática, conducida por la hiperglucemia conservada, en la que con o sin coexistencia de isquemia y previo desencadenante traumático, se produce lesión y/o úlcera en el pie (30).

El riesgo del pie diabético viene determinado por la isquemia, la infección y la gravedad de la úlcera. En 1970, el Dr. Wagner, con el objetivo de unificar criterios, estableció por primera vez una clasificación del pie diabético para evaluar el diagnóstico y tratamiento de las lesiones.

- Grado 0: corresponde al paciente con ausencia de úlceras en un pie con alto riesgo.
- Grado 1: se refiere a una úlcera superficial que afecta a todo el espesor de la piel, pero no a tejidos subyacentes.
- Grado 2: cuando el pie tiene úlceras profundas, llegando a penetrar en los ligamentos y en los músculos, pero sin comprometer el hueso o la formación de abscesos.
- Grado 3: úlcera profunda con formación de abscesos y afectación ósea.
- Grado 4: gangrena localizada.
- Grado 5: gangrena extensa o difusa que compromete todo el pie (31).

En la actualidad, por su sencillez y reconocimiento internacional son de elección las clasificaciones establecidas de la International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF); editadas bajo el acrónimo PEDIS, siglas en inglés que se corresponden a perfusión, extensión, profundidad, infección y sensibilidad, y de la Infectious Diseases Society of America's (IDSA). Ambas establecen, tomando como referencia la presencia de infección, neuropatía, tamaño de la úlcera y profundidad, una gradación de la severidad de la infección de la úlcera de pie de diabético.

La infección es una de las mayores complicaciones de la úlcera de pie diabético (UPD), el 58% de las UPD presentan infección, que es la mayor causa de ingreso hospitalario del paciente diabético y causa dos tercios de las amputaciones de miembros inferiores (32–34).

El diagnóstico de una úlcera diabética infectada (UPDI), se base en la presencia de secreción purulenta o al menos dos de los principales signos clínicos de inflamación; rubor, calor, tumefacción, induración, mal olor, edema, linfangitis, linfadenitis regional, crepitación y dolor, aunque sería suficiente la presencia de secreción purulenta para el diagnóstico de la UPDI (35).

Las heridas agudas se encuentran habitualmente colonizadas por cocos aeróbicos gram-positivos, como *S. aureus*, especies de estafilococos coagulasa negativos (ECN) y estreptococos β hemolíticos (35) y es factible que evolucionen a infecciones monomicrobianas (36,37). En cambio, las úlceras diabéticas crónicas presentan una flora más compleja constituida por múltiples especies de organismos anaeróbicos y aeróbicos que interactúan cooperativamente y como un todo en el desarrollo y progreso en profundidad de la infección (36,37). En las UPDI crónicas es habitual el aislamiento de anaerobios estrictos, enterococos, enterobacterias *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores (37,38). En pacientes con úlceras crónicas y bajo sucesivos ciclos de tratamiento, la resistencia de las especies colonizadoras a los antimicrobianos es un aspecto diferencial, siendo frecuente el aislamiento de variantes de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), enterococos resistentes a vancomicina y bacilos gramnegativos multirresistentes (39).

La presencia de *S. aureus* en cualquiera de los estadios de intensidad de la UPDI no es casual. El *S. aureus* es uno de los microorganismos estafilococos predominantes en la flora normal de los individuos diabéticos a diferencia de los no diabéticos que se encuentran pobremente u ocasionalmente colonizados por esta especie. De hecho el *S. aureus* juega un papel relevante en la patología ya que presenta determinantes de patogenicidad que colaboran favorablemente en el establecimiento de los organismos menos virulentos, que en circunstancias normales difícilmente podrían infectar las úlceras. Esto junto con los tratamientos antimicrobianos prolongados y crónicos en el paciente diabético, contribuye al progresivo aislamiento de cepas multirresistentes a los antimicrobianos. La prevalencia de cepas con resistencia a meticilina (SARM) en muchos entornos sanitarios es ya superior al 50% y progresivamente se está extendiendo hacia otras clases de antimicrobianos. El caso de la vancomicina es el más destacado. Se trata de un glucopéptido de amplio uso en el ámbito hospitalario considerado durante décadas tratamiento universal frente a muchas especies de microorganismos Gram positivos. No obstante el abuso de vancomicina en el medio hospitalario ha conducido a la aparición y diseminación de variantes de *S. aureus* que no responden al tratamiento empleando dosis convencionales. Un ejemplo se encuentra en la diseminación de las cepas de *S. aureus* Mu-3 y Mu-50 que por su manifiesta resistencia a la vancomicina han sido utilizadas como cepas de referencia en el estudio de la resistencia a vancomicina. La cepa Mu-3 se caracteriza por presentar resistencia heterogénea a vancomicina. Esto es una resistencia no detectada por las pruebas de sensibilidad convencionales y que es

debida al aislamiento de variantes con baja frecuencia de mutación. La cepa Mu-50 se caracteriza por una resistencia de nivel intermedio a vancomicina, detectable en las pruebas de sensibilidad y consecuencia de una mayor frecuencia de mutación de la cepa. Hasta la fecha los casos de resistencia a vancomicina son puntuales.

6.2.6.1. *Tratamiento úlcera de pie diabético*

El proceso de curación de una UPD es complejo y dinámico pero es fácil que esta se haga crónica (40). Las fases en el proceso de curación o cicatrización son 3: inflamación, formación de tejido o proliferativa y remodelación de la cicatriz. (41). Los métodos tradicionales de cura de úlceras no funcionan de la misma manera en las UPD, dado que presentan en su fisiopatología una deficiencia de factores de crecimiento y otras sustancias biológicas que ralentizan el proceso de curación (42). El proceso proinflamatorio que se crea en la herida afecta a su curación debido a la alta actividad de proteasa, que disminuye la concentración de factores de crecimiento (42).

Las UPD causan un gran impacto tanto a nivel individual como profesional y social, y conllevan un alto coste humano y material (40). La incidencia de las UPD se espera que con el paso de los años vaya aumentando, debido al incremento de la edad de la población y las complicaciones de la diabetes (41).

Para desarrollar correctamente el tratamiento de las úlceras es necesario realizar la valoración del paciente identificando qué tipo de úlcera es y posteriormente clasificándola en qué momento del proceso curativo se encuentra (43):

- Fase I: Desbridamiento y limpieza: se observa tejido necrótico en forma de escara o esfacelo.
- Fase II: Granulación: aspecto rojo brillante del lecho.
- Fase III: Aspecto rosa aperlado del lecho (43).

Los tipos de cura convencionales son:

1. Cura seca: se basa en la colocación de gasas directamente sobre la herida, cuya función principal es proteger y absorber eficazmente, pero cuentan con el inconveniente de que cuando se secan se pegan a la herida provocando dolor cuando se cambia el apósito, por lo que tiene que cambiarse con frecuencia. Se pueden utilizar solos o junto con antisépticos y antibacterianos, con cremas enzimáticas o bien junto con apósitos de gasa impregnados (43).

2. Cura húmeda: favorece la granulación y la epitelización, creando un ambiente fisiológico de humedad y temperatura que evita el dolor. Pueden mantenerse más de 24 horas sin cambiarse. Existen números apósitos para este tipo de cura como son los apósitos hidrocoloides (impermeables al oxígeno y al agua), apósitos de film de poliuretano (impermeables a las bacterias y al agua), apósitos de alginato cálcico (contraindicados en úlceras no exudativas o en los casos de alergia a los alginatos), apósitos de carbón activado (43).

Estas medidas de sostén deben ser compaginadas con la instauración de antibioterapia cuando existan signos evidentes de infección en las úlceras (33). Dada su etiología más probable, las úlceras agudas con signos clínicos de infección pueden ser tratadas empíricamente con antimicrobianos de amplio espectro. En unidades con alta prevalencia de SARM o en pacientes con tratamientos antimicrobianos previos, las úlceras agudas infectadas así como las infecciones crónicas deben tratarse de acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo microbiológico (33). Normalmente la terapia debe inexorablemente incluir, especialmente en las úlceras crónicas, una combinación de agentes antibacterianos dada la multitud de agentes que se aíslan en los cultivos y pueden encontrarse directamente implicados en los signos síntomas del cuadro infeccioso (33).

A este respecto es importante destacar, que las úlceras crónicas revisten un problema sanitario añadido como consecuencia de la carga de tratamiento antimicrobiano que soportan estos pacientes a lo largo de sus vidas. La resistencia a los antimicrobianos disminuye la eficacia del tratamiento y facilita la perpetuación del cuadro y el consecuente aumento de complicaciones que normalmente conducen a la amputación mayor del miembro afectado (33,44). De forma añadida, la peculiar forma de colonización en biofilm del conglomerado de microorganismos presentes en las úlceras crónicas supone una fuerte resistencia física al tratamiento y se asocia con déficit de cicatrización de la úlcera infectada (45).

6.2. SANGRE ENTERA

Un individuo adulto tiene una volemia media de 5-6 litros de sangre. La sangre está compuesta por diferentes líneas de células que se producen en la médula ósea y pasan al torrente sanguíneo para cumplir su función (46). La composición celular o hemograma está condicionado por el sexo y la edad y puede sufrir alteraciones durante el embarazo (47). Un hemograma tipo, presenta un valor medio de eritrocitos de entre $4,8$ y $5,5 \times 10^9$ / ml, de $150-450 \times 10^6$ plaquetas/ml y de aproximadamente $7,8 \times 10^6$ células blancas/ml. La fracción blanca está mayoritariamente representada por neutrófilos (55-70%), seguida por linfocitos (17-45%), monocitos (2-8%) y otros leucocitos como eosinófilos y basófilos (<4%) (48).

El hemograma del paciente diabético presenta características particulares producto de la hiperglucemia crónica. Aproximadamente el 20% de los sujetos refleja anemia eritrocítica en el hemograma. La prevalencia aumenta en sujetos con función renal alterada como consecuencia del daño que la hiperglucemia continuada produce en el túbulo renal, que entre otras alteraciones, modifica la respuesta de la eritropoyetina al control de la masa eritrocítica. La anemia en sí, se relaciona con la progresión de las complicaciones microvasculares y la neuropatía. El estudio de los glóbulos blancos del paciente diabético refleja un recuento leucocitario elevado, indicador de la inflamación crónica endotelial y anormalidades funcionales del sistema inmunológico como mayor agregación plaquetaria, disminución de la adherencia y quimiotaxis de neutrófilos al endotelio vascular y una menor respuesta de las células T citotóxicas. Estas alteraciones son más sensibles de apreciar en los pacientes diabéticos con hiperglucemia crónica no controlada (49).

6.3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

6.3.1. DEFINICIÓN

El PRP se define como un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas por encima de la sangre basal (SB), pero no existe una especificación clara de las densidades requeridas para la efectividad, que varía según los estudios > 200 a 1000×10^6 células / ml (50,51).

El PRP se obtiene separando capas concentradas de células sanguíneas por centrifugación, que según el método, estará compuesto por una concentración variable de plaquetas, células blancas y proteínas hemodinámicamente activas (52–54).

6.3.2. APLICACIONES

El término de PRP se acuñó por primera vez en el campo de la hematología en la década de los 70 para referirse a la fracción de plasma con una concentración superior de plaquetas al de la sangre en circulación, y fue utilizado para el tratamiento de la trombocitopenia. Posteriormente, a medida que se fueron descubriendo sus propiedades y posibles usos, comenzó a ser usado en cirugía facial para reducir la inflamación, la hemorragia y estimular la proliferación de células (55).

La terapia PRP ha ganado popularidad en las últimas dos décadas en varias modalidades médicas como medicina deportiva, ortopédica, cirugía general, cirugía restauradora dental y maxilofacial y en estética (56–61). Los usos más recientes los encontramos en el campo de la dermatología, cura de heridas, regeneración de tejidos y rejuvenecimiento de la piel (55), se ha introducido como un método coadyuvante para el tratamiento de las úlceras del pie diabético (UPD) con resultados satisfactorios que fomentan el desarrollo de nuevas investigaciones en este campo (62–64).

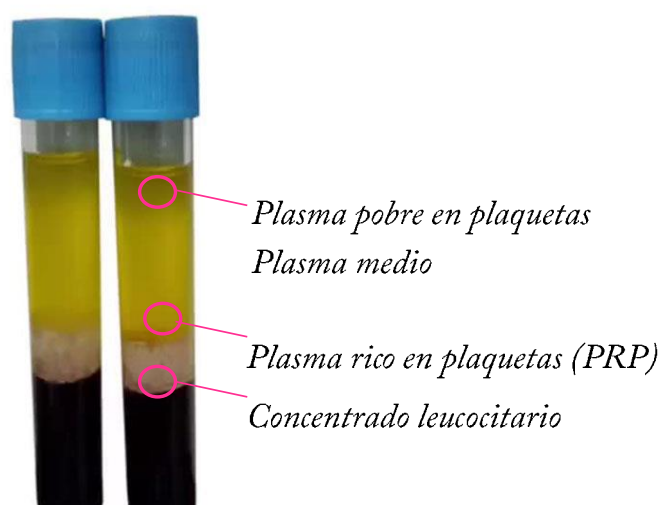
En las UPD, el tratamiento con PRP se ha venido utilizando como un complemento muy útil en la cura de las mismas, incluidas las que presentan enfermedad arterial irreparable, (65) cabe destacar que es un tratamiento simple, seguro y económico que arroja muy buenos resultados tras el tratamiento (62). Entre las posibilidades que

existen en el preparado del PRP, podemos encontrarlo en forma de gel con trombina y activado con cloruro cálcico, llegando incluso esté preparado a prevenir la infección en las úlceras diabéticas limpias (66,67), otra opción de cura que ha sido probada con buenos resultados es la impregnación de apósitos (68), al igual que la infiltración perilesional del concentrado, que ha demostrado buenos resultados incluso en UPD no revascularizables (69). Además se ha comprobado que el PRP reduce el dolor neurológico y neuropático de estas lesiones (70,71). Por todo ello existe un consenso en que el uso de plasma rico en plaquetas produce una tasa de curación superior a las conseguidas con otras terapias (72), aunque se ha determinado la necesidad de estandarizar la obtención de PRP (73).

6.3.3. PREPARACIÓN DEL PRP

La preparación del PRP se llevará a cabo mediante centrifugación de la sangre del paciente obtenida por venopunción. Existen varias docenas de sistemas comerciales cerrados y varios métodos abiertos o semicerrados para obtener PRP, guiados por tantos otros protocolos de preparación (52,53). El producto concentrado final es altamente susceptible a las condiciones de centrifugación y a la fisonomía del dispositivo, por lo que diferentes sistemas dan como resultado fuertes disparidades en la concentración y composición celular y bioquímica del PRP (52,53,74–76).

Figura 4. Fracciones sanguíneas obtenidas tras centrifugación de la sangre periférica. Fuente propia.



En líneas generales tras la centrifugación, la sangre periférica se diferencia en capas concentradas de células sanguíneas en función de la densidad de cada fracción: la capa inferior (densidad 1,09), compuesta por glóbulos rojos; la capa media (densidad 1,06), compuesta por glóbulos blancos y plaquetas, y la capa superior (densidad 1,03), compuesta por plasma.

La capa plasmática, a su vez, se divide en 3 fracciones en función de la cantidad de plaquetas presentes: una fracción pobre en plaquetas en la zona superior, la fracción intermedia con una concentración media de plaquetas en una zona intermedia, y la fracción rica en plaquetas en la zona inferior justo por encima del “buffy coat” o capa leucocitaria, que aparece por encima de los eritrocitos, situados en la zona inferior del dispositivo (77).

La obtención del PRP se lleva a cabo mediante “técnicas cerradas” o mediante “técnicas abiertas o semi-cerradas”. La técnica cerrada ha supuesto un significativo avance para la implementación de la infiltración autóloga de PRP en distintas disciplinas médicas. Se desarrolla utilizando dispositivos comerciales o kits. Disponen de reservorios de alta capacidad que permiten procesar altos volúmenes de sangre y una fisionomía particular que facilita la separación y concentración de las diferentes fracciones sanguíneas. En estos sistemas es relativamente sencillo, aunque dependiente del dispositivo, intuir y extraer las fracciones de sangre resultantes tras la centrifugación de la muestra. Son sistemas que sensiblemente reducen la manipulación directa de la muestra, disminuyen la contaminación potencial de los preparados finales y facilitan la rutina clínica. El instrumental adicional que se requiere es muy reducido y está al alcance de cualquier centro de atención médica (78–80).

La técnica abierta se realiza utilizando series de tubos de extracción de sangre anticoagulados. Es una técnica sujeta a una fuerte manipulación de la muestra y no está exenta de riesgo de contaminación. El equipo de laboratorio es más complejo tanto por los equipos de centrifugación que se requieren como por el resto de instrumental de laboratorio accesorio que es necesario para llevar a cabo la preparación del PRP en condiciones de máxima asepsia y seguridad (78–80).

La técnica cerrada se desarrolla siguiendo las estrictas recomendaciones del fabricante ya que son las que se presuponen conducen a una mayor eficiencia. No existe un protocolo de trabajo común que de forma general consistiría en; la extracción de sangre del paciente en el sistema previa incorporación de los aditivos, centrifugación de acuerdo a los parámetros particulares diseñados por el fabricante, la visualización de las fracciones obtenidas y

la extracción del PRP. El principal inconveniente es su elevado coste económico (78,79).

Para las técnicas abiertas o semi-cerradas hay descritos diferentes protocolos para la obtención de PRP, sin un acuerdo definido en cuanto a los pasos que deben seguirse para conseguir un producto final óptimo. Los diferentes métodos de obtención de PRP se fundamentan bien en uno o dos procesos secuenciales de centrifugación. Se emplean volúmenes de sangre dispares que complican la comparación entre métodos así como parámetros de centrifugación variables tanto en la aceleración como en el tiempo de centrifugado (81,82), que por lo general conducen a una importante variabilidad de productos finales. En líneas generales, la extracción de la sangre se desarrolla sobre la base de series de tubos anticoagulados. Tras la centrifugación de la muestra, la separación de las principales fracciones, glóbulos rojos, PRP y plasma pobre en plaquetas [PPP], es arbitraria (83). Aunque resulta coste-efectivo, el principal inconveniente es el riesgo de contaminación de los productos finales (83).

Dependiendo del sistema empleado, la composición del concentrado preparado puede variar así como las concentraciones de plaquetas, leucocitos, eritrocitos, y factores de crecimiento obtenidos (78):

- Preparado Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)
- Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento (PRPGF)
- Plasma Rico en Plaquetas (PRP)
- Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)
- Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (LRPRP)
- Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (LPPRP) (78)

Dentro de esta técnica de obtención va a variar el tiempo de procesamiento, rendimiento, facilidad de uso y % recuperación de plaquetas dependiendo de la tecnología empleada por los distintos sistemas comerciales (84).

La obtención del PRP depende del dispositivo utilizado, cada uno de ellos tiene unas instrucciones de utilización diferentes en las que puede variar el número de centrifugaciones necesarias, los mililitros de sangre extraída, la centrifugadora a utilizar, el tiempo de centrifugación y la velocidad (83).

Las concentraciones del PRP también varían según los dispositivos que se usen, por lo tanto, también es difícil exponer cuáles el más eficaz. De hecho, aún no existe un consenso sobre cuál es la mejor manera de aplicar el PRP, el volumen ideal a utilizar, la frecuencia de la aplicación, el sitio exacto de uso, así como el sistema a utilizar (83).

Para poder evaluar la eficacia de la concentración de plaquetas, diremos que naturalmente en una herida, la sangre circulante tiene un 95% de las células rojas, un 4% de plaquetas y 1% de serie blanca, en cambio si colocamos un preparado autólogo de PRP, el número de plaquetas aumentará hasta un 95 %, las células rojas estarán en torno al 4%, y 1% corresponderá a la serie blanca (78).

6.3.4. COMPOSICIÓN DEL PRP:

6.3.4.1. *Plaquetas*

Las plaquetas también denominadas trombocitos son pequeños fragmentos de células sanguíneas de aproximadamente 2-3 μm de diámetro producidas por los megacariocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación plaquetaria, con una concentración normal en sangre (140-450 x 10^6 células/ml). El megacarioblasto requiere aproximadamente 5 días para diferenciarse y madurar para convertirse en plaqueta, con un promedio de vida media circulante de 7-10 días. Se destruyen por fagocitosis, principalmente en el bazo, hígado y médula ósea, a través del sistema retículo endotelial (85).

Durante los años que siguieron a la invención del microscopio, varios observadores reportaron la presencia de partículas en la sangre considerándose a Alfred Donné (1801-1878) como el primer autor que descubrió la presencia de plaquetas en la sangre, sin embargo, también se considera a George Gulliver (1804-1882) como autor del descubrimiento. Las plaquetas tienen un tamaño notablemente más pequeño que el de los eritrocitos y leucocitos, y por lo tanto, a consecuencia de su tamaño fue de los tres elementos formes de la sangre el último en ser descubierto (86).

En su estado fisiológico normal, las plaquetas se encuentran inactivas y circulan libremente por el torrente sanguíneo. Poseen la capacidad de adherirse a linfocitos, eritrocitos, etc, o se agrupan entre ellas formando un coágulo, por lo que desempeñan un papel fundamental en los procesos que evitan la hemorragia (hemostasis) y la formación de coágulos dentro del vaso sanguíneo (trombosis) (87).

- Mecanismo de acción:

Las plaquetas juegan un papel esencial al funcionar como vehículo portador de factores de crecimiento (FC) y de otras proteínas contenidas en sus gránulos alfa. La activación de las plaquetas también conocida como desgranulación tiene como función la liberación

de los factores de crecimiento contenidos en los gránulos alfa al espacio extracelular, este proceso precisa de un agente activador para poder llevarlo a cabo, como pueden ser CaCl_2 (cloruro de calcio) y/o trombina humana, sin embargo, cuando el PRP se destina a tratar lesiones de partes blandas no es necesaria la activación previa debido a que esta se produce in situ. Estos factores de crecimiento impactan sobre los receptores celulares del tejido diana, produciendo su estimulación con la consiguiente respuesta del tejido diana. Las proteínas contenidas en los gránulos de las plaquetas comienzan a ser secretadas efectivamente por las plaquetas a los 10 minutos de formarse el coágulo completando la secreción de más del 95% de los factores de crecimiento durante la siguiente hora, mientras se mantienen vivas durante 5-10 días (78,84).

Por lo que las plaquetas son las encargadas de liberar factores de crecimiento que desempeñan un papel esencial en la migración, diferenciación y proliferación celular, por lo que su principal función es estimular la regeneración de los tejidos dañados. Cabe destacar que a mayor concentración de plaquetas, los niveles de factor de crecimiento aumentarán en relación lineal con el número de las mismas (88).

- Funciones de las plaquetas:

Para entender las aplicaciones médicas del plasma autólogo rico en plaquetas es necesario comprender las funciones fisiológicas de estas pequeñas células sanguíneas.

1. Intervienen en el proceso inflamatorio: Las plaquetas son las responsables de liberar los factores que desencadenan la inflamación siendo importante para que otros componentes del sistema inmunológico se presenten en la cantidad y tiempo necesario para intervenir en la curación de la zona afectada, combatir posibles agentes dañinos y controlar el proceso de inflamación.
2. Intervienen en la reparación de heridas: Cuando existe una lesión que provoca sangrado, las plaquetas son activadas, viajan a la zona afectada, adhiriéndose a ella y formando, junto con otras proteínas que libera, el tapón plaquetario, y se forma el coágulo de fibrina impidiendo la pérdida de sangre, a esta acción se le conoce como hemostasia.
3. Ayudan a eliminar agentes patógenos: Los trombocitos tienen la capacidad de absorber y neutralizar diversos tipos de sustancias extrañas, aunque en menor medida que los leucocitos.
4. Favorecen la síntesis de proteínas.
5. Liberan factores de crecimiento.
6. Intervienen en la reparación (89).

Además, las plaquetas están involucradas en una respuesta de coagulación intravascular coordinada denominada “inmunotrombosis”. En el proceso, las plaquetas y las células inmunes forman una barrera física que evita la diseminación de patógenos y potencialmente conduce a la activación de las ramas innatas y adaptativas del sistema inmunológico (90,91), Existen indicios que sugieren que el PRP podría exhibir propiedades antiinfecciosas, mediadas por el reclutamiento de PMNs y la liberación de factores bactericidas (92).

6.3.4.2 Células blancas de sanguíneas

Las células blancas sanguíneas componen el 1% del volumen total sanguíneo, la principal función es la defensa frente a la infección.

Los leucocitos, presentan tres tipos de granulocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los más grandes son los neutrófilos, también llamados polimorfonucleares, son los más comunes, entorno al 50-60% de la CB. Son la primera línea de acción frente al daño tisular, aunque tienen un vida media de 4 días (93) , y su tamaño es de 10 a 14 mm (94), estos contienen un núcleo con de dos a cinco lóbulos conectados por un hilo fino de cromatina (94).

Los linfocitos ocupan el 30-40% del total de CB sanguíneas, son la primera línea de la respuesta inmunitaria e incluyen las células T, B y NK (93), tienen un tamaño de 7 a 8 mm, con un gran núcleo que apenas deja ver porción del citoplasma (95).

Y por último los monocitos, de mayor tamaño, 7 a 15 mm y de núcleo pleomórfico (94) migran desde el torrente sanguíneo al epitelio durante el daño tisular donde se transforman en macrófagos (93).

La inmunidad inespecífica está constituida por las barreras físico químicas del organismo o es desencadenada durante la respuesta inflamatoria a través de la acción de fagocitos, complemento, células NK e interferones. La inmunidad inespecífica se encarga del control de las primeras fases de la infección pero ni reconocen ni recuerdan a los agentes ajenos, aunque el contacto se repita en diferentes ocasiones (96).

La fagocitosis es llevada a cabo fundamentalmente por leucocitos polimorfonucleados, PMN, (neutrófilos maduros) y por macrófagos, células defensivas diferenciadas desde los monocitos. Durante la fagocitosis las células implicadas captan a las partículas o microorganismos del medio mediante la emisión de pseudopodos y las incorporan al interior celular formando un fagosoma, donde por la acción de enzimas líticas se destruye al agente externo (96).

Por el contrario, la inmunidad adquirida, llevada a cabo por los linfocitos, está caracterizada por el reconocimiento y recuerdo de antigénico y mediada por la producción de inmunoglobulinas (Ig) específicas, como efectores;. A esta inmunidad también se la conoce como inmunidad humoral (96).

Las Ig, al igual las proteínas del complemento (especialmente el fragmento C3), colaboran con el proceso de la fagocitosis de los neutrófilos mediante la opsonización. Tanto Ig como complemento, opsoninas, se fijan al microorganismo y facilitan el reconocimiento a los fagocitos. Esta contribución es particularmente importante si ha existido un contacto previo con el antígeno y complementará a la fagocitosis clásica. (96).

Los neutrófilos son las células predominantes en la sangre representando el 60 % de la reserva total de leucocitos. La concentración de neutrófilos en la sangre de los seres humanos sanos oscila entre 3 y 6 millones de células por ml (85,97,98) Son células de vida corta. Se diferencian en la médula ósea, circulan en la sangre de 8-12h, y luego entran en los tejidos donde realizan su función durante 2-5 días antes de morir (85,97,98). Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa contra las bacterias que invaden sangre y tejidos (85,97,98).

En los seres humanos que experimentan una infección bacteriana (por ejemplo, apendicitis), la concentración de neutrófilos en la sangre puede aumentar de forma aguda a 15-40 millones por ml (85,97,98). Por el contrario, determinados factores pueden reducir la concentración de neutrófilos circulantes en sangre en hasta 10 veces con respecto al parámetro habitual quedando el sujeto predispuesto a infecciones bacterianas y fúngicas que pueden amenazar su vida (85,97,98). A esta condición se la denomina neutropenia (99,100). La neutropenia aparece de forma espontánea en los recién nacidos y es una habitual en pacientes infectados con VIH y individuos en tratamiento con inmunosupresores o citotóxicos (101). Otros factores modificadores son el envejecimiento, que produce una disfunción de los neutrófilos (102), y la obesidad, que afecta negativamente a la respuesta inflamatoria (103). Los pacientes con malnutrición, anorexia, bulimia, asociados a déficit de vitamina D3, presentan frecuentemente leucopenia y reducción de la respuesta inflamatoria (104). En general el ejercicio físico mejora considerablemente la capacidad fagocitaria de los monocitos (105).

Hasta hace relativamente poco tiempo y en parte forzado por el sesgo metodológico de utilizar concentraciones fisiológicas de neutrófilos ($3-6 \times 10^6$ por ml) existía una fuerte evidencia que apoyaba que la actividad microbicida de los PMNs dependía del cociente establecido entre número bacterias patógenas y la densidad de PMN circulantes

(85,97,98). En condiciones fisiológicas normales y en presencia de opsoninas apropiadas (por ejemplo, IgG y complemento), un neutrófilo podría ingerir hasta 100 *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli* en 30 min, estableciendo que este cociente debía alcanzar la proporción de 100: 1 para garantizar un efecto microbicida (99,100).

No obstante la experiencia clínica desmiente este concepto teórico (106). Asumiendo incluso una situación de neutropenia en el paciente, el cociente PMN: bacteria en una bacteriemia que raramente supera una carga de bacterias por ml de 10^3 , dispondría de un cociente de entre 1:100-1:500. Teóricamente con este cociente los sistemas defensivos del individuo podrían controlar la progresión de la infección pero esto no ocurre (107,108). Estudios más recientes determinaron que la muerte bacteriana mediada por la acción de los PMN circulantes en sangre está determinada por una concentración crítica de PMN, independientemente de la densidad de microorganismos presentes y del cociente bacteria: PMN. Esta concentración crítica se ha estimado en 5×10^5 PMN/ml, coincidente con el estatus clínico que define la neutropenia (106).

La restauración de la concentración de neutrófilos, por ejemplo la transfusión de neutrófilos, ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de pacientes neutropénicos (109). Por ejemplo, más del 70 % de los pacientes neutropénicos que desarrollaron infecciones bacterianas mientras son sometidos a trasplante de culas madre, ha resuelto estas infecciones después de las transfusiones de neutrófilos y recuperaron la concentración de neutrófilos en la sangre a $\sim 2 \times 10^6$ por ml (109).

6.3.5. RESULTADOS DE LA TERAPIA PRP

Estudios recientes han reportado una amplia variabilidad de resultados clínicos con PRP o terapias de concentrados de sangre autólogos, cuestionando el uso de esta técnica de tratamiento para resolver todas las indicaciones propuestas (110-112).

Un metaanálisis reciente de 33 ensayos aleatorizados y estudios de cohortes prospectivos encontró poca evidencia para apoyar el uso de PRP en lesiones ortopédicas de huesos y tejidos blandos (112), sin embargo, existen otros estudios que si afirman un beneficio significativo (111). La dramática falta de coherencia en las medidas de resultado primarias entre los estudios es importante para comprender parte de estas discrepancias (110,112).

Además, también se han sugerido variaciones intraindividuales ya que un sistema dado proporciona diferentes rendimientos y productos finales para el mismo individuo cuando

las preparaciones se repiten en el tiempo siguiendo un protocolo de trabajo estandarizado (53,113,114) y, lo que es más importante, la variabilidad entre sujetos también afectan la calidad del PRP obtenido. Las variaciones entre sujetos son más complejas y, a menudo, se relacionan con el envejecimiento natural, el sexo o la presencia de enfermedades subyacentes (54,81,115,116).

Es ampliamente conocido que el envejecimiento tiene una influencia negativa en la respuesta a la curación y en la degeneración de los tejidos elásticos (117). Los marcadores moleculares protectores disminuyen con la edad (81,115) y más marcadamente en los hombres que en las mujeres (118) destacando una relación entre el dimorfismo hormonal; a través de la regulación diferencial de la expresión de múltiples factores de crecimiento y la ocurrencia de estos eventos (119,120). Los estrógenos ralentizan los efectos del envejecimiento que se vuelven más notorios después de la menopausia (119). Este dimorfismo hormonal también conlleva un dimorfismo inmunológico (116,121,122) asociado con la expresión diferencial de los receptores de citocinas (123) y una predisposición diferente por género a las enfermedades (123,124).

Estas inconsistencias en la eficacia del PRP no son del todo sorprendentes dado que el contenido óptimo de PRP permanece indefinido y la falta de comprensión con respecto al contenido real del producto final preparado, lo que hace que no todas las preparaciones de PRP sean igualmente efectivas según el uso clínico previsto (53,125). Por ejemplo, el número de glóbulos blancos en las preparaciones de PRP difiere significativamente (53) los efectos de los glóbulos blancos en la regeneración tisular después de una lesión son controvertidos (53,125).

La variabilidad biológica de las concentraciones de plaquetas y leucocitos entre los individuos por varias causas también puede contribuir a la eficacia de la terapia con PRP, pero esta correlación ha sido poco explorada (126). Varios estudios destacan que la co-infiltración de leucocitos proporciona propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras y mejora el contenido proteómico del PRP (75,127).

El recuento de leucocitos en las muestras de PRP se ha ignorado con frecuencia y muy pocos estudios han examinado esta fracción en el PRP (52,53,75,128), en gran parte porque la presencia de leucocitos en los productos finales depende del sistema de extracción y las condiciones de centrifugación utilizadas (52,53,74,75). Incluso menos exhaustivo ha sido el análisis sistemático de la composición de los glóbulos blancos en los leucocitos concentrados (53,128).

La coadministración de leucocitos como adyuvante del PRP es controvertida (53,75,127). Los glóbulos blancos pueden inducir inflamación local e impedir la recuperación del tejido en procedimientos específicos como la regeneración del disco intervertebral (59). El exceso de proteasas derivadas de neutrófilos se ha relacionado con una inflamación prolongada que conduce a un retraso en la cicatrización de las heridas (129). Por otro lado, los leucocitos promueven la activación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento derivados de las plaquetas y el factor de crecimiento endotelial vascular liberado por los leucocitos (53,75,127), y proporcionan capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora al PRP (75,129,130). En este sentido, varios estudios han informado que los leucocitos en PRP mejoran las tasas de curación de las heridas crónicas diabéticas (63,64). Estas heridas son recalcitrantes a la curación debido al efecto vascular y neuropático de la diabetes y los efectos inhibidores de la hiperglucemia en la función de los neutrófilos que deterioran la respuesta inmune haciendo que no pueda controlar las infecciones de las heridas (131). En este contexto clínico donde el paciente está en riesgo y la terapia antimicrobiana es ineficaz (45), la coadministración de leucocitos podría ser interesante para reducir la incidencia de amputaciones.

Por lo tanto, independientemente de las interpretaciones específicas, estos estudios demuestran que los glóbulos blancos tienen una fuerte influencia en la calidad del PRP y que la composición final del PRP debe estar guiada por la patología a tratar, la variabilidad interindividual e intraindividual.

7. HIPÓTESIS

7.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Podría resultar beneficiosa la coinfiltración de plasma autólogo rico en plaquetas y rico en leucocitos en el manejo de las heridas de piel y partes blandas y especialmente de las úlceras del pie diabético que se encuentran infectadas?.

E inexorablemente debemos preguntarnos ¿Qué sistemas comerciales o técnicas de preparación de plasma rico en plaquetas y leucocitos podrían resultar de interés en la práctica clínica?. ¿Atendiendo a las características intrínsecas, densidad y composición, de los preparados obtenidos, podrían resultar efectivos para nuestro cometido?. ¿Qué variables debemos controlar para mejorar el rendimiento de los sistemas y en definitiva para optimizar una terapia que resueltamente podría ser efectiva?

7.2. HIPÓTESIS QUE SE PLANTEA

Antes de llevar a cabo la realización del estudio nos planteamos la siguiente hipótesis:

“La infusión autóloga de plasma rico en plaquetas ha sido recientemente introducida en múltiples áreas de la medicina por sus propiedades regenerativas, entre otras. En las infecciones del pie diabético la aplicación de PRP favorece y acorta el tiempo de cicatrización. Dado que las células blancas constituyen el principal sistema de defensa del organismo frente a agresiones por agentes externos y, que la fisiopatología de la diabetes condiciona una fuerte inmunosupresión en la úlcera infectada del pie diabético, pensamos que la infiltración simultánea de células blancas junto con el PRP podría ayudar a mejorar el manejo de la infección evitando la proliferación y progresión de los microorganismos virulentos a planos profundos. Este efecto sería especialmente útil en el manejo de úlceras de largas duración. Este tipo de úlceras, características del pie neuro-isquémico, se relacionan con una elevada carga biológica de microorganismos que difícilmente pueden soportar los sistemas defensivos del individuo. Incluso bajo continuos ciclos de tratamiento antimicrobiano las úlceras de larga duración no evolucionan favorablemente.

Es conocido que en sangre circulante el efecto defensivo desencadenado por las células blancas, especialmente las polimorfonucleadas, es dependiente de la concentración de células y no del cociente o relación entre el número de células blancas y los microorganismos infectantes, es decir, que la capacidad “limitada” de fagocitosis de cada célula polimorfonucleada no predispone el efecto antibacteriano. Este concepto ha sido recientemente demostrado sobre *S. epidermidis*, un conocido microorganismo comensal presente en la piel del ser humano. No obstante, es desconocido si este comportamiento se replica frente a los patógenos habitualmente implicados en la infección del pie diabético. Por otro lado, más recientemente, se ha especulado sobre el posible efecto antibacteriano de las plaquetas que en cierto modo también podría contribuir a controlar la progresión de la infección.

Existen varias decenas de métodos y dispositivos comerciales potencialmente útiles para la obtención sencilla y rápida de PRP en la práctica clínica. Durante el proceso de preparación del PRP es relativamente sencillo concentrar la fracción blanca presente en sangre circulante pero desconocemos si todos estos sistemas presentan la misma eficiencia para conseguir nuestro cometido. Sería inviable, experimentalmente hablando, comparar todos los métodos disponibles. No obstante, si podría resultar de interés comparar algunos

7. *Hipótesis*

ejemplos de sistemas o métodos de preparación representativos de los sistemas de mayor difusión y frecuencia de uso en el entorno clínico. Esta comparación permitiría confirmar si el rendimiento obtenido con los diferentes dispositivos alteraría la supuesta efectividad del tratamiento.

Un inconveniente añadido que se nos presenta es la estrecha relación que existe entre el fracaso de la terapia PRP, demostrada en diversos ensayos clínicos, y la composición variable de los productos finales conseguidos con las diferentes técnicas de preparación de PRP. La falta de estandarización del método de trabajo y la variabilidad entre sujetos condicionan una extensa variabilidad de componentes y densidades de estos componentes que pueden poner en riesgo la efectividad de esta peculiar la estrategia de tratamiento. Creemos que al margen de la técnica seleccionada, esta debe estar optimizada para que los productos finales permitan alcanzar los objetivos que se persiguen en las muy diversas aplicaciones clínicas que involucran la infiltración autóloga de PRP”.

8. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

8.1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El riesgo de amputación y la elevada morbimortalidad relacionada con la infección crónica de la úlcera en el pie diabético, unido a la falta de opciones terapéuticas producto de la ineffectividad del tratamiento antimicrobiano, bien por la propia naturaleza de la úlcera diabética o bien por la frecuencia de aislamiento de agentes multirresistentes en estos procesos, así como por los elevados costes económicos asociados al manejo y tratamiento de la enfermedad, son factores que comprometen el ya complicado estado del paciente y nos obligan a buscar nuevos enfoques terapéuticos que complementen a la antibioterapia y las medidas de sostén clásicas.

8.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

8.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo de esta memoria es establecer la efectividad y probabilidad de éxito de la coinfusión autóloga del plasma rico en plaquetas y leucocitos en la infección de partes blandas, preparado con los sistemas comerciales de fraccionamiento y separación de la sangre previa caracterización de los factores que modifican la calidad del producto final concentrado.

8.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1. Selección del dispositivo candidato para la preparación de plasma rico en plaquetas y leucocitos mediante la comparación de diferentes métodos de obtención de PRP en un ensayo clínico cruzado.
- 2. Caracterización de los factores modificadores de la calidad del PRP y concentrado leucocitario obtenido con el dispositivo candidato, mediante análisis de la variabilidad del producto final en un ensayo clínico experimental.
- 3. Evaluación *ex vivo* del efecto antimicrobiano de plaquetas y neutrófilos frente a especies microbianas habitualmente implicadas en la etiología de las infecciones de piel y tejidos blandos con el propósito de determinar la concentración crítica de plaquetas y neutrófilos que desencadena eficacia microbiológica en la infusión autóloga
- 4. Establecer la probabilidad de éxito de la terapia atendiendo a la variabilidad del producto final dependiente de la población y de la selección del dispositivo concentrador.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1. GENERALES

9.1.1. ESTUDIO Y ÁMBITO DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

- El estudio se desarrolló en 2 fases consecutivas;
- La primera fase que abordó el estudio comparativo preliminar de métodos de preparación de PRP y el análisis de la variabilidad del dispositivo candidato, se desarrolló íntegramente en León (León). Este municipio consta de 124.303 habitantes, de los cuales 56.307 son hombres y 67.996 son mujeres, distribuidos en una superficie de 39,03 km².
- La segunda fase, consistente en el estudio ex vivo de efectividad de leucocitos y plaquetas en voluntarios sanos, se desarrolló en la Universidad Complutense de Madrid (Madrid) ayuntamiento de Madrid, provincia de Madrid. Este municipio consta de 3.266.126 habitantes, de los cuales 1.520.153 son hombres y 1.745.973 son mujeres, distribuidos en una superficie de 604,45 km².

9.1.2. PERIODO DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO

- El periodo durante el cual se llevó a cabo la toma de muestras a los voluntarios fue desde Julio de 2016, hasta Junio de 2019.

9.1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

- Todos los voluntarios que participaron en la primera y segunda parte del estudio fueron pacientes en la Clínica Podológica 2010, León.
- Los voluntarios que participaron en el tercer estudio fueron reclutados en Madrid capital.
- En ambos casos y antes del reclutamiento, se dieron explicaciones pormenorizadas de los objetivos y procedimientos que involucraba el estudio. Todos los participantes consintieron participar mediante firma del formulario de consentimiento informado preparado a tal efecto. Todos los voluntarios cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron ser incluidos como participantes en el estudio.

9.1.4. SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES

- La selección de los participantes en el presente estudio de investigación se llevó a cabo mediante muestreo consecutivo y no aleatorio. Además, se realizó en base a una serie de criterios inclusión y exclusión previamente preestablecidos.
- Los criterios de inclusión para participar en el estudio consistieron en ser mayor de 18 años y dar su autorización mediante la firma del consentimiento informado para la participación libre y voluntaria en el estudio.
- Los criterios de exclusión fueron: padecer enfermedades infecto-contagiosas, estar en tratamiento con anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios, o haber tomado antiinflamatorios en los últimos 7 días. Los pacientes anémicos y las mujeres embarazadas o con dudas sobre su estado de concepción, no fueron incluidos en el estudio. Los participantes anémicos fueron reemplazados por nuevos voluntarios preseleccionados en este punto.

9.1.5. PROCEDIMIENTO RECOGIDA DE DATOS

- Un solo investigador fue el encargado de realizar las entrevistas a aquellos que aceptaron participar en el estudio. Además de responder al cuestionario de salud sobre la ausencia de enfermedades infecto-contagiosas, la ausencia de tratamientos con antiinflamatorios, anticoagulantes y antiagregantes plaquetarios, los voluntarios fueron sometidos a mediciones de peso y talla para calcular su índice de masa corporal (IMC) así como rellenar una serie de datos sociodemográficos. Se descartó la existencia de anemia durante la primera evaluación serológica.

9.1.6. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

El estudio fue aprobado por el comité de ética de la investigación de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, con número de registro interno 190420164416. Los sujetos participantes fueron informados del alcance de la investigación y consintieron participar mediante firma del documento de inclusión.

9.2. ENSAYO CLINICO CRUZADO PRELIMINAR PARA LA COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACION DE PRP EN SUJETOS SANOS. SELECCION DEL DISPOSITIVO

9.2.1. ESTUDIO Y PARTICIPANTES

Se diseñó un ensayo clínico cruzado que involucró a 5 voluntarios sanos de ambos sexos (2 hombres y 3 mujeres), con edades comprendidas entre los 31 y los 64 años. El número de voluntarios se estableció de acuerdo a estudios previos (72).

Los voluntarios que cumplieron con los criterios de inclusión participaron con una única donación de sangre periférica de 60 ml. El volumen de sangre recolectado se repartió en seis alícuotas. Cinco fueron destinadas a la obtención de PRP y concentrado leucocitario empleando cinco métodos diferentes de fraccionamiento y concentración de la sangre. La alícuota restante de cada voluntario se empleó como control. El punto de extracción se habilitó en una sala propiamente acondicionada, en la Clínica 2010, de León.

9.2.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE PRP

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción desde la vena cefálica, basilíca o mediana, de la flexura del brazo izquierdo o del derecho. Tras colocar el compresor en la zona media del húmero y desinfectar la zona de extracción con clohexidina se procedió a la recolección de la sangre empleando una aguja de mariposa de 21 G x 1,9 cm (BD Vacutainer, EEUU). La sangre se recolecto simultáneamente en 2 tubos simples de 4,5 ml anticoagulados con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, BD Vacutainer, EEUU) y en 2 tubos simples de 4,5 ml anticoagulados con citrato sódico al 3,2% (SC, BD Vacutainer EEUU), en representación de los métodos semicerrados para la preparación de PRP y en las jeringas precargadas con citrato sódico de los tres sistemas comerciales cerrados seleccionados para el fraccionamiento y separación de la sangre; el

clásico kit de PRP (cl-PRP) basado en tubos de gel seaprador (Wego, Shenzhen, China), el sistema comercial Easy Kitâ (Mesotech, Napoli, Italia, <https://www.mesotech.it/products/>) y el sistema GloPRPâ (Glofin, Ösalo, Finlandia, <https://www.glofinn.com/>). Estos sistemas fueron seleccionados por su manifiesta difusión y frecuencia de uso en el entorno clínico o por representar a dispositivos de fácil manejo y fisionomía novedosa que según los fabricantes suponen una mejora en la capacidad de separación y concentración de las fracciones de la sangre.

En paralelo, se reservó un volumen de 2 ml de sangre periférica (SP) en tubos con EDTA como control del hemograma basal de cada paciente.

9.2.3. PREPARACIÓN DEL PRP

El protocolo de preparación del PRP, se adaptó de métodos publicados previamente (132–135) o siguiendo las recomendaciones del fabricante para los dispositivos comerciales candidatos (Tabla 2). Todos los protocolos de preparación de PRP fueron consistentes con un único ciclo de centrifugación (Nahita, Ibor Médica España) de 5 a 10 min de duración, a excepción del protocolo utilizado para el sistema GloPRP que requirió de dos ciclos de centrifugación de idéntica fuerza y duración. Tras la centrifugación, los tubos y sistemas se dejaron en reposo durante 5 minutos para facilitar la sedimentación de las plaquetas sobre la capa leucocítica formada.

Tabla 2. *Protocolo de trabajo empleado con los métodos de preparación de PRP^a*

Sistema (compañía)	Vol. sangre, mL	Anticoag.	Centrifugación, RPM	Tiempo, minutos	Vol. PRP, mL
Easy PRP Kit (Mesotech)	11	Citrato Sodio, 1mL	3,500	5	2.5
Tubo EDTA (BD Vacutainer)	8	EDTA	3,500	10	2.5
Tubo Citrado (BD Vacutainer)	8	Citrato sodio, 1mL	3,500	10	2.5
Sistema GloPRP (Glofin)	9	Citrato sodio, 1mL	^b Primera; 2.113 (1200 g) Segunda; 2.113 (1200 g)	Primera; 5 Segunda; 5 10	2.5
Classic PRP Kit (Wego)	9	Citrato sodio, 1mL	3,500	10	2.5

Abreviaturas. Vol.; volumen. Anticoag.; anticoagulante

^a No se empleó activador. RPM; revoluciones por minuto. ^b Procesamiento en dos centrifugaciones

El producto final (PRP y concentrado leucocitario) se recogió por aspiración con jeringa de 5 ml y aguja de 21 G x 40 mm, mediante visualización del campo con el ojo desnudo. Tras colocar la aguja sobre la superficie de la capa leucocitaria, se retiró suavemente el émbolo de la jeringa para aspirar, en primer lugar las plaquetas y posteriormente, tras desplazar la aguja por la capa leucocitaria, el concentrado de células blancas.(80). En total se consiguió extraer un volumen aproximado de 2,5 ml de producto final por participante y método que se transfirió inmediatamente a un tubo de EDTA.

9.2.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las muestras control de SP y de los productos finales recuperados de cada sistema en los tubos con EDTA fueron remitidas al laboratorio de hematología (Echevarne, Hospital HM San Francisco de León) para determinación del hemograma que incluyó recuento de plaquetas, leucocitos (CBs) totales y específicamente de neutrófilos, linfocitos y monocitos. El recuento de células se expresó por mililitro de muestra (ml).

La capacidad de captura de células sanguíneas (plaquetas o leucocitos) o factor de concentración celular de cada dispositivo (número de veces que un dispositivo incrementó la concentración de un tipo de célula sanguínea en los preparados finales), se estableció mediante el cociente PRP: SP; relación entre la densidad de plaquetas o leucocitos en los productos finales y en sangre periférica (80). Los cocientes PRP:SP se determinaron para cada uno de los tipos de célula sanguínea analizados.

La densidad de plaquetas y CBs presentes en los preparados obtenidos con cada uno de los métodos se comparó con respecto a la densidad basal en SP y entre los diferentes métodos. La eficiencia de los métodos candidatos para concentrar células se valoró comparativamente a través de la capacidad de captura de células sanguíneas de cada sistema.

9.2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables continuas se describieron utilizando la media \pm la desviación estándar (DE) y los límites superiores e inferiores, al 95%, del intervalo de confianza (95% IC), así como la mediana y el rango intercuartílico (RI). La variabilidad relativa entre sujetos se estableció a través del cociente de variación (DE/media en %).

Las diferencias en el contenido de plaquetas y leucocitos entre la sangre total y el PRP obtenido por cada método concentrador se establecieron mediante ANOVA unidireccional de medidas repetidas seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Las comparaciones entre sistemas se establecieron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los datos cuantificables, siguieron una distribución gaussiana según la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. En todos los casos se consideró un valor de $P < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los análisis fueron desarrollados utilizando el paquete informático GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California EE. UU., WWW.graphpad.com)

9.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES MODIFICADORES DE LA CALIDAD DEL CONCENTRADO DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS OBTENIDO CON EL DISPOSITIVO CANDIDATO. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE INDIVIDUOS:

9.3.1. ESTUDIO Y PARTICIPANTES

Se diseñó un ensayo clínico experimental en el que participaron un total de 26 voluntarios de ambos sexos (13 hombres y 13 mujeres) con edades comprendidas entre los 29 y 93 años. Los voluntarios participaron con una única donación de sangre periférica de 14 ml que subsecuentemente se dividió en dos alícuotas; una destinada a la obtención de PRP y concentrado leucocitario utilizando el sistema Easy kit y otra se reservó a modo de control.

En la primera aproximación, los participantes independientemente de su género, fueron aleatorizados a dos grupos de edad; grupo control (n = 13) constituido por individuos menores de 65 años y, grupo de adultos mayores (n = 13) integrado por individuos de ≥ 65 años, para establecer la influencia del envejecimiento en la calidad y composición del producto final conseguido por el dispositivo. Este corte de edad se estableció de acuerdo a la definición utilizada por la Organización Mundial de la Salud para definir a personas mayores (136).

En la segunda aproximación, los participantes se dividieron según su género (13 hombres y 13 mujeres) con la finalidad de establecer la influencia del dimorfismo sexual en la calidad y composición del PRP.

En la tercera aproximación, los participantes de cada género fueron aleatorizados a dos grupos de edad compatibles con los períodos pre y posmenopáusicos; grupo de participantes “jóvenes” que incluyó a sujetos con ≤ 50 años y grupo de participantes “mayores”

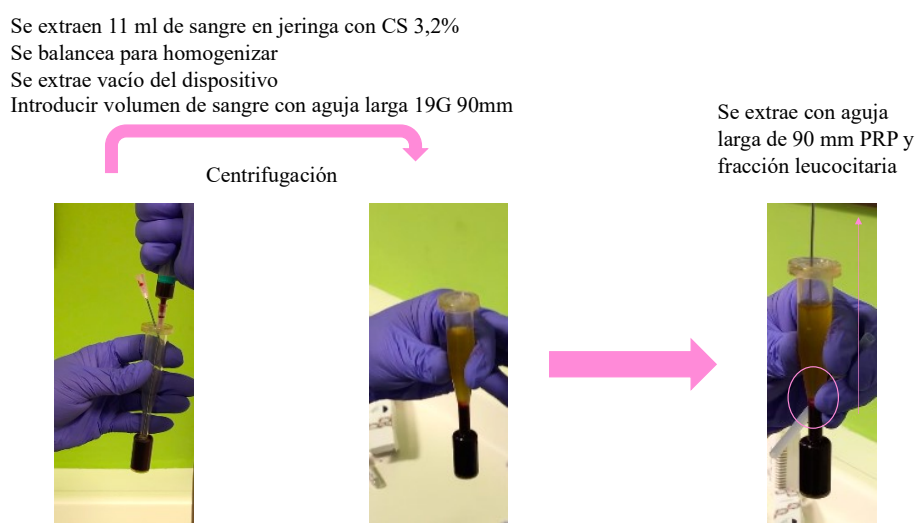
constituido por sujetos > 50 de años, como punto de partida para la caracterización de la influencia de la evolución del dimorfismo hormonal con la edad en la calidad y composición del PRP.

9.3.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA, SISTEMA DE SEPARACIÓN DE LA SANGRE Y PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y LEUCOCITOS

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción empleando una aguja de mariposa de 21 G x 1,9 cm (BD Vacutainer), desde la vena cefálica, basílica o mediana de la flexura del brazo izquierdo o derecho tras desinfección adecuada de la zona de extracción. El plasma rico en plaquetas y leucocitos se preparó utilizando el sistema comercial Easy PRP (Mesotech, Napoli, Italia, <https://www.mesotech.it/products/>), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un volumen de 11 ml de sangre de cada participante se cargó en las jeringas del sistema comercial, junto con un ml de citrato sódico al 3,2%. Tras la extracción, la jeringa se equilibró suavemente en 10 ocasiones para conseguir una mezcla uniforme de sangre con anticoagulante. Posteriormente tras romper el vacío del sistema, la sangre se introdujo través del estrechamiento del kit en el colector inferior del dispositivo utilizando una aguja larga (90 mm) de 19 G (figura 5), desde donde tras saturación se elevó hasta rellenar la mitad del cuerpo central del sistema.

Figura 5. Protocolo de extracción de plasma rico en plaquetas y leucocitos del sistema comercial Easy PRP.

Fuente propia.



El dispositivo comercial se centrifugó a 3500 RPM durante 5 minutos (Nahita, Ibor Médica, España) y mediante jeringa de 5 ml y aguja larga se recogieron la fracción equivalente al plasma rico en plaquetas y la capa leucocitaria concentrada, hasta transferir un volumen final de 2 ml del producto final a un tubo con EDTA.

En paralelo, un volumen adicional de 2,5 ml de SP de cada donante se recogió en tubos de EDTA a modo de control del hemograma basal de cada paciente.

9.3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las muestras concentradas resultantes junto con las muestras de sangre control, se remitieron al laboratorio de hematología para determinar el recuento de plaquetas, CBs y dentro de la serie blanca, de neutrófilos, linfocitos y monocitos.

La capacidad del dispositivo para capturar células sanguíneas, se estableció como se describió anteriormente a través del cociente PRP:SP. Adicionalmente con la finalidad de establecer la influencia de la densidad de cada tipo de célula sanguínea en SP con la eficiencia del dispositivo para concentrar un tipo específico de célula, el cociente PRP:SP se modeló junto con la densidad total de cada célula sanguínea en sangre periférica y junto con la densidad relativa de cada línea de la serie blanca dentro de la fracción leucocitaria, cociente CLR, mediante regresión lineal, utilizando los datos de todos los participantes (GraphPad Prism v.8.0.0).

El cociente CLR o cociente de cada fracción de células blancas: leucocitos, se calculó dividiendo la concentración específica de cada tipo de leucocitos por la concentración total de leucocitos en SP

La densidad de plaquetas y CBs en SP y en los productos finales se comparó entre los grupos de edad y entre los grupos de sexo y sexo-edad para establecer respectivamente la influencia del envejecimiento, del dimorfismo sexual y del cambio en el dimorfismo hormonal con la edad en la calidad y composición del PRP. La eficiencia de captura se valoró para cada tipo de célula entre los diferentes grupos comparados.

9.3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características de los participantes se analizaron de forma descriptiva. Las variables continuas se describieron utilizando la media \pm DE, rango mínimo y máximo, mediana

y RI. En las comparaciones entre SP y los concentrados preparados por el dispositivo se utilizó la t-student's (T-test) para muestras pareadas o la prueba de Wilcoxon, de acuerdo con la distribución de los datos basada en la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre grupos de edad, sexo y de sexo-edad se utilizó la prueba del T-test independiente o la prueba U de Mann-Whitney (U-test). Para todos los análisis, se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0,05$. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software SPSS para Mac (Versión 22; IBM Corp, Armonk, NY).

9.4. EFECTO ANTIMICROBIANO DE PLAQUETAS Y NEUTRÓFILOS

9.4.1. PARTICIPANTES

En el ensayo *ex vivo* participaron tres sujetos, 2 mujeres y un hombre, de edades comprendidas entre los 34 y 64 años, El voluntario 1 fue un varón de 63 años, con un IMC de 34,11 Kg/cm² El voluntario 2 fue una mujer de 63 años, con un IMC de 25,26 Kg/cm² y el voluntario 3 fue una mujer con un IMC de 34,02 Kg/cm².

Los participantes no presentaron antecedentes de enfermedades crónicas y durante el ensayo no recibieron ningún tratamiento farmacológico que pudiera alterar la fórmula sanguínea.

Cada voluntario donó un volumen de sangre total de 1.240 ml repartidos en 10 visitas consecutivas, con una especiación de al menos 15 días entre visitas. Los voluntarios cumplieron con los criterios de participación a lo largo de las distintas visitas programadas al punto de extracción.

El cronograma del estudio consistió en dos visitas basales (primera y segunda visita) en las que se extrajeron 20 ml de sangre de cada voluntario, seguidas de 8 visitas de ensayo (visitas tercera a décima) en las que se extrajo un volumen de sangre de 100 ml por visita. El punto de extracción se habilitó en una sala propiamente acondicionada, próxima al laboratorio de microbiología.

9.4.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

A lo largo del experimento se emplearon los siguientes reactivos; solución isotónica de cloruro amónico (ClNH₄ 154 mM/L, NaHCO₃ 10 mM/L, EDTA 0,1 mM/L) estéril, ajustada a un pH=7,3 con HCl o NaOH. Solución equilibrada de Hank's sin suplementar (HBSS, Gibco-ThermoFisher Scientific), y suplementada con Ca²⁺ y Mg⁺ (HBSS+). Agua desionizada tamponada con NaOH a pH=11 (agua básica) y trombina bovina (Sigma-Aldrich, T4648).

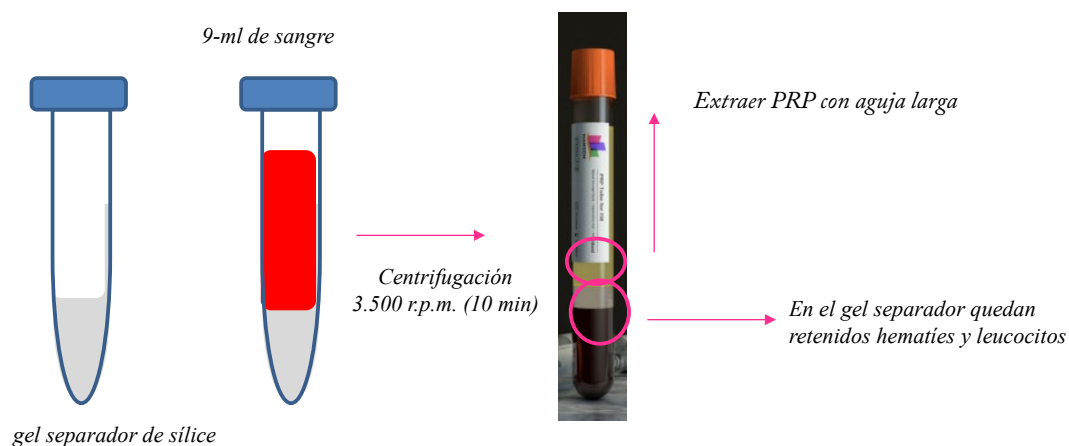
9.4.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN DE PRP

Las muestras de sangre se recolectaron por venopunción desde la vena cefálica, basílica o mediana, de acuerdo a la anatomía del paciente, de la flexura del brazo izquierdo o derecho. Se colocó compresor en la zona media del húmero, se desinfectó la zona con clohexidina y se procedió a la obtención de la sangre mediante sistema de campana de extracción, en tubos anticoagulados con EDTA de potasio (EDTA, Vacutainer, BD), en los tubos pre-acondicionados con 1-ml de citrato sódico al 3.2% del sistema comercial clásico de separación de sangre por gel separador, para la preparación de plasma rico en plaquetas, PRP (sistema clásico de PRP,-cl-PRP, Wego, Shenzhen, China) o en tubos sin anticoagulante con gel separador (Vacutainer, BD) .

En la visita basal, la sangre donada por cada voluntario (20 ml) se repartió entre los tubos de EDTA, para determinar la fórmula sanguínea basal y los tubos del sistema cl-PRP para determinar la fórmula del concentrado de PRP. Brevemente:

- Los tubos de EDTA (4-ml por tubo) se invirtieron en 8 ocasiones, se almacenaron y posteriormente se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de análisis clínico para su procesamiento (Echevarne, HM San Francisco, León). Para la preparación del PRP, se incorporaron junto a la solución anticoagulante 9 ml de sangre de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Figura 6).

Figura 6. Representación esquemática del proceso de preparación de PRP. Fuente propia.



- Una vez homogeneizada la mezcla por inversión, se procedió a la obtención del plasma rico en plaquetas mediante el método de centrifugación única (Nagata 2010, JL, R, 2008) tal y como se representa en la figura 5. Los tubos se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente con jeringa de 5 ml y aguja de 18G larga, se extrajeron 2 ml de PRP de la zona inferior del concentrado justo por encima del gel separador de sílice. Un total de 2ml de preparado se transfirió a un tubo de EDTA y se transportó al laboratorio para su análisis.

El resultado medio del recuento de plaquetas en el PRP de las dos visitas basales, se utilizó como concentración de referencia para sucesivas fases experimentales que requirieron el empleo de plaquetas.

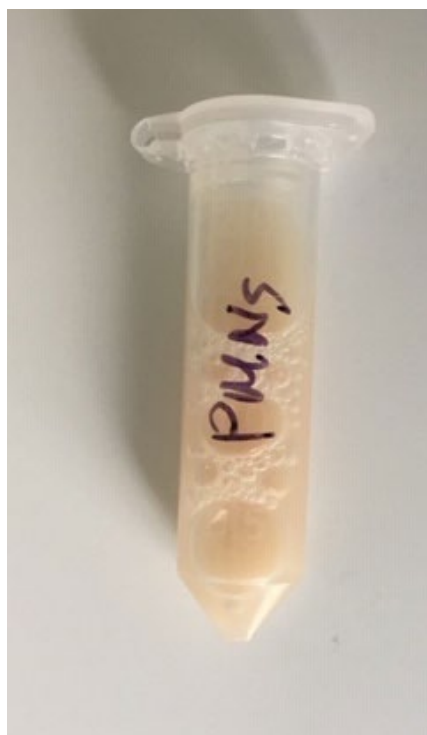
En las visitas posteriores, visitas terceras a décima, la sangre recolectada (100 ml) se repartió en tubos de EDTA (70 ml), tubos del sistema cl-PRP (10 ml) y tubos sin anticoagular (20 ml) para la extracción de leucocitos polimorfonucleares (PMNs, neutrófilos), PRP y suero de cada voluntario.

9.4.4. NEUTRÓFILOS

Para conseguir las concentraciones de neutrófilos requeridos en esta investigación, se recurrió a un método de fraccionamiento y concentración secuencial de la sangre de los voluntarios. La obtención de neutrófilos se realizó siguiendo el protocolo de centrifugación diferencial descrito por Eggleton y cols (Eggleton 1989). Brevemente; volúmenes de 5 ml de sangre de la sangre recolectada (70 ml) se incorporó a frascos con 16 ml de solución de cloruro amónico (solución de lisis de los eritrocitos). La suspensión tras 15 min. en hielo, se centrifugó durante 10 min. a 160xg. Tras retirar el sobrenadante con cuidado, el concentrado se suspendió de nuevo en 16 ml de cloruro amónico y se repitió el proceso. Los concentrados resultantes se suspendieron en un pequeño volumen de HBSS- y se agruparon en único tubo hasta completar un volumen final de 5 ml. Tras 15 minutos en hielo, el tubo se centrifugó durante 10 min. a 55xg. Finalmente, el sedimento se suspendió en HBSS+ para activar la función de los neutrófilos, en un volumen de aproximadamente 1-ml. La cuantificación de los neutrófilos concentrados se realizó mediante recuento microscópico de células en la cámara de Neubauer. Para ello, un volumen del concentrado de neutrófilos diluido 1:100 en (1:100) (figura 7), se inoculó por

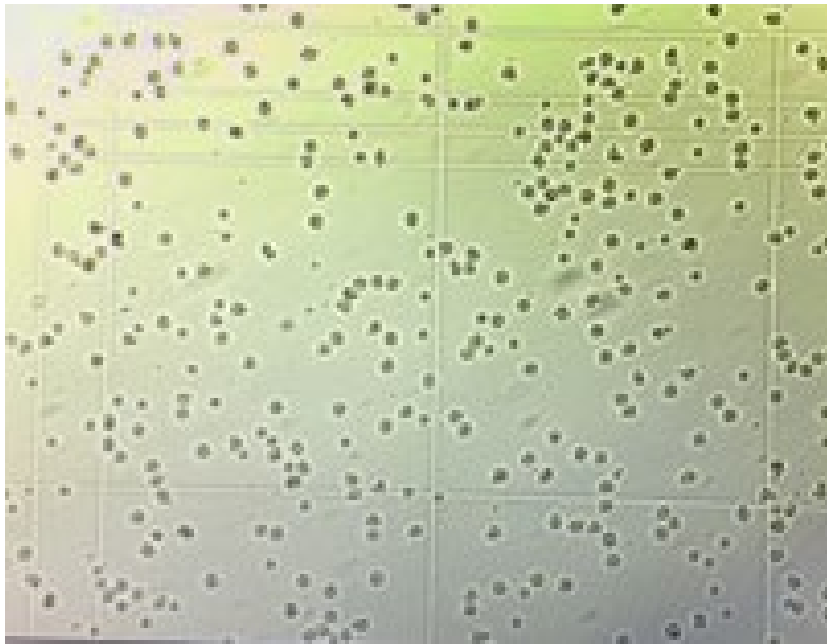
capilaridad en la cámara de Neubauer hasta la saturación de los cuadrantes de la cámara (figura 5). El promedio de neutrófilos presentes en cuatro de los cuadrantes (cada uno representado por 16 cuadrados de 0,25 mm), se utilizó para calcular el nº de neutrófilos por ml de acuerdo al volumen de saturación de cada cuadrante, 0,1 μ l (1mm² x 0,1mm de profundidad de la cámara). Así el nº PMN/ml=promedio de neutrófilos * 10⁴. Esta concentración de referencia fue utilizada en sucesivos experimentos que incluyeron el uso de neutrófilos.

Figura 7. Concentrado de PMNs. Fuente propia



Al comienzo y a la finalización de cada experimento se procedió a determinar la viabilidad de los neutrófilos por exclusión del colorante azul de tripan en cámara de Neubauer. Para ello 30 μ l de una dilución 1:10 (en HBSS) de la muestra de neutrófilos concentrados, se incorporó junto a 70 μ l -de colorante azul de tripan al 0,4% y se inoculó en la cámara de Neubauer hasta saturación de los cuadrantes. La viabilidad inicial y final de los neutrófilos fue en todos los casos superior al 95%, cumpliendo con el objetivo propuesto por Eggleton y cols (Eggleton 1989).

Figura 8. PMNs vistos por cuadrantes durante el recuento microscópico. Fuente propia.



9.4.5 SUERO HUMANO

El suero humano se obtuvo desde la sangre recolectada (20 ml) en los tubos con gel separador sin anticoagulante, tras conservación a temperatura ambiente (30 minutos) y posterior incorporación de 1 NIH/ml de trombina. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 3.000 r.p.m durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se conservó en frío hasta su uso. Un volumen de 2 ml de cada suero, se inactivó por calentamiento en baño de agua a 56°C durante 30 minutos. El suero inactivado resultante se conservó en frío hasta su uso.

9.4.6. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

A lo largo del estudio se utilizaron 6 cepas diferentes representativas de los aislamientos habituales procedentes de infecciones moderadas o graves de pie de diabético de acuerdo a la relación etiología-gravedad de la infección establecida por la IDSA (Lipsky 2012); *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (SASM) ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23389), un aislado clínico reciente de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) y las cepas de *S. aureus* Mu-3 y Mu-50. Las cepas ATCC y las cepas Mu-3 y Mu-50 procedieron de la colección americana de cultivos tipo (American type culture collection) y la

cepa MRSA se obtuvo de un cultivo reciente procedente de una infección moderada en el pie de un paciente diabético atendido en el Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

Los microorganismos se descongelaron y subcultivaron en al menos tres ocasiones en agar Columbia (BD) antes del inicio de los experimentos. Colonias procedentes de un cultivo de 18-20 fueron suspendidas en un volumen de 5 ml de HBSS+ (Gibco) se ajustó mediante espectrofotometría a un inóculo inicial de 1×10^8 UFC/ml (inóculo estandarizado).

9.4.7 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

9.4.7.1. *Actividad antimicrobiana de los neutrófilos (PMNs)*

La actividad antimicrobiana de diferentes concentrados de PMNs (densidad final experimental de entre 1×10^5 y 1×10^7 PMNs/ml) preparados por dilución en HBSS+ desde la solución de referencia preparada desde la sangre de cada voluntario, se valoró mediante curvas de muerte bacteriana frente a las cepas SASM, SARM, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Figura 9. *Preparación de las curvas experimentales. Fuente propia.*



9. Material y métodos

Un volumen de 500 µl de cada dilución se incorporó a tubos de plástico de 1,5 ml, seguido por este orden de suero del voluntario (40% v/v) y el microorganismo previamente diluido en HBSS+, tal y como se refleja en la tabla 1. La densidad de PMNs final en los tubos fue de 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 y 5×10^7 neutrófilos/ml y la densidad final del microorganismo de 1×10^6 UFC/ml. Se utilizó un material plástico debido a que el vidrio favorece la adhesión de los neutrófilos a la superficie del tubo (Li 2012, Ali 2017).

En paralelo, tubos que contuvieron las diferentes concentraciones de PMN y suero inactivado del voluntario (40% v/v) se inocularon con el microorganismo como control de la actividad del suero.(Figura 9)

Como controles del experimento se incluyeron tubos que incorporaron al microorganismo en HBSS+, en HBSS+ y un 40% de suero activado del voluntario (v/v) y en HBSS+ y un 40% de suero inactivado del voluntario (v/v).

Tabla 3. *Curvas experimentales y volúmenes empleados de las distintas fracciones en microlitos. Por orden de incorporación*

Curva	PMNs	Suero	Plaquetas	Bacteria	HBSS+
C	-	-	-	100	900
S	-	400	-	100	500
S*	-	400	-	100	500
PMN-S	500	400	-	100	-
PMN-S*	500	400	-	100	-

Control; C. S; Suero. S*; suero inactivado; PMN; neutrófilos. Bacteria; suspensión ajustada a 10⁶ UFC/ml en HBSS+.

*PMN, ajustado según método de extracción a una concentración final de 10⁵, 5x10⁵, 10⁶, 5x10⁶, 10⁷ y 5x10⁷ PMNs/ml en HBSS+.

Las curvas experimentales de PMNs, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 5 horas. Los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones para cada cepa y voluntario

9.4.7.2. Actividad antimicrobiana de las plaquetas

En este apartado se valoró mediante curvas de muerte bacteriana, la actividad antimicrobiana del concentrado plaquetario ajustado a una densidad final en el tubo de 2×10^6 , 2×10^7 , 2×10^8 y 2×10^9 plaquetas/ml frente a todas las cepas propuestas; SASM,

SARM, Mu-3, Mu50, *E. coli* y *P. aeruginosa*. En este caso, un volumen de 400 µl de cada dilución del PRP de referencia, se incorporó a los tubos junto con 490 µl de HBSS+, 10 µl de una solución de trombina bovina ajustada a 1 NIH (unidad internacional)/ml y 100 µl de cada microorganismo ajustado en HBSS+ desde la concentración estandarizada, para conseguir una concentración final en tubo de 1×10^6 UFC/ml. Las diluciones desde la concentración de referencia de PRP se realizaron empleando suero autólogo. El HBSS+ y el microorganismo se incorporaron después de la incorporación de la trombina y formación del gel plaquetario. La solución resultante se centrifugó a $300 \times g$ x 1 min. para aumentar el contacto microorganismo-plaqueta (Ali 2017).

Las curvas experimentales de plaquetas, se incubaron a una temperatura de 37°C durante 5 horas. Los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones para cada cepa y voluntario.

Se asumió, dado que los voluntarios presentaron un hematocrito normal, que el suero obtenido contenía niveles fisiológicos de calcio (8,5-10,5 mg/dl, el 50% en forma de calcio iónico) y por lo tanto suficientes para la activación plaquetaria. No se contemplaron reducciones de los niveles de calcio en las fracciones diluidas dado que fueron preparadas con HBSS+ que contenía una concentración de calcio iónico de 140 mg/L, superior a los niveles fisiológicos.

9.4.8. CURVAS DE MUERTE BACTERIANA

A los tiempos 0 y 5 horas se tomaron muestras de 50 µl desde los diferentes tubos y se diluyeron convenientemente. En el experimento de PMNs, las muestras se diluyeron 1:10 en agua básica y se incubarán cinco min. a 37°C para lisar los neutrófilos (137). Todas las muestras se diluyeron en solución salina fría 1:100- 1:1000 y se inocularon en espiral (50 µl) en placas de agar Columbia (BD, BD-BBL, NJ) como se ve en la figura 10 empleando un sembrador automático (WASP 2, Don Whitley, Reino Unido). Las placas se incubaron en atmosfera convencional a 35°C durante 24 horas antes de proceder al recuento de microorganismos viables, en unidades formadoras de colonias (UFC) empleando un contador laser de colonias (Easy-Count 2, AES-Chemonux-Bio-Merieux, Francia). Los resultados se expresaron en UFC/ml. El límite de detección del ensayo fue de 20 UFC/ml.

Figura 10. *Sembrado en las placas de las cepas propuestas frente a los PMNs y plaquetas. Fuente propia.*



9.4.9. MEDIDA DEL EFECTO ANTIMICROBIANO

El efecto antimicrobiano de los PMNs en suero sin inactivar o inactivado por calor y de las plaquetas, se expresó a través del cambio en el recuento de UFC/ml (expresado en logaritmo) en el medio HBSS+ (curva control) a tiempo 0 (basal) y el recuento de UFC/ml determinado en las diferentes curvas preparadas a partir de la sangre donada por cada voluntario. Un valor positivo indicó incremento de la carga y un valor negativo reducción de la carga inicial. El efecto antimicrobiano se expresó como el valor medio de las respuestas obtenidas sobre cada voluntario en diferentes experimentos y como el valor medio de las respuestas de todos los voluntarios participantes.

9.4.10 MODELADO DOSIS-RESPUESTA

La relación entre la concentración (C) de PMNs o plaquetas, expresada en logaritmos ($\log C$ PMNs o $\log C$ plaquetas) y el efecto antibacteriano, se estableció tras la inspección visual inicial de los trazados mediante modelado no lineal. De acuerdo al criterio informativo de Akaike, la ecuación de tres parámetros del modelo de inhibición del efecto máximo (ecuación 1) ajustó los datos con una probabilidad superior a la del resto de ecuaciones comparadas.

$$y = y_{\max} - (y_{\max} - y_0) [x / (x + IC_{50})]. \text{ Ecuación 1}$$

donde y es el efecto antimicrobiano expresado como el cambio de la carga basal en log UFC/ml, y_0 e y_{\max} son el valor mínimo y máximo de y , respectivamente, x es el logC PMNs o logC plaquetas e IC_{50} es el logC PMNs o logC que corresponde al 50% del efecto máximo ($y_{\max} - y_0$).

Esta ecuación ajustó el cambio del efecto antibacteriano con la variación en la concentración de PMNs o de plaquetas expuestas para las diferentes cepas, empleando los datos de los diferentes voluntarios por separado y combinados en un único modelo. Adicionalmente, las respuestas combinadas de los tres voluntarios se modelaron para todas las cepas en conjunto o para las diferentes cepas de una misma especie frente a las variaciones del logC PMNs o logC plaquetas.

El Ftest (ecuación 2) de la suma de cuadrados (extra-sum-of squares F test, GraphPad Prism) se empleó para comparar la bondad del ajuste de las curvas ajustadas por la ecuación 1 para los datos separados y combinados

$$F = [(SS_c - SS_s) / (DF_c - DF_s)] / (SS_s / DF_c), \text{ (ecuación 2)}$$

Donde SS es la suma de cuadrados, DF son los grados de libertad, SS_c y DF_c son el SS y DF obtenidos con el ajuste de los datos combinados en un único modelo y SS_s y DF_s son el SS y DF obtenidos con el ajuste de los datos por separado. El valor de P se calculó a partir del cociente F , $DF_c - DF_s$ y DF_c . Un valor de $P < 0.05$ indicó un ajuste significativamente mejor para los datos por separado, es decir, un ajuste significativamente mejor del efecto antibacteriano vs. el cambio del logC PMNs o logC plaquetas para cada voluntario por separado o para cada especie o cepa por separado.

De acuerdo al mejor ajuste conseguido, a partir de los datos por separado o en combinación, se determinó por extrapolación desde la curva pronosticada por la ecuación, la concentración de PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactiva y de plaquetas que se requiere para alcanzar un efecto antimicrobiano equivalente a una reducción de la carga microbiana basal de 0, 1, 2 y 3 log UFC/ml.

9.4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones de carga bacteriana y del efecto antimicrobiano de PMNs y plaquetas entre curvas se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey's para las comparaciones múltiples. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado esta-

dísticamente significativo. Dada la elevada complejidad de las comparaciones realizadas, a efectos prácticos, en el caso de las curvas de PMNs solo se mostraron las diferencias de las diferentes concentraciones de PMNs en suero sin inactivar o inactivado frente a los controles del ensayo, entre concentraciones que incorporaron un mismo tipo de suero y entre curvas homólogas con diferente suero.

La comparación entre los niveles basales y los concentrados sanguíneos se realizó empleando el t-test para muestras pareadas.

Simulación de Montecarlo. Estimación del éxito de la autoinfusión del PRP y del concentrado leucocitario en la población

La simulación de Montecarlo es una aproximación matemática que estima la probabilidad con la que puede aparecer un evento predefinido en una extensa población de sujetos, simulada a partir de la distribución natural de una reducida población de sujetos.

La simulación de Montecarlo se desarrolló en 1.000 sujetos empleando el programa Crystal Ball (Oracle v. 11.1) a partir de la distribución poblacional de la densidad de plaquetas y neutrófilos concentrados por los diferentes métodos y sistemas comerciales ensayados. Para el sistema Easy kit se utilizaron los parámetros poblacionales derivados del ensayo clínico desarrollado para este dispositivo (n=26 sujetos) y en paralelo a partir de los parámetros obtenidos tras dividir a la población en hombres y mujeres y de acuerdo al avance de la edad.

A partir de las distribuciones generadas se determinó el porcentaje de sujetos que tras la administración del concentrado de plaquetas o neutrófilos, podría alcanzar el efecto terapéutico deseado; efecto estático o no incremento de la carga basal (0 Log UFC/ml de reducción) o efecto antimicrobiano equivalente a una reducción de 1, 2 o 3 Log UFC/ml de la carga basal.

La distribución de la población simulada de 1000 sujetos se realizó de acuerdo a la media y DE de los observados poblacionales, asumiendo en todos los casos una distribución logarítmico-normal de los datos.

10. RESULTADOS

10.1 ENSAYO CLÍNICO CRUZADO PRELIMINAR PARA LA COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE PRP EN SUJETOS SANOS

La edad y el índice de masa corporal de los voluntarios que participaron en el estudio fue de $47,40 \pm 15,58$ (IC 95%, 28,03-66,76); mediana 45 [RI, 31,00] y $28,79 \pm 4,81$ (22,82-34,77); 25,38 [8,30] respectivamente.

10.1.1. CONCENTRACIÓN DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS EN SANGRE Y EN PRP

La densidad de plaquetas y leucocitos, expresada como la media y mediana a partir de los datos de los cinco participantes, en sangre periférica (SP) y en el PRP obtenido con los diferentes métodos examinados, se resume en la tabla 4.

Como refleja esta tabla, la densidad de plaquetas en el PRP de los diferentes métodos, exceptuando los preparados obtenidos con el sistema cl-PRP, fue significativamente superior ($p \leq 0.011$) a la densidad basal en sangre circulante. Entre métodos, la densidad de plaquetas fue significativamente superior en el PRP obtenido con el sistema Easy kit en comparación con el resto de métodos de concentración de la sangre. No existieron diferencias significativas entre los métodos semicerrados, tubos EDTA y tubos citrados, o los sistemas GloPRP o cl-PRP.

Tabla 4. Recuento de plaquetas y leucocitos (células x10⁶/ml) en sangre periférica y en el PRP obtenido con los diferentes métodos de concentración.

	Plaquetas			CBs		
	Media ± DE	Mediana	P	Media ± DE	Mediana	P
	(95% IC)	[IR]		(95% IC)	[IR]	
SP	291.00 ± 64.09 ^a (211.43–370.57)	304.00 [122.50]	0.81	8.02 ± 2.12 ^b (5.38–10.65)	7.53 [3.03]	0.05
Easy PRP	1008.00 ± 224.12 ^c (729.33–1286.00)	1023.00 [398.52]	0.99	18.53 ± 4.45 ^d (13.01–24.05)	18.60 [8.82]	0.40
EDTA	573.19 ± 127.49 (414.88–731.49)	582.14 [226.63]	0.99	8.72 ± 2.09 (6.12–11.32)	8.76 [4.15]	0.40
Tubo Citrado	613.79 ± 147.80 (430.28–797.31)	670.95 [279.39]	0.51	8.28 ± 1.99 (5.81–10.74)	8.31 [3.94]	0.40
GloPRP	468.97 ± 104.31 339.45–598.49	476.30 [185.43]	0.99	8.16 ± 1.96 (5.73–10.60)	8.20 [3.89]	0.40
cl-PRP	384.61 ± 85.55 (278.39-490.83)	390.62 [152.07]	0.99	0.0 ± 0.0 ^e (0.0-0.0)	0.0 [0.0]	-*

Abreviaturas: SP; sangre periférica. DE; Desviación estándar. IC; Intervalo de confianza; IR; Rango intercuartilico; P, Shapiro-Wilk test Valor estadísticamente significativo para p<0.05, con 95% intervalo de confianza.

^ap.<0.0001 vs Easy kit y tubo citrado, p=0,001 vs. tubo EDTA y p=0,011vs.sistema GloPRP ^bp<0.0001 vs Easy kit y cl-PRP

^cp<0.0001 vs. GloPRP y cl-PRP, p=0.0011 vs. Tubo EDTA y p=0.0031vs. tubo citrado

^dp<0.0001 vs. todos los métodos

^ep≤0.0005 vs. Tubo EDTA , tubo citrado y GloPRP

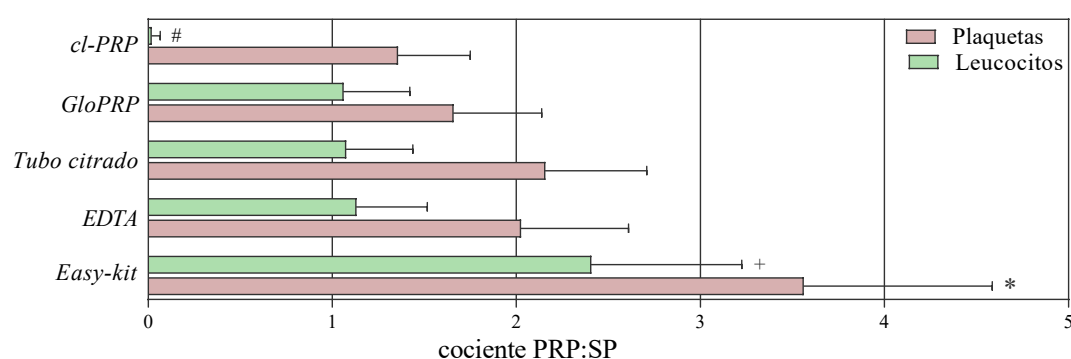
*los valores se situaron por debajo del límite de cuantificación del análisis. Se asumió una distribución gaussiana en las comparaciones estadísticas.

La figura 11 muestra la capacidad de cada método para concentrar plaquetas y leucocitos (cociente PRP:SP). En comparación y con independencia del método, el factor de concentración de leucocitos fue inferior. Como muestra la figura, el sistema Easy kit prácticamente duplicó la capacidad de concentración de plaquetas del resto de sistemas (relación PRP:SP de 3.56 veces vs. 1.36–2.03 veces las plaquetas en SP con el resto de sistemas) y también proporcionó la mayor relación PRP: SP de CBs en los productos finales (2.41 veces vs. 0.00–1.13 veces los CBs en SP) con respecto al resto de métodos.

Con Easy kit, la concentración de leucocitos en los preparados fue significativamente superior a la de SP y a la obtenida en el producto final con cualquier otro método de concentración (tabla 3). El sistema cl-PRP no concentró CBs y las densidades en los

productos finales para el resto de métodos no fueron significativamente diferentes de las medidas en SP .

Figura 11. Capacidad de los diferentes métodos para concentrar plaquetas y leucocitos de la sangre (relación PR:P:SP)



Cociente PRP:SP \leq 1 indica ausencia de concentración desde SP

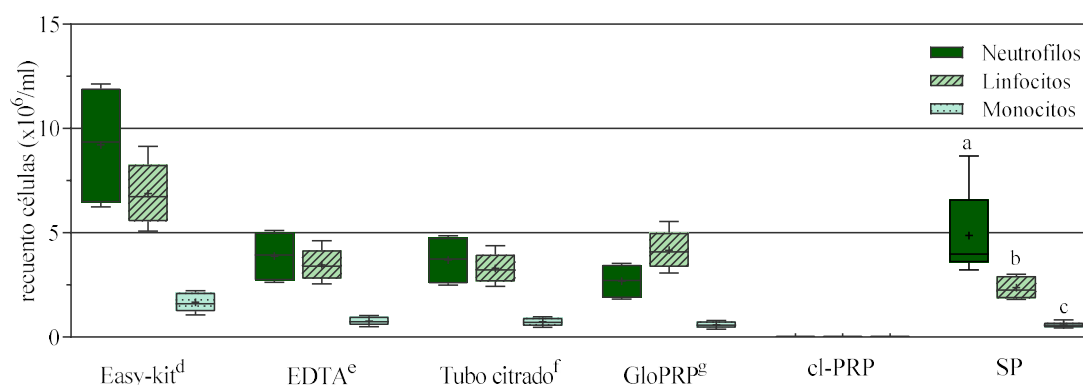
*p \leq 0.0192 vs. todos los métodos. +p \leq 0.0026 vs. todos los métodos. #p \leq 0.013 vs. tubo EDTA , tubo citrado y GloPRP

10.1.2. COMPOSICIÓN DEL CONCENTRADO DE LEUCOCITOS OBTENIDO CON LOS DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE PRP

En la figura 12 se detalla la composición de los concentrados de leucocitos obtenidos con los métodos de fraccionamiento y separación de sangre propuestos. Como refleja esta figura, la composición de neutrófilos, linfocitos y monocitos en el concentrado de leucocitos, fue claramente diferente entre métodos y dependiente de la capacidad de cada sistema para capturar CBs (en conjunto).

La densidad de estas tres fracciones en el concentrado de leucocitos del sistema Easy kit fue significativamente superior (p<0.0001) a la densidad basal en SP y a la densidad en los concentrados leucocitarios obtenidos por los métodos de tubos con EDTA o citrados, el sistema GloPRP o el sistema cl-PRP. A diferencia del sistema Easy-kit, los concentrados obtenidos con el resto de métodos solo mostraron aumentos en la fracción de linfocitos con respecto a SP y solo significativamente en el caso del sistema GloPRP (p=0.0024). La densidad de monocitos en los concentrados leucocitarios obtenidos con estos sistemas fue similar a SP y la de neutrófilos fue inferior y significativamente inferior con el sistema GloPPR (p= 0.033). El sistema cl-PRP no concentró CBs en su conjunto.

Figura 12. Concentración de neutrófilos, linfocitos y monocitos ($\times 10^6 / ml$) en SP y en los productos finales obtenidos por los diferentes sistemas examinados



^ap<0.0001 vs. Easy Kit y cl-PRP, p=0,033 vs. GloPRP. ^b p<0.0001 vs. Easy Kit y cl-PRP, p=0.0024 vs. GloPRP. ^cp<0.001 vs. Easy Kit and cl-PRP. ^dp≤0.0014 vs. todos los métodos para fracciones CB. ^ep≤0.0036 vs cl-PRP para fracciones de CB. ^fp≤0.0058 vs cl-PRP para fracciones de CB. ^gp≤0.013 vs. cl-PRP para linfocitos y monocitos. Diagrama de cajas: mediana; línea horizontal en el la caja definida por el IR; media; +, bigotes; mínimo a máximo.

La composición del concentrado de leucocitos estuvo también condicionada por la predilección de captura del sistema por algunos tipos de líneas de células blancas en detrimento de otras (tabla 5). Esta captura diferencial de células ocurrió independientemente del método de preparación de PRP seleccionado. Como refleja el cociente PRP:SP, la captura de linfocitos fue más favorable que la de neutrófilos o monocitos empleando cualquiera de los sistemas con capacidad para capturar CBs, y especialmente en los sistemas semicerrados o en el sistema GloPRP donde la captura de linfocitos prácticamente duplicó a la de neutrófilos. Esto indicó que los sistemas de concentración de sangre desequilibran las proporciones originales de leucocitos en SP aumentando la concentración relativa de linfocitos.

Tabla 5. Factor de incremento (cociente PRP:SP) de neutrófilos, linfocitos y monocitos en los concentrados leucocitarios obtenidos con los diferentes métodos de concentración de PRP propuestos

	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos
Easy PRP	2,07±0,90*	3,08±1,11 ⁺	3,13±1,34 ^{&}
EDTA	0,87±0,38	1,55±0,56	1,44±0,62
Tubo Citrado	0,83±0,36	1,48±0,53	1,37±0,59
GloPRP	0,60±0,26	1,87±0,67	1,11±0,47
cl-PRP[#]	-	-	-

Cociente PRP:SP≤1 indica ausencia de concentración desde SP

*p≤0.0065 vs. resto de métodos. ⁺p≤0.0148 vs. EDTA , tubo citrado y cl-PRP. [&] p≤0.014 vs. resto de métodos

[#]p≤0.0195 vs. tubo EDTA , tubo citrado y GloPRP.

10.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES MODIFICADORES DE LA CALIDAD DEL CONCENTRADO DE PLAQUETAS Y LEUCOCITOS OBTENIDO CON EL DISPOSITIVO CANDIDATO. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ENTRE INDIVIDUOS:

La población de voluntarios reclutada para este estudio de variabilidad (n=26) presentó una edad media de 62.32±23.43 años (rango 29.00-93.00) y un IMC medio de 25.04±5.13 (17.75-34.58) Kg/m². Entre los participantes, 7 sujetos presentaron historia clínica de diabetes mellitus tipo II, con una edad media de 80,43±10,97 años (70-93 años) y un IMC de 23,58±6,04 Kg/m² (17,75-34,58).

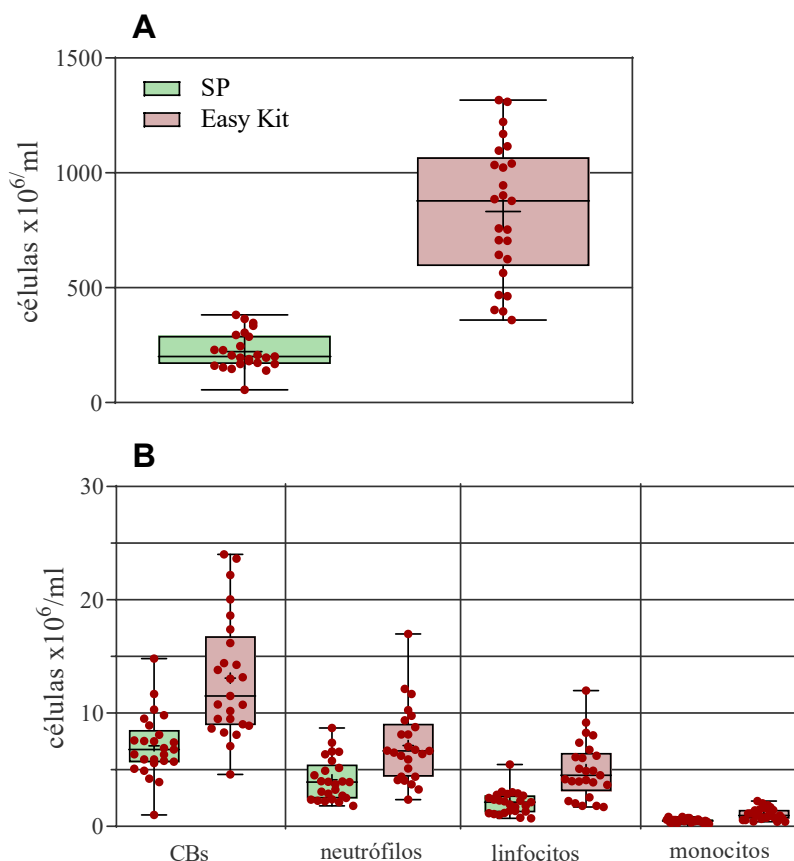
El recuento de células, plaquetas y CBs, en conjunto y de las fracciones de células blancas examinadas en SP y en los concentrados obtenidos con Easy kit se detallan en la tabla 6 y figura 13. Como refleja la figura 13 y de acuerdo al tamaño de las cajas (RI poblacional) y de la estratificación de los datos a lo largo de los bigotes, el recuento basal (SP) de CBs (%CV; 38,90% en conjunto, neutrófilos, 45,80%, linfocitos, 49,20% y monocitos, 33,14%) entre voluntarios fue muy variable comparada con la variabilidad en el recuento de plaquetas (35,9%). La densidad de plaquetas y leucocitos en los concentrados fue significativamente superior a la concentración basal en todos los sujetos. El sistema concentró x3,89 veces las plaquetas en SP, x1,98 veces los CBs y dentro de esta serie x1,98 los neutrófilos, x1,90, los linfocitos x2,80 y los monocitos x2,25 veces de media, indicando que la capacidad de captura de células del sistema fue dependiente del tipo de célula sanguínea (figura 14).

Tabla 6. Hematocrito basal y recuento de células $\times 10^6/\text{ml}$ en los productos finales (PRP-L) obtenidos con el sistema Easy Kit

Célula sanguínea	SP			PRP-L			P
	Media \pm DE (Rango)	Mediana (IR)	SW*	Media \pm DE (Rango)	Media (IR)	SW*	
Plaquetas	222.10 \pm 79.76 (56.00-382.00)	201.00 [122,50]	0.166	831.40 \pm 294.60 (359.00-1.317,00)	877.50 [474,80]	0.348	<0.001^b
CBs	7.10 \pm 2,76 (1,02-14,80)	6,79 [2.85]	0.293	13.10 \pm 5.33 (4.59-24.00)	11.52 [7.86]	0.080	<0.001^b
Neutrófilos	4,12 \pm 2.76 (1.81-8,70)	3.90 [3.01]	0.036	7.15 \pm 3,29 (2.36-16.99)	6.66 [4.67]	0.065	0.002^a
Linfocitos	2.78 \pm 1.02 (0,72-5,45)	2.15 [1.49]	0.096	5.01 \pm 2,57 (1.72-11.98)	4.52 [3.37]	0.110	<0.001^a
Monocitos	0.51 \pm 0.17 (0.20-0.84)	0.48 [0.22]	0.6610	1.08 \pm 0.52 (0.41-2.24)	0.96 [0.77]	0.126	<0.001^b

Abreviaturas: SP; sangre periférica. CBs; leucocitos. DE; desviación estandar. Rango (min.-max.). IR; rango intercuartílico. * SW; test de Shapiro-Wilk. ^aU test; ^bT-test para muestras independientes. Un valor de P < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Figura 13. Recuento de células sanguíneas en SP y en los productos finales concentrados por el sistema Easy kit. A; Plaquetas. B; CBs

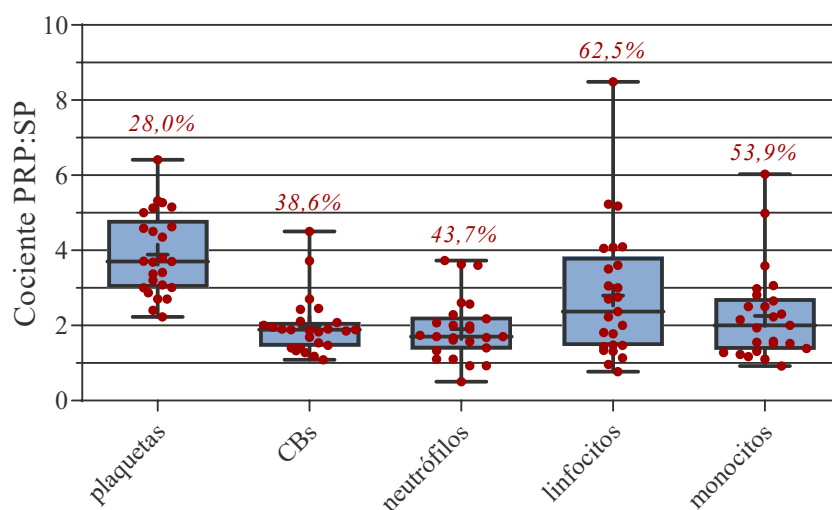


10. Resultados

Como refleja esta figura la variabilidad en la captura de células blancas fue extrema en comparación con la capacidad de captura de plaquetas. Esta variabilidad del sistema acentuó aún más la variabilidad del recuento de células basal (SP) entre sujetos, en los concentrados leucocitarios (%CV; CBs en conjunto, 40,70%, neutrófilos, 46,10%, linfocitos, 51,32% y monocitos, 48,03%) pero no en los concentrados de plaquetas (35,43%), indicando que el sistema actúa con cierta dependencia del sujeto.

La variabilidad en la captura de las diferentes células blancas contrastó con la aparente homogeneidad en la distribución de los datos de captura cuando los CBs fueron considerados en conjunto (panel superior), indicando que la captura de CBs en conjunto no define la captura diferencial de las diferentes fracciones blancas concentradas.

Figura 14. Factor de concentración de células (cociente PRP:SP) del sistema. En porcentaje se indica el cociente de variación



La concentración media de plaquetas y leucocitos en el hemograma basal de pacientes diabéticos ($197,49 \pm 96,13$ y $5,52 \pm 2,87$ células/ml de plaquetas y CBs respectivamente) y no diabéticos ($231,72 \pm 73,29$ y $7,72 \pm 2,54$ células/ml de plaquetas y CBs), no fue significativamente diferente (t-test; $P < 0,05$ de acuerdo a una $P > 0,05$ en test Shapiro Wilks). Sin embargo si se apreciaron diferencias ($P < 0,05$) en la composición de los productos finales obtenidos en los pacientes diabéticos ($697,88 \pm 329,29$ y $9,63 \pm 3,34$ células/ml para plaquetas y CBs, respectivamente) y no diabéticos ($883,30 \pm 272,13$ y $14,50 \pm 5,41$ células/ml para plaquetas y CBs).

10.1.4. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL CONCENTRADO DE ACUERDO AL AVANCE DE LA EDAD

Los datos demográficos de las poblaciones resultantes tras dividir a los participantes de acuerdo a la edad de corte de 65 años se muestran en la tabla 7. Con la excepción de la edad, el resto de variables demográficas estudiadas, IMC, altura y el peso siguieron una distribución gaussiana ($P > 0,05$; Shapiro Wilks). Solo la edad fue significativamente diferente entre ambos grupos de edad. Todos los sujetos diabéticos que participaron en el estudio se concentraron exclusivamente en el grupo de adultos mayores.

Tabla 7. Datos demográficos y análisis descriptivo de la población de estudio clasificada por grupos de edad

	Grupo control		Grupo adultos mayores		P
	n=13		n= 13		
	Media ± SD (rango)	Mediana (RI)	Media ± SD (rango)	Mediana (RI)	
Edad (años)	40.75±11.69 (29.00-64.00)	36.50 (11.75)	82.23 ± 8.82 (72.00– 93.00)	83.00 (17.50)	<0.001 ^a
Peso (Kg)	78.42±16.56 (53.00-113.00)	74.50 (16.00)	65.92± 14.02 (51.00 – 93.00)	64.00 (22.50)	0.053 ^b
Altura (cm)	173.08±8.05 (160.00-190.00)	171.50 (11.00)	166.1± 10.75 (152.00- 193.00)	165.00 (10.50)	0.080 ^b
IMC (Kg/m ²)	26.17±5.10 (18.34-34.11)	25.24 (9.16)	23.99± 5.12 (17.75- 34.58)	22.22 (8.03)	0.298 ^b

Abreviaturas: IMC; índice de masa corporal. DE; desviación estándar. Rango (min.–max.). RI; rango intercuartílico. ^aU- test. ^bT-test para muestras independientes. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

El recuento de plaquetas y leucocitos (por ml) en SP y en los productos finales concentrados para ambos grupos de edad se resume en la tabla 7. Como refleja esta tabla, el hemograma basal (SP) de los sujetos aleatorizados al grupo control presentó recuentos de plaquetas y leucocitos significativamente superiores ($P \leq 0.035$) al de los sujetos incluidos en el grupo de adultos mayores. En concreto en este grupo control, el recuento de plaquetas y leucocitos totales fue un 25% y un 30% superior y el de neutrófilos, linfocitos y monocitos específicamente, un 29%, 49% y 29% superior al del grupo de adultos mayores.

La concentración de plaquetas y CBs fue significativamente superior ($p < 0,001$ vs. SP) en los productos finales, independientemente del grupo de sujetos (Tabla 7). El dispositivo incrementó en 4 veces la concentración de plaquetas desde SP y en aproximadamente 2 veces la

concentración de CBs (figura 14). Sin embargo, dentro de la fracción blanca (ver comparación de métodos), la eficiencia de captura fue distinta para las diferentes fracciones de células blancas.

La eficiencia de captura del dispositivo en ambos grupos de sujetos, en función de la media y mediana poblacional de los cocientes PRP:SP de los diferentes tipos de células sanguíneas, fue prácticamente idéntica en ambos grupos de edad (Figura 14) aunque ligeramente más favorables para los sujetos del grupo control.

De esta forma y de acuerdo con las diferencias basales encontradas en el hemograma de SP, la densidad celular en el PRP preparado en cada grupo de edad fue marcadamente diferente. En concreto la concentración de plaquetas ($P=0,004$) y CBs ($p<0,001$) fue un 32 y 40% superior entre los sujetos del grupo control, al igual que la concentración de neutrófilos ($P=0,02$; 34%), linfocitos ($P<0,001$, 52%) y monocitos ($P=0,013$, 37%).

Atendiendo a la existencia de diabetes, no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) en la densidad de plaquetas y CBs en SP y en los productos finales de los sujetos con ($197,49\pm 96,13$ y $5,52\pm 2,87$ células/ml de plaquetas y CBs respectivamente) y sin diabetes ($182,00\pm 31,36$ y $6,28\pm 1,70$ células/ml de plaquetas y CBs) dentro del grupo de adultos mayores. Las diferentes fracciones de células blancas tampoco fueron significativamente diferentes en SP o en los productos finales.

10.1.5. VARIABILIDAD EN LA EFICIENCIA DE CAPTURA DE CÉLULAS ENTRE GRUPOS DE EDAD

A pesar de las similitudes en los parámetros poblacionales media y mediana, la distribución de los datos de captura de plaquetas y de las diferentes fracciones de células blancas fue heterogénea en ambos grupos de sujetos (figura 15). Como se observa en la figura, los cocientes PRP:SP se estratificaron a lo largo de un amplio rango de valores alrededor de la media, independientemente del tipo de célula y del grupo de edad (distribución de datos a lo largo de los bigotes) y también de forma diferente alrededor de la mediana (distribución de los datos dentro de la caja definida por el intervalo IR). La variabilidad en la captura de plaquetas y linfocitos fue más pronunciada en el grupo de adultos mayores, como demuestra la estratificación de datos a lo largo de los bigotes y la agrupación de las capturas en los límites del IR y por los mismos motivos, la variabilidad de células fagocitarias, neutrófilos y monocitos, fue más pronunciada en el grupo control. Esto indicó que el dispositivo exhibe un comportamiento específico en los diferentes sujetos con independencia de su edad.

Tabla 8. Concentración de plaquetas y CBs (células x10⁶/ml) en SP y en los productos finales (PRP-L) obtenidos con Easy kit en los grupos control y de adultos mayores

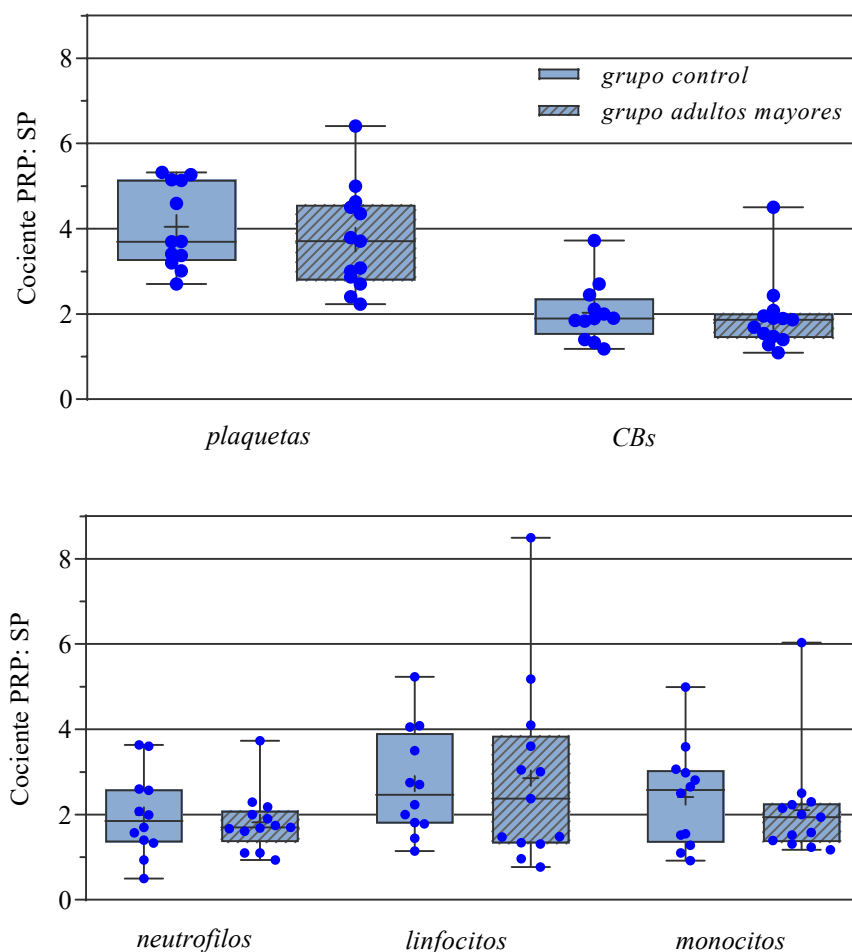
		Grupo control n=13			Grupo adultos mayores n=13			P
<i>Célula sanguínea</i>		Media ± DE (Rango)	Mediana (RI)	SW*	Media ± DE (Rango)	Mediana (RI)	SW*	
Plaquetas	SP	256.60±76.37 (153.00-382.00)	237.00 [124.50]	0.483	190.30±71.38 (56.0-347.00)	181.00 [58.00]	0.234	0.035^b
	PRP-L	999.2±241.6 (564.50-1317.12)	1029.00 [418.80]	0.766	676.50±256.70 (359.00-1116.00)	643.20 [478.30]	0.315	0.004
CBs	SP	8.44±2.64 (5.80-14.80)	7.56 [3.26]	0.036	5.70±12933 (1.02-10.30)	5.70 [2.90]	0.840	0.001^a
	PRP-L	16.80±5.37 (8.88-24.00)	16.80 [10.16]	0.492	9.89±2.69 (4.59-14.25)	9.48 [4.09]	0.968	0.001
Neutrofilos	SP	4.84±1.87 (2.26-8.70)	4.25 [3.13]	0.440	3.46±1.69 (1.81-7.38)	2.72 [2.25]	0.019	0.032^a
	PRP-L	8.71±3.84 (3.27-16.99)	8.74 [5.35]	0.818	5.71±1.86 (2.36-8.76)	6.38 [2.69]	0.813	0.020
Linfocitos	SP	2.75±0.95 (1.81-5.45)	2.60 [0.78]	0.003	1.46±0.62 (0.72-2.78)	1.32 [0.88]	0.128	<0.001^a
	PRP-L	6.85±2.29 (3.88-11.98)	6.49 [3.26]	0.561	3.31±1.38 (1.72-6.11)	3.67 [2.20]	0.150	<0.001
Monocitos	SP	0.60±0.15 (0.31-0.84)	0.59 [0.20]	0.644	0.42±0.14 (0.20-0.73)	0.42 [0.15]	0.645	0.006^b
	PRP-L	1.34±0.52 (0.67-2.24)	1.28 [0.97]	0.516	0.84±0.40 (0.41-1.69)	0.76 [0.57]	0.1967	0.013

Abreviaturas: SP; sangre periférica. CBs; leucocitos. DE; desviación estandar. Rango (min.-max.). RI; rango intercuartílico. * SW; test de Shapiro-Wilk

^aU test; ^bT-test para muestras independientes. Un valor de P < 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Figura 15. Factor de incremento de plaquetas y CBs (cociente PRP: SP) en los grupos control y de adultos mayores.

Panel superior; plaquetas y CBs. Panel inferior; fracciones de CBs.



10.1.6. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL CONCENTRADO ENTRE SUJETOS DE ACUERDO AL DIMORFISMO SEXUAL

La tabla 9 resume los datos demográficos de los sujetos separados según su género. Entre las variables demográficas, solo se detectaron diferencias en la altura entre hombres y mujeres.

Tabla 9. Datos demográficos y análisis descriptivo de la población de estudio clasificada por géneros

	Hombres n=13		Mujeres n= 13		p
	Media ± SD (rango)	Mediana (RI)	Media ± SD (rango)	Mediana (RI)	
Edad (años)	62.09±24.30 (29.00-92.00)	64.00 [48.00]	62.50 ± 23.65 (31.00– 93.00)	70.00 [49.75]	0.826 ^a
Peso (Kg)	75.36±17.29 (51.00-113.00)	76.00 [22.00]	69.21± 15.51 (52.00 – 103.00)	68.00 [23.75]	0.359 ^b
Altura (cm)	176.80±9.12 (166.00-193.00)	174.00 [14.00]	163.6± 6.23 (152.00- 174.00)	164.50 [10.30]	<0.001^b
IMC (Kg/m ²)	24.11±5.31 (17.75-34.11)	22.22 [8.00]	25.76± 5.05 (18.34- 34.58)	24.95 [7.66]	0.436 ^b

Abreviaturas: IMC; índice de masa corporal. DE; desviación estándar. Rango (min.–max.). RI; rango intercuartílico. ^aU- test. ^b T-test para muestras independientes. Un valor de P< 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

La tabla 10 muestra la densidad de plaquetas y CBs en SP y en PRP para ambos géneros. Tal y como se describe, el hemograma basal (SP) varió pronunciadamente entre los sujetos pertenecientes a un mismo género. Comparando ambos grupos, el recuento de plaquetas y CBs (en conjunto) fue mayor en hombres que en mujeres pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo el recuento diferencial de leucocitos estuvo fuertemente ligado al sexo; en hombres el recuento de linfocitos fue inferior ($P > 0.05$) y en mujeres el recuento de células fagocíticas fue significativamente inferior ($P = 0.035$ para neutrófilos y $P = 0.042$ para monocitos).

El sistema concentró significativamente a las plaquetas y CBs desde sangre periférica, tanto en hombres ($p \leq 0.01$) como en mujeres ($p < 0.008$) (tabla 10). La relación PRP: SP para plaquetas y fracciones de células blancas, no fue significativamente diferente entre ambos sexos (figura 16). Sin embargo el aumento en el factor de concentración no fue solo más favorable para las plaquetas y linfocitos (media 3,83 y 3,93 veces para hombres y mujeres y media 3,03 y 2,61 respectivamente) que para las células fagocíticas (neutrófilos, media 1,97 y 1,92 o monocitos, media 1,96 y 2,52 para hombres y mujeres) sino que se mostró dependiente del género; el factor de incremento de la concentración de plaquetas, neutrófilos y monocitos fue mayor en el grupo de mujeres y el factor de incremento de la concentración para linfocitos fue mayor en el grupo de hombres.

Entre géneros, los concentrados preparados por el sistema no mostraron diferencias significativas en los recuentos de plaquetas y CBs (en conjunto), persistieron las diferen-

cias preexistentes en SP para los neutrófilos ($p= 0,042$) pero no las diferencias significativas detectadas entre hombres y mujeres para los monocitos.

10.1.7. VARIABILIDAD EN LA EFICIENCIA DE CAPTURA DE CÉLULAS ENTRE INDIVIDUOS DE DIFERENTE GÉNERO

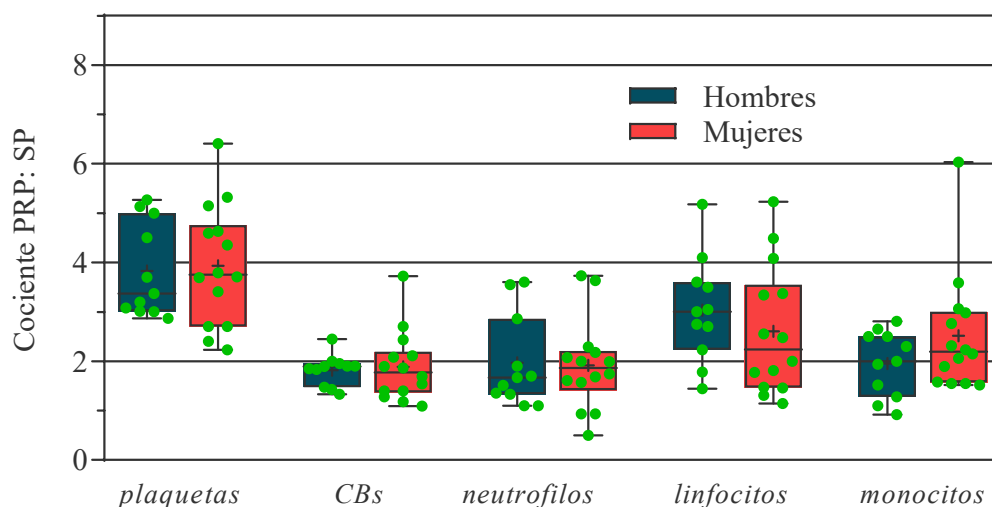
El cociente PRP: SP para plaquetas y CBs, figura 16, reflejó una fuerte variabilidad en la captura de células similar a la previamente descrita al dividir la población en grupos de edad (ver punto 10.1.4). Esta variabilidad en la captura de células fue más pronunciada para plaquetas y las diferentes fracciones de CBs y especialmente en el grupo de mujeres. Esta variabilidad no permitió demostrar diferencias significativas en la captura de células, de acuerdo a las medidas poblacionales, media y mediana, para ambos grupos de voluntarios pero si la observación de tendencias entre géneros. Estas tendencias explican el comportamiento específico del dispositivo en diferentes sujetos que se reflejó en el punto 10.1.4 (variabilidad de eficiencia entre sujetos según edad). De acuerdo a estas tendencias basadas en el género de los sujetos, el dispositivo demuestra una captura más favorable para algunas líneas celulares en los hombres y una captura más favorable para otras líneas de células en las mujeres.

Tabla 10. Concentración de plaquetas y CBs (células $\times 10^6/\text{ml}$) en SP y en los productos finales (PRP-L) obtenidos con Easy kit según el género de los sujetos

		Hombres n=13			Mujeres n=13			P
Célula sanguínea		Media \pm DE (Rango)	Mediana (RI)	SW*	Media \pm DE (Rango)	Mediana (RI)	SW*	
Plaquetas	SP	252.00 \pm 81.88 (161.00-382.00)	228.00 [158.00]	0.081	198.60 \pm 72.39 (56.00-334.00)	188.00 [104.80]	0.731	0.097 ^b
	PRP-L	926.00 \pm 222.40 (462.70-1222.00)	945.00 [337.50]	0.760	757.10 \pm 329.60 (359.00-1317.00)	674.90 [602.80]	0.177	0.159 ^b
CBs	SP	7.99 \pm 1.97 (1.02-11.70)	7.53 [3.09]	0.466	7.06 \pm 2.88 (3.90-14.80)	6.35 [3.02]	0.029	0.171 ^a
	PRP-L	14.55 \pm 4.72 (4.59-24.00)	13.80 [5.43]	0.092	12.67 \pm 5.29 (7.08-23.64)	9.48 [9.15]	0.036	0.180 ^a
Neutrofilos	SP	4.83 \pm 1.66 (2.26-8.70)	4.93 [3.03]	0.737	3.47 \pm 1.57 (1.81-6.59)	2.81 [2.30]	0.025	0.035^a
	PRP-L	8.33 \pm 1.60 (4.08-16.99)	8.12 [3.46]	0.313	5.98 \pm 2.70 (2.36-11.70)	5.51 [3.46]	0.277	0.018^b
Linfocitos	SP	1.94 \pm 0.85 (0.77-3.06)	1.93 [1.66]	0.196	2.19 \pm 1.15 (0.72-5.45)	2.20 [1.27]	0.026	0.848 ^a
	PRP-L	5.23 \pm 1.68 (3.67-8.26)	4.88 [2.79]	0.014	4.99 \pm 2.48 (2.23-11.98)	4.34 [2.89]	0.014	0.460 ^a
Monocitos	SP	0.58 \pm 0.17 (0.31-0.84)	0.57 [0.27]	0.721	0.45 \pm 0.15 (0.20-0.73)	0.45 [0.25]	0.956	0.042^b
	PRP-L	1.07 \pm 0.31 (0.67-1.60)	0.97 [0.63]	0.351	1.08 \pm 0.50 (0.41-2.24)	0.91 [0.79]	0.207	0.947 ^b

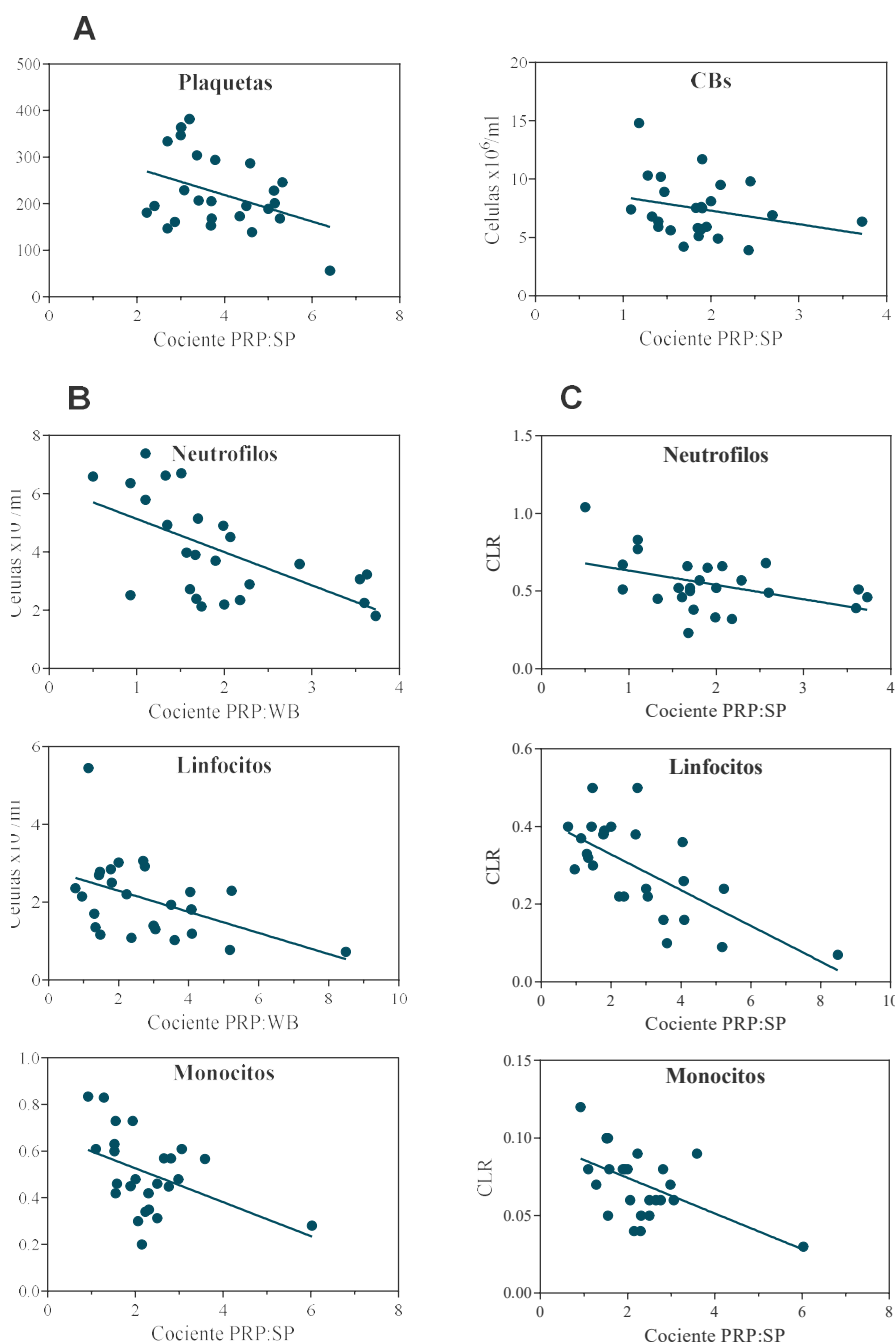
Abreviaturas: SP; sangre periférica. CBs; leucocitos. DE; desviación estándar. Rango (min.-max.). RI; rango intercuartílico. * SW; test de Shapiro-Wilk ^aU test; ^bT-test para muestras independientes. Un valor de P< 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Figura 16. Factor de incremento celular (cociente PRP:SP) en hombres y mujeres empelando Easy kit.



Estas diferencias, como se muestra en la figura 17, son inherentes al dispositivo y por lo tanto independientes del sexo o de la edad de los voluntarios. Como detallamos en esta figura 17, donde modelamos el cociente PRP:SP con la densidad en SP para cada tipo de célula o el cociente PRP:SP con el cociente CLR empleando los datos de todos los sujetos independientemente del género, la captura de células aumenta cuanto más reducida es la densidad de la línea celular en sangre periférica o mayor es la disminución del CLR. Esta tendencia es más pronunciada para los glóbulos blancos que para las plaquetas, de acuerdo a sus respectivos rangos específicos de eficiencia de captura. Esto indicaría que la eficiencia del dispositivo es dependiente del tipo de célula sanguínea a concentrar y de la densidad relativa de cada fracción en sangre periférica (la captura es más favorable cuanto menor es el tamaño de la célula y menor es la densidad relativa en sangre periférica). De esta forma, el sistema capturará más eficientemente un tipo particular de célula sanguínea en un grupo de sujetos si la densidad en sangre periférica para este grupo se encuentra disminuida con respecto a otro grupo de sujetos con el que es comparado (ver tabla 10 y figura 16).

Figura 17. Relación entre el cociente PRP:SP con la densidad de la línea celular en SP (A; plaquetas y CBs. B; neutrófilos, linfocitos y monocitos) y con el CLR (C; neutrófilos, linfocitos o monocitos : CBs)



A; plaquetas; $y=333.00 -28.50x$. CBs; $y=9.62-1.16x$

B; neutrófilos; $y=6.27-1.14x$. linfocitos; $y=2.83-0.27x$. monocitos; $y=0.67-0.07x$

C; neutrófilos; $y=0.72-0.09x$. linfocitos; $y=0.42-0.05x$. monocitos; $y=0.09-0.01x$

De acuerdo a la ecuación lineal $y=y_{intercept} + pendiente \cdot x$, donde y es la densidad o el CLR, $y_{intercept}$ es el valor de y donde la línea intercepta el eje Y, pendiente es la inclinación de la línea y x es PRP:SP.

10.1.8. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DEL CONCENTRADO ENTRE SUJETOS DE ACUERDO A LA EVOLUCIÓN DEL DIMORFISMO HORMONAL CON LA EDAD

La Tabla 11 muestra los recuentos de plaquetas y CBs en SP y en los productos concentrados para hombres y mujeres después de dividir ambas poblaciones según la edad que predispone a la menopausia en mujeres (50 años).

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de plaquetas en sangre periférica entre los diferentes grupos comparados. Sin embargo, se observaron diferencias pronunciadas en los CBs (en conjunto) (entre hombres o mujeres jóvenes vs. mujeres mayores) y en la composición de los leucocitos entre los diferentes grupos de edad-sexo; el recuento de células fagocíticas fue significativamente más bajo entre las mujeres con > 50 años en comparación con el resto de grupos (con menor recuento de neutrófilos en hombres más jóvenes que en mujeres más jóvenes> hombres mayores, y con menor recuento de monocitos en hombres mayores que en hombres más jóvenes> mujeres más jóvenes) y el recuento de linfocitos fue significativamente mayor en los grupos de edad <50 años, tanto intra (vs. voluntarios mayores) como entre géneros (hombres o mujeres más jóvenes vs. mujeres u hombres mayores), con las densidades más bajas en el grupo de hombres mayores.

Los cocientes PRP: SP en estos grupos de edad-sexo (figura 18) fueron prácticamente idénticos a las observadas para cada género. No obstante se observó una importante disminución de la variabilidad de captura celular que principalmente se concentró en la línea celular de monocitos para mujeres > 50 años.

La eficiencia de captura de plaquetas fue similar entre los diferentes grupos, mientras que la eficiencia de captura de CBS fue en línea con el punto 10.1.7. (punto de variabilidad según género) más favorable en los grupos con menor densidad de CBs circulantes en sangre periférica. Para los neutrófilos fue más óptima en hombres jóvenes y mujeres mayores y menos favorable en hombres jóvenes. Para monocitos fue mayor en mujeres > 50 años y menor en hombres jóvenes y, para los linfocitos fue más favorable en hombres mayores y menos favorable en mujeres > 50 años.

En los productos finales (tabla 11, ver producto PRP), las diferencias preexistentes entre grupos de edad y sexo en las densidades de células fagocíticas de SP se redujeron o incluso revertieron siendo significativas solo para los neutrófilos entre hombres jóvenes y mujeres mayores. En contraste con los linfocitos, las diferencias significativas en SP entre grupos de edad y sexo, persistieron en los productos finales.

En general, los glóbulos blancos en conjunto fueron significativamente más altos en los productos finales de hombres jóvenes (como en SP) y en hombres mayores que en mujeres mayores, pero no entre las mujeres como previamente se detectó en sangre circulante (SP).

Tabla 11. Recuento de células sanguíneas (media células $\times 10^6/\text{ml} \pm \text{DE}$; mediana [RI] en sangre periférica y en los productos finales (PRP-L) de hombres y mujeres clasificados de acuerdo a la edad de corte.

Línea de la sangre	Hombres						Mujeres					
	≤50 años (n=5)			>50 años (n=8)			≤50 años (n=5)			>50 años (n=8)		
	SP	PRP-L	SP	PRP-L	SP	PRP-L	SP	PRP-L	SP	PRP-L	SP	PRP-L
Plaquetas	269.40 ± 97.17	1026.00 ± 197.10	237.50 ± 72.79	842.40 ± 222.30	236.40 ± 72.73	905.10 ± 292.40	177.70 ± 66.96	674.80 ± 335.30	173.00 [77.50]	624.00 [534.00]	78.33 ± 10.77	75.00 [20.00]
	228.00 [186.50]	1096.00 [374.20]	212.00 [132.80]	911.30 [383.80]	207 [133.50]	902.40 [540.50]	173.00 [77.50]	624.00 [534.00]	173.00 [77.50]	624.00 [534.00]	78.33 ± 10.77	75.00 [20.00]
CBs	8.44 ± 2.36 [§]	16.43 ± 6.68 [§]	7.62 ± 1.73	13.00 ± 1.54 [†]	9.03 ± 3.44 [*]	15.86 ± 4.42	5.96 ± 1.95	10.90 ± 5.08	5.96 ± 1.95	10.90 ± 5.08	5.96 ± 1.95	10.90 ± 5.08
	8.10 [4.46]	16.20 [13.24]	7.52 [3.38]	13.42 [3.01]	7.60 [5.52]	17.40 [7.68]	5.60 [2.33]	9.48 [3.49]	5.60 [2.33]	9.48 [3.49]	5.60 [2.33]	9.48 [3.49]
Neutrofilos	4.45 ± 2.07 [§]	9.64 ± 1.14 ^{§&,**}	5.14 ± 1.35 ⁺⁺⁺	7.24 ± 0.97	5.27 ± 1.15 ^{**}	6.91 ± 2.68	2.47 ± 0.43	5.46 ± 2.72	2.47 ± 0.43	5.46 ± 2.72	2.47 ± 0.43	5.46 ± 2.72
	3.95 [4.00]	10.14 [2.12]	5.04 [2.35]	6.86 [1.80]	4.90 [2.23]	6.24 [4.97]	2.40 [0.65]	4.39 [2.84]	2.40 [0.65]	4.39 [2.84]	2.40 [0.65]	4.39 [2.84]
Linfocitos	2.56 ± 0.48 ^{§&}	6.37 ± 1.93 [*]	1.42 ± 0.73 [§]	4.29 ± 0.56 [§]	3.01 ± 1.43 [*]	7.23 ± 2.84 ^{**}	1.73 ± 0.70	3.74 ± 1.04	1.73 ± 0.70	3.74 ± 1.04	1.73 ± 0.70	3.74 ± 1.04
	2.70 [0.93]	6.75 [3.76]	1.25 [0.80]	4.08 [1.04]	2.50 [2.19]	6.23 [4.40]	1.70 [1.19]	3.64 [1.34]	1.70 [1.19]	3.64 [1.34]	1.70 [1.19]	3.64 [1.34]
Monocitos	0.63 ± 0.22 [§]	0.96 ± 0.34	0.54 ± 0.11 [†]	1.17 ± 0.28	0.58 ± 0.11 ^{**}	1.32 ± 0.34	0.37 ± 0.11	0.95 ± 0.54	0.37 ± 0.11	0.95 ± 0.54	0.37 ± 0.11	0.95 ± 0.54
	0.61 [0.40]	0.78 [0.57]	0.53 [0.18]	1.06 [0.51]	0.61 [0.22]	1.24 [0.60]	0.35 [0.17]	0.76 [0.64]	0.35 [0.17]	0.76 [0.64]	0.35 [0.17]	0.76 [0.64]

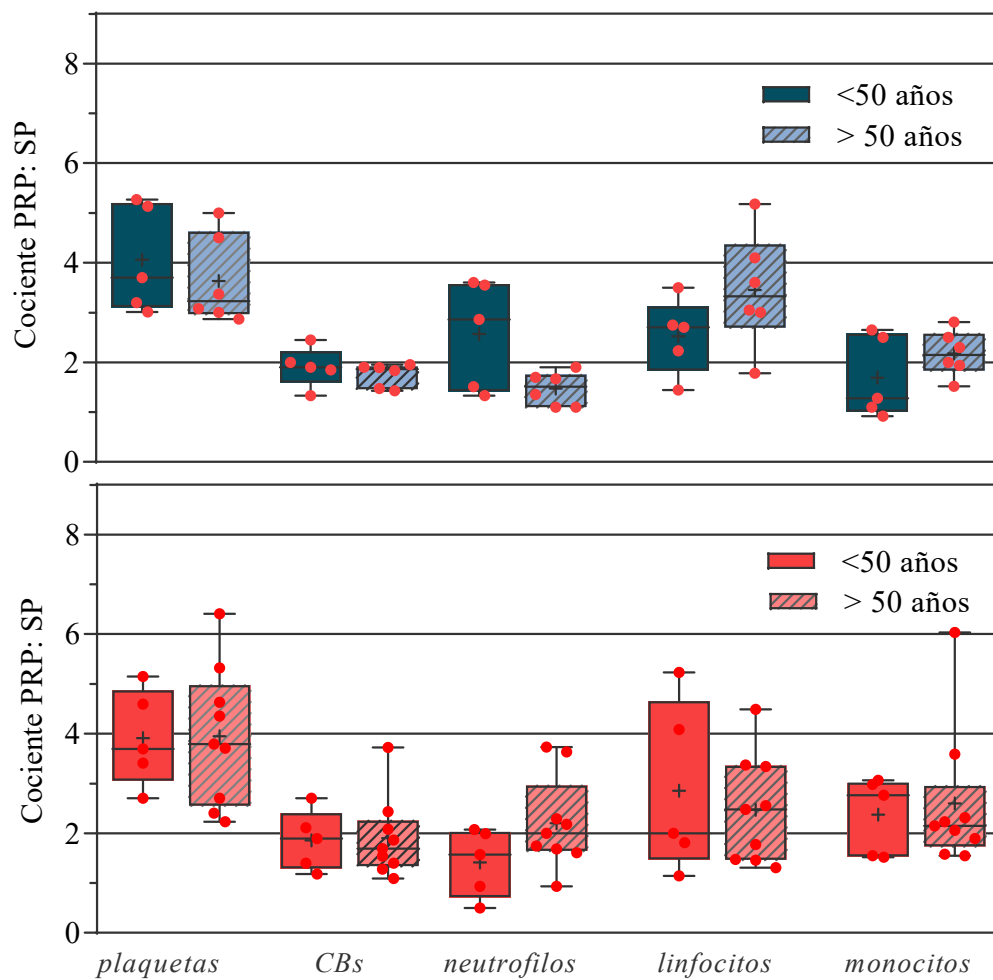
Abreviaturas: CBs, Leucocitos. DE, desviación estándar. RI, Rango intercuartílico. Análisis estadístico realizado de acuerdo al test de normalidad reportado en la tabla 9.

^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01 vs. SP or PRP-L entre grupos de edad en hombres o en mujeres

[†]p<0.05, ⁺⁺⁺p<0.001 vs. SP o PRP-L entre hombres y mujeres con <50 o >50 años de edad.

[§]p<0.05, ^{§&}p<0.01 vs. SP o PRP-L entre hombres < 50 años y mujeres > 50 años o entre hombres >50 años y mujeres < 50 años.

Figura 18. Factor de concentración celular (PRP: SP) en los grupos de sexo-edad con Easy-kit. Panel superior; hombres. Panel inferior; mujeres



10.2 APROXIMACIÓN *EX VIVO* PARA ESTABLECER EL EFECTO ANTIMICROBIANO DE NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS

10.2.1. DATOS DESCRIPTIVOS DE LOS VOLUNTARIOS

Las variables relativas a edad, peso, altura e índice de masa corporal (IMC) de los participantes se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Datos descriptivos de los voluntarios (n=3)

	Media±DE (IC95%)	Mediana [RI]
<i>Edad (años)</i>	53,67 ± 17,04 (11,34-95,99)	63 [30]
<i>Peso (kg)</i>	96.33 ± 20,82 (44,62-148)	103,00 [40]
<i>Altura (cm)</i>	175.30 ± 6.11 (160,2-190,5)	174 [12]
<i>IMC (Kg/cm²)</i>	31,13 ± 5,08 (18,50 43,76)	34,02 [8.85]

Abreviaturas: DE; desviación estándar. RI; rango intercuartílico. IC95%. Intervalo de confianza superior e inferior al 95%

10.2.2. HEMOGRAMA BASAL DE LOS PARTICIPANTES

El recuento medio de plaquetas y células blancas, incluyendo la fracción de neutrófilos determinada se resume en la tabla 13. La concentración de neutrófilos circulante en sangre se situó dentro de los parámetros habituales de individuos sanos (1,8-7,2 células x10⁶/ml). Para conseguir los concentrados requeridos en esta investigación se recurrió a un método de fraccionamiento secuencial y concentración de la sangre.

Tabla 13 . Hemograma simplificado (células $\times 10^6$ /ml) de los participantes en el estudio.

	Basal (sangre pura)	
	Media \pm DE (IC 95%)	Mediana [RI]
Plaquetas	294,7 \pm 44,74 (183,5-405,8)	304.00 [88]
Leucocitos	7,16 \pm 0,70(5,41–8,90)	7.53 [1.25]
Neutrófilos	3,71 \pm 0.42 (2.67-4.75)	3.93 [0.75]

Abreviaturas: DE; desviación estándar. RI; intervalo intercuartílico.

10.2.3. CONCENTRACIÓN DE NEUTRÓFILOS

Con la metodología propuesta, se consiguió una concentración de PMNs de referencia que osciló entre 2×10^8 PMNs/ml y 4×10^8 PMNs/ml. Esta concentración de referencia, se utilizó, como previamente se ha indicado en el punto 9.4.4. para establecer mediante dilución en HBSS+, las diferentes fracciones de dilución estudiadas.

10.2.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS NEUTRÓFILOS

El recuento de bacterias viables (en \log_{10} UFC/ml) antes de comenzar el experimento (basal) y tras 5 horas de incubación de SARM, SASM, *E. coli* y *P. aeruginosa*, en los medios; HBSS (control; C), suero (S), suero inactivado por calor (S*), PMNs en S a las concentraciones ensayadas (PMN-1 a PMN-6) y de PMNs en S* a las concentraciones ensayadas (PMN-1*-PMN-6*), se describe para cada voluntario en las figuras 15 y 16. Como reflejan estas figuras, la carga de bacterias cuantificada en las diferentes curvas experimentales no varió significativamente entre donantes, al margen de diferencias aisladas encontradas en los recuentos de algunas curvas para las cepas MRSA y *E. coli* producto de variaciones en el recuento basal o posibles errores metodológicos. Frente a *P. aeruginosa* la variabilidad entre voluntarios fue más pronunciada con recuentos significativamente inferiores en el voluntario 1 para la mayoría de curvas experimentales con PMNs, indicando que los componentes de la sangre de este voluntario contribuyeron a una evolución diferente del microorganismo. No se observaron diferencias significativas para esta cepa en las curvas experimentales de los voluntarios 2 y 3. En la figura 17, se representa el recuento medio de bacterias en las diferentes curvas experimentales tras agrupar a los tres sujetos. Como muestra esta figura, la carga bacteriana media de las cepas ensayadas al comienzo de los experimen-

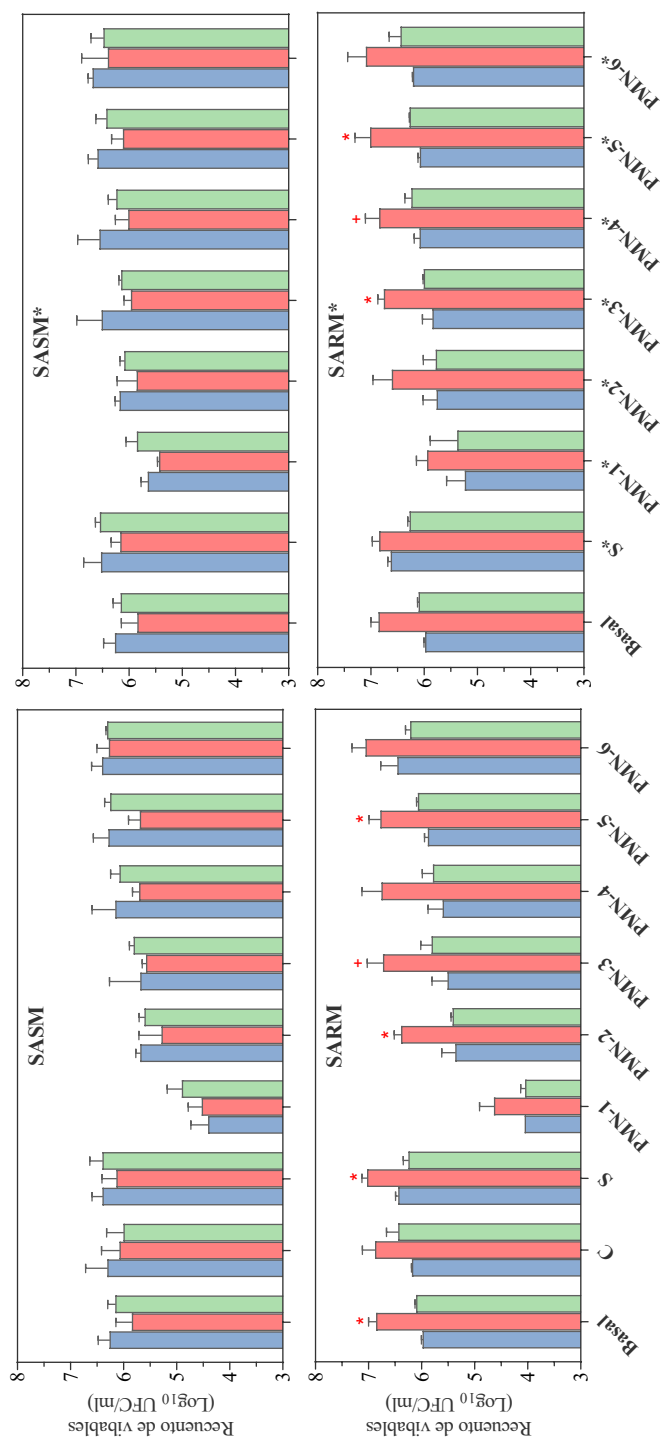
tos osciló entre los 6.1-6.3 log UFC/ml ($1,3-2 \times 10^6$ UFC/ml). En general, al finalizar la incubación, el recuento de bacterias viables se mantuvo constante o aumentó en las curvas control (HBSS, suero y suero e inactivado) y disminuyó en las curvas experimentales con PMNs, aunque dependiendo de la concentración de PMNs en el medio y de la presencia de suero activado o inactivado. El recuento bacteriano más bajo se observó en la curva de PMNs de mayor concentración (PMN-1) y en presencia de suero sin inactivar. El recuento de bacterias aumentó con la progresiva reducción de la concentración de PMNs en el medio. De acuerdo a esta tendencia, en las cepas MSSA y en *E. coli*, la concentración PMN-5 ya presentó un recuento de bacterias muy similar al recuento de inicio del experimento. Los recuentos en las curvas de PMNs con suero sin inactivar, fueron en comparación superiores en la cepa MRSA y muy inferiores en la cepa *P. aeruginosa*. La tendencia de las curvas con PMNs en el suero inactivado fue idéntica, pero globalmente, los recuentos bacterianos fueron superiores, indistintamente de la concentración o de la cepa estudiada.

Dada la multitud de comparaciones que se pueden establecer, nos centraremos exclusivamente en las más relevantes; las establecidas con respecto a los recuentos basales y entre las curvas experimentales de PMNs en suero sin inactivar e inactivado por calor. En los *S. aureus* (SASM o SARM), la carga de bacterias recuperada en la curva PMN-1 en suero sin inactivar, fue significativamente inferior a la carga basal y significativamente inferior a la carga de bacterias en el resto de curvas con PMNs en suero sin inactivar y de todas las curvas de PMNs en suero inactivado en el caso de la cepa SASM y de todas excepto PMN-1* en suero inactivado para la cepa SARM. El recuento en el resto de curvas experimentales con o sin PMNs en suero sin inactivar o inactivado no fue significativamente diferente al recuento basal. En ambas cepas, el recuento de PMNs en suero sin inactivar no fue diferente al las curvas homólogas en suero inactivado.

Frente a *E. coli*, en las curvas PMN-1 y PMN-2 en suero sin inactivar la carga fue significativamente más baja que la basal. Mientras PMN-1 presentó un recuento de bacterias significativamente inferior al del resto de curvas de PMNs con independencia del estado del suero, la carga de la curva PMN-2 solo fue significativamente más baja frente a las curvas más diluidas en PMNs (5 y 6) en suero sin inactivar y las curvas de PMNs (2 a 6) en suero inactivado. Los recuentos en presencia de concentrados de PMNs PMN 2 a 4 fueron significativamente inferiores en suero sin inactivar que en suero inactivado.

La fuerte variabilidad detectada entre voluntarios para *P. aeruginosa* solo permitió observar diferencias significativas en la carga de PMN-1 vs. la carga basal. No se encontraron diferencias entre concentraciones de PMNs homologas en suero sin inactivar o inactivado.

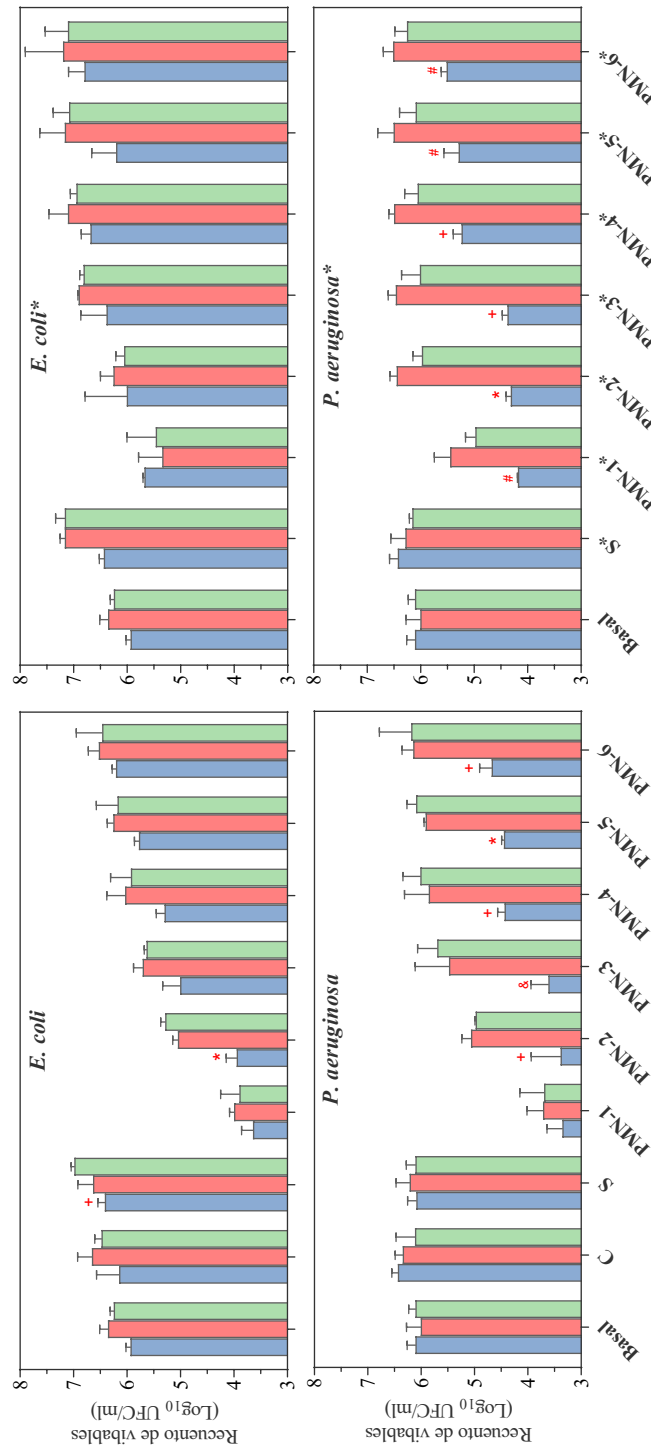
Figura 19. Variabilidad en el recuento de bacterias de SASM y SARM entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con PMNs



*P≤0.05 vs. resto voluntarios. +P<0.05 vs. voluntario 1

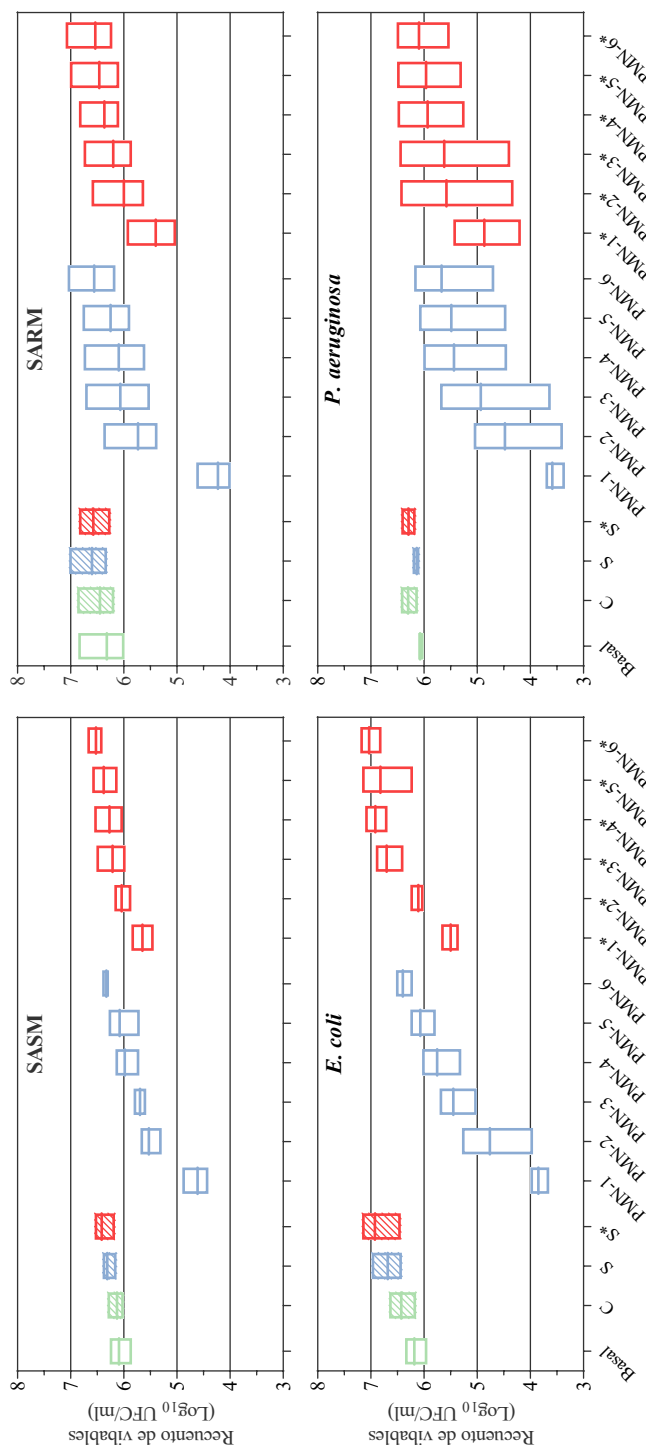
10. Resultados

Figura 20. Variabilidad en el recuento de bacterias de *E. coli* y *P. aeruginosa* entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con PMNs



* $p \leq 0.01$ vs. resto.voluntarios $^{\dagger}p < 0.05$ vs. resto voluntarios. $^{\S}p < 0.05$ vs. voluntario 3. $^{\#}p < 0.05$ vs. voluntario 2

Figura 21. Recuento medio de bacterias viables de *SASM*, *SARM*, *E. coli* y *P. aeruginosa* al comienzo y después de la incubación en las curvas control y en presencia de PMNs con suero sin inactivar e inactivado, agrupando a los tres sujetos que participaron en el estudio.



La línea horizontal dentro de la caja delimitada por el valor mínimo y máximo representa la media poblacional
SASM. P<0.01, PMN-1 vs. resto. P<0.01, PMN-2 vs. S, S* y PMN-6. P<0.05, PMN-3 vs. S*. P<0.05, PMN-1* vs. PMN-5* y PMN-6*. **SARM.** P<0.01, PMN-1 vs. resto
E. coli. P<0.01, PMN-1 vs. resto excepto PMN-2. P<0.01, PMN-2 vs. controles, PMN-5, PMN-6 y PMN-2*. P<0.01, PMN-3 vs. S* y PMN-3*. P<0.05, PMN-4 vs. PMN-4*. P<0.05, PMN-1* vs. controles S y S*, PMN-3* a PMN-6*. **P. aeruginosa.** P<0.05, PMN-1 vs. controles

10.2.5. MEDIDA DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS PMNS

El efecto antimicrobiano obtenido en las curvas experimentales, medido mediante el cambio en el recuento bacteriano (en Log UFC/ml) tras 5 horas de incubación con respecto al recuento basal, no fue significativamente diferente entre donantes para las cepas MSSA, MRSA y *E. coli* en línea con las mínimas diferencias encontradas anteriormente en los recuentos bacterianos entre voluntarios. En cambio, la variabilidad en los recuentos entre voluntarios frente a *P. aeruginosa*, se plasmó en diferencias acusadas del efecto antimicrobiano entre donantes. En suero sin inactivar, las curvas de PMNs, independientemente de la concentración, exhibieron respuestas significativamente superiores al resto de voluntarios. En suero inactivado la variabilidad de la respuesta fue mayor aún dado que a la mayor actividad del concentrado de PMNs del voluntario 1 se sumó una respuesta significativamente inferior en el voluntario 3 con respecto al 2 (figura 22).

El efecto antimicrobiano medio, tras agrupar a los sujetos, se representa en la figura 23.

Como muestra la figura, la incorporación de HBSS+, suero inactivado o suero inactivado no desarrolló efecto antimicrobiano frente a las cepas ensayadas que incrementaron la densidad de bacterias con respecto al inóculo inicial (0,04-0,74 Log UFC/ml). En presencia de PMNs siguió un patrón semejante en todas las cepas. En cambio, la presencia de PMNs en suero sin inactivar o inactivado presentó un efecto antimicrobiano pronunciado aunque dependiente de la concentración de PMNs en el medio. La máxima reducción de la carga basal se observó en presencia de los concentrados PMN-1 en suero sin inactivar, disminuyendo drásticamente en PMN-2 y progresivamente con cambios de actividad menos pronunciados, conforme se redujo la concentración de PMNs del medio. El suero inactivado disminuyó la respuesta de los PMNs comprada con la de sus homólogos en suero sin inactivar.

En la cepa SASM, el efecto antimicrobiano de PMN-1 en suero activado, -1,48 log UFC/ml ($P < 0.01$ vs. resto de curvas experimentales) disminuyó hasta -0.56 Log UFC/ml en el concentrado PMN-2 y a -0.39 Log UFC/ml en PMN-3. En estos dos últimos casos la actividad fue aun marcadamente superior a la de los controles y a los concentrados más diluidos en PMNs. En presencia de suero inactivado los concentrados PMN-1* (-0.68 Log UFC/ml) y PMN-2* (-0.08 Log UFC/ml) fueron significativamente más efectivos que el resto de curvas con PMNs en suero inactivado pero también significativamente menos activos con respecto a sus homólogos en suero activado. Esta tendencia fue similar

frente a la cepa SARM, con un efecto medio más pronunciado en el concentrado PMN-1 (-2.06 Log UFC/ml) y muy similares en el resto de curvas experimentales.

Con *E. coli* la disminución del efecto antimicrobiano siguió un patrón idéntico a *S. aureus* pero con efectos antimicrobianos más pronunciados en todos los concentrados de PMNS. Así, en suero sin inactivar, el concentrado PMN-1 alcanzó una reducción del inóculo inicial superior a los 2,30 Log UFC/ml ($P < 0.01$ vs. resto de curvas), que se redujo progresivamente en PMN-2, -1,42 Log UFC/ml ($P < 0.05$ vs. resto de diluciones de PMNs) y en PMN-3, -0.73 Log UFC/ml ($P < 0.05$ vs. curvas de PMNs más diluidas). A excepción de PMN-6, el resto de concentrados fueron significativamente más activos en suero activado.

El efecto medio de los concentrados frente a *P. aeruginosa* fue también mayor en la curva PMN-1 (2,69 Log UFC/ml). En PMN-3 incluso se observó una reducción superior a 1 Log UFC/ml. No obstante la variabilidad extrema entre voluntarios impidió observar diferencias más allá de las encontradas con la concentración PMN-1 sobre controles y PMNS más diluidos en suero inactivado.

10. Resultados

Figura 22. Variabilidad del efecto antimicrobiano observado en las curvas experimentales entre sujetos frente a *P. aeruginosa*. A modo de comparación se incluye la variabilidad sobre la cepa *SASM*

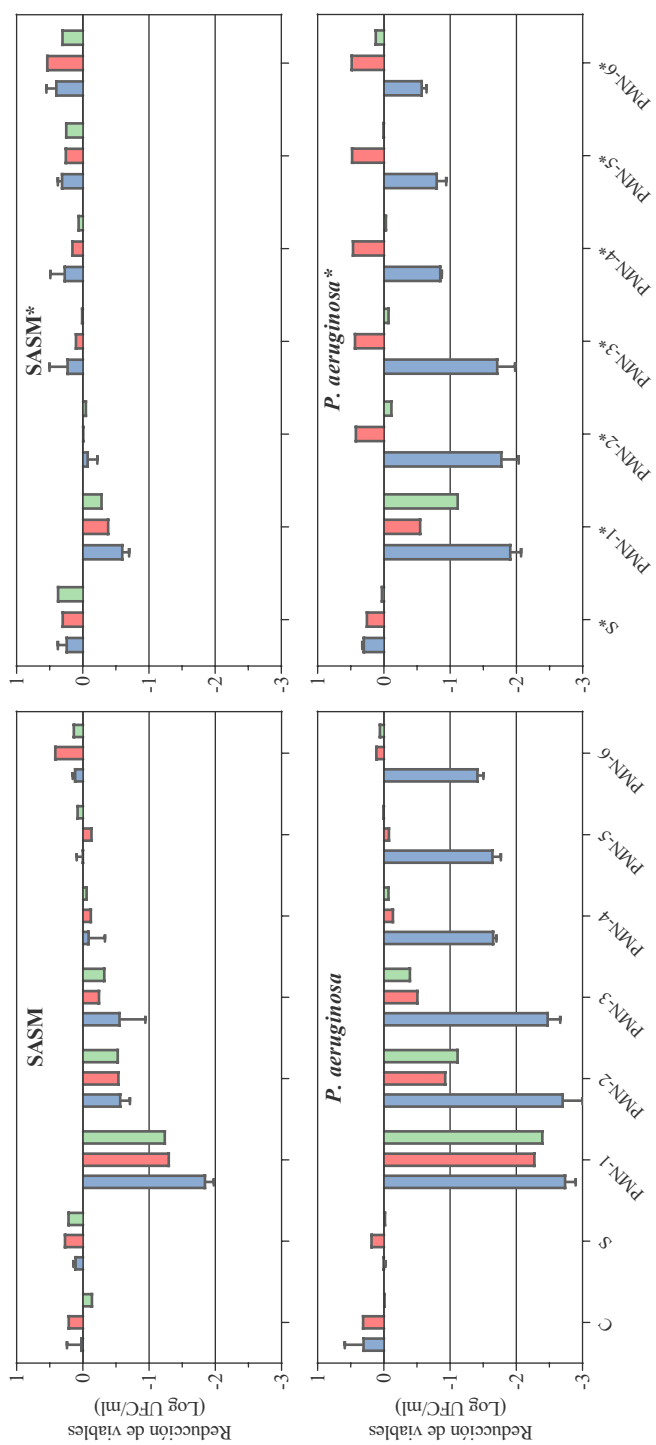
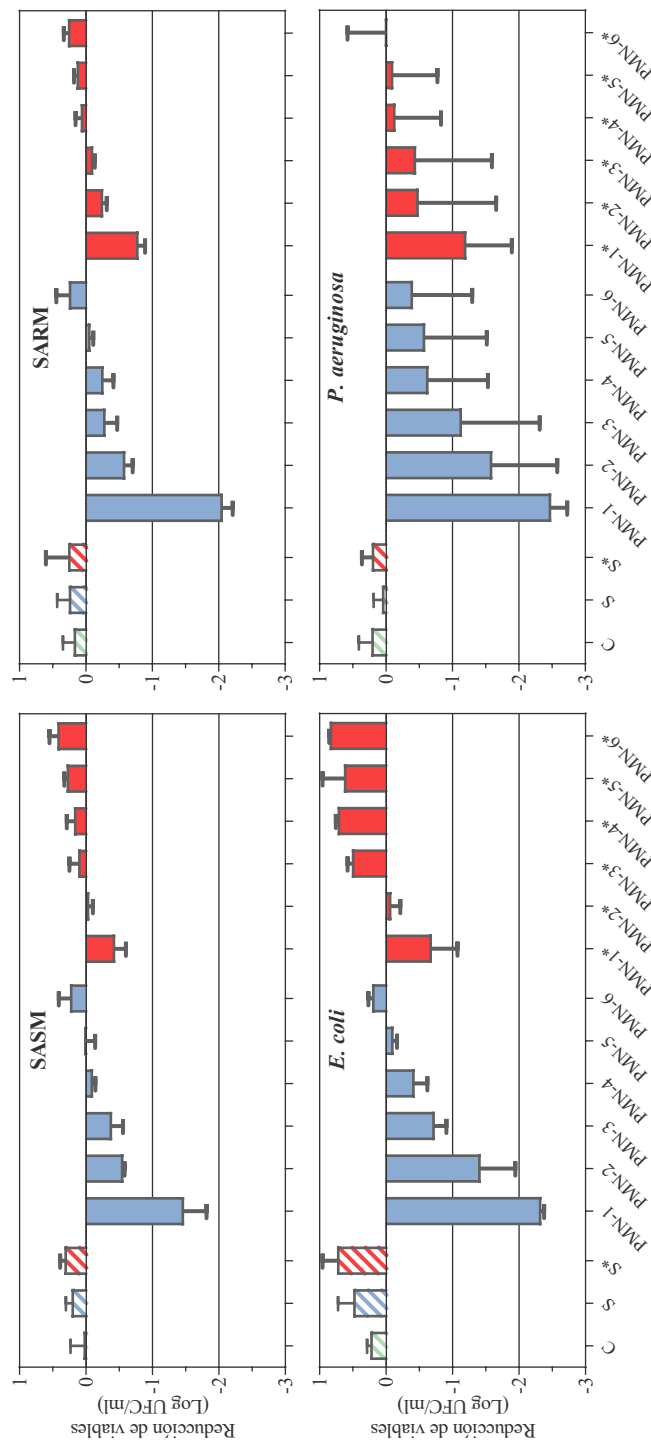


Figura 23. Efecto antimicrobiano medio, agrupando todos los sujetos, de los componentes del suero sin inactivar o inactivado frente a las cepas de ensayo



SARM. P<0.01 PMN-1 vs. resto. P<0.05 PMN-2 vs. controles, PMN-4-PMN-6 y PMN-2*. P<0.01 PMN-3 vs. controles, PMN-6 y PMN-3*. P<0.05 PMN-4 vs. S*. P<0.05 PMN-1* vs. controles y PMN-3*-PMN-6*. P<0.05 PMN-2* vs. PMN-6*. **SARM.** P<0.01 PMN-1 vs. resto. P<0.01 PMN-2 vs. controles y PMN-5 y PMN-6. P<0.05 PMN-3 y PMN-4 vs. controles y PMN-6. P<0.01 PMN-1* vs. controles y PMN-2-PMN-6. P<0.05 PMN-2* vs. controles y PMN-6*. **E. coli.** P<0.01 PMN-1 vs. resto. P<0.05 PMN-2 vs. resto, excepto PMN-1. P<0.01 PMN-3 vs. controles, PMN-6 y PMN-3*. P<0.05 PMN-4 vs. controles y PMN-4*. P<0.05 PMN-5* vs. C y S* y PMN-5*. P<0.01 PMN-1 vs. controles y PMN-3*-PMN-6*. P<0.05 PMN-2* vs. C, S* y PMN-4*-PMN-6*. **P. aeruginosa.** P<0.05 PMN-1 vs. controles y PMN-5* y PMN-6*

10.2.6. MODELO DOSIS RESPUESTA DE LOS PMNS

La relación entre el cambio en el recuento de bacterias frente a la concentración de PMNs (expresada en logC de PMNs) en presencia de suero sin inactivar o inactivado por calor, se estableció tras inspección visual de los trazados y ajuste de los datos empleando un modelado no lineal de dosis respuesta. De acuerdo al criterio informativo de Akaike, el ajuste de los datos empleando un modelo inhibitorio del efecto máximo (tres parámetros) fue con una probabilidad de entre el 77,8- >99,9% superior al del resto de ecuaciones no lineales comparadas.

Como se observa en las figuras 24, el trazado de las curvas del cambio de bacterias vs. logC PMNs (ver paneles a la izquierda de cada figura) para cada uno de los voluntarios frente a las cepas SASM, SARM y *E. coli* fue muy parecido. Estas similitudes se mantuvieron con independencia de la presencia de suero sin inactivar o inactivado por calor. La ecuación de tres parámetros ajustó fuertemente los datos individuales de cada voluntario frente al logC de PMNs para cada una de las cepas ensayadas. No obstante, este ajuste fue más robusto en presencia de suero sin inactivar que en presencia de suero inactivado, donde las diferencias de actividad frente al cambio en la concentración de PMNs fueron menos abruptas (MSSA, $r= 0,9026-0,9778$ y $r= 0,5108-0,8591$ para las curvas de PMNs en presencia de suero sin inactivar e inactivado respectivamente. MSSA, $r=0,9069-0,9875$ y $r=0,9573-0,9868$. *E. coli*, $r= 0,9483-0,9800$ y $0,5982-0,8909$).

Figura 24. *SASM. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.*

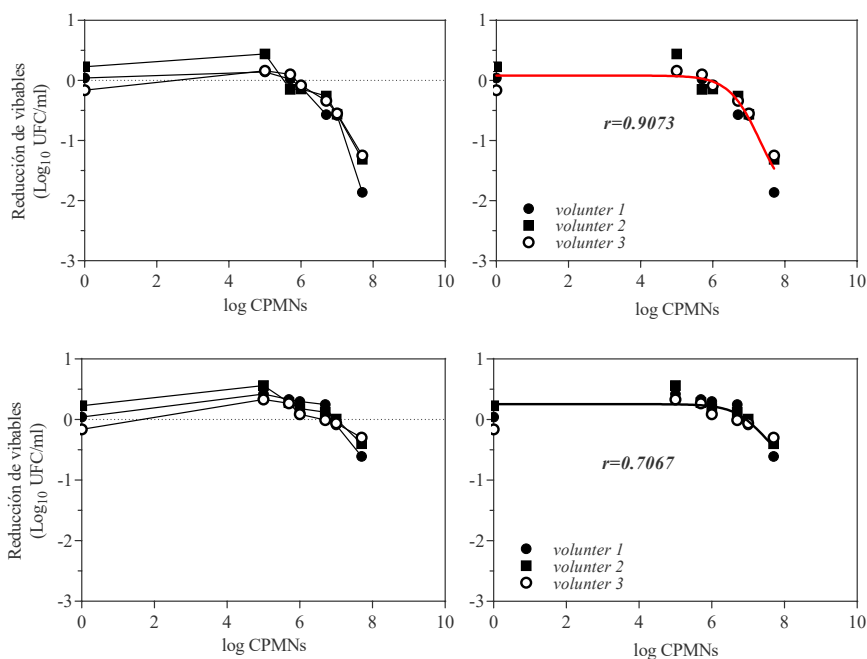
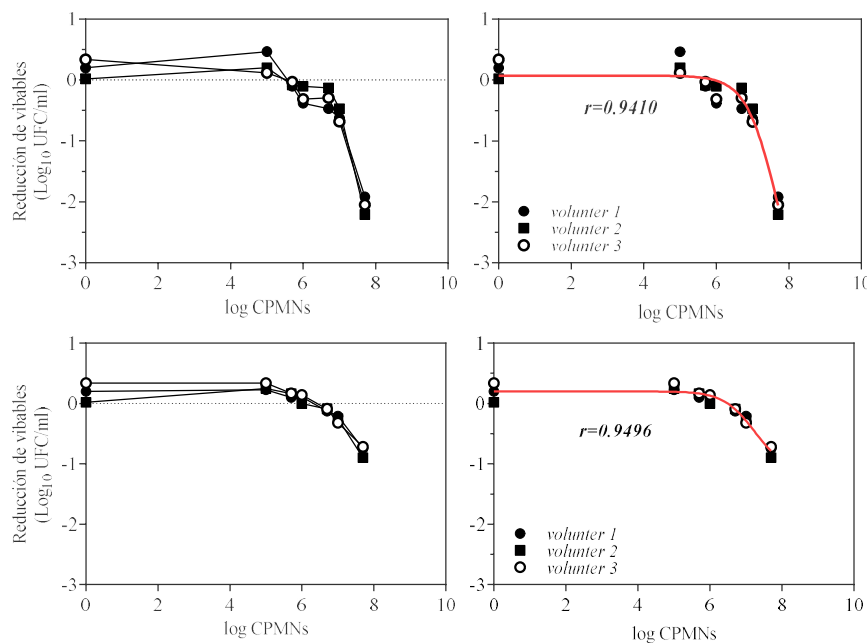


Figura 25. *SARM. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.*



10. Resultados

Figura 26. *E. coli*. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.

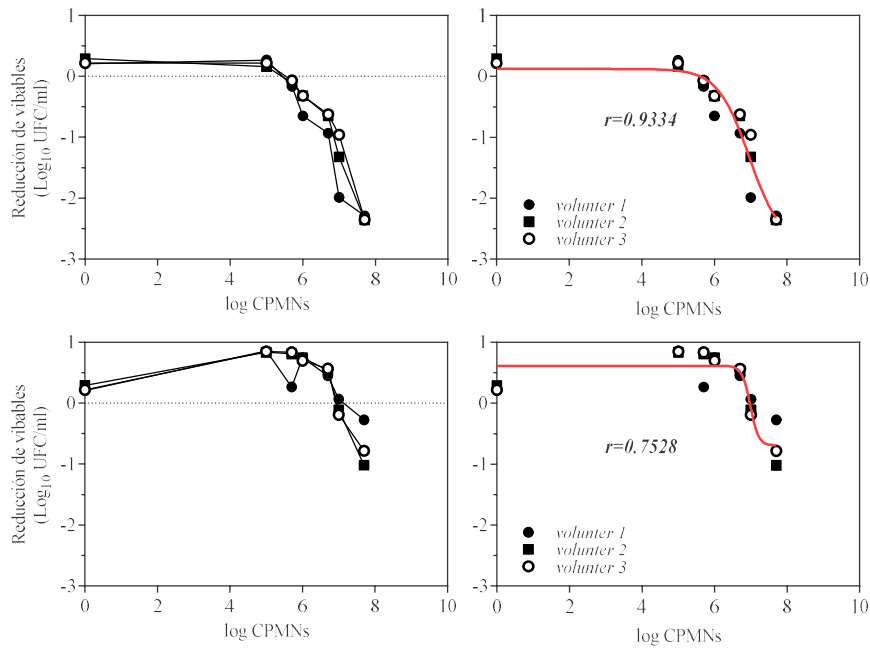
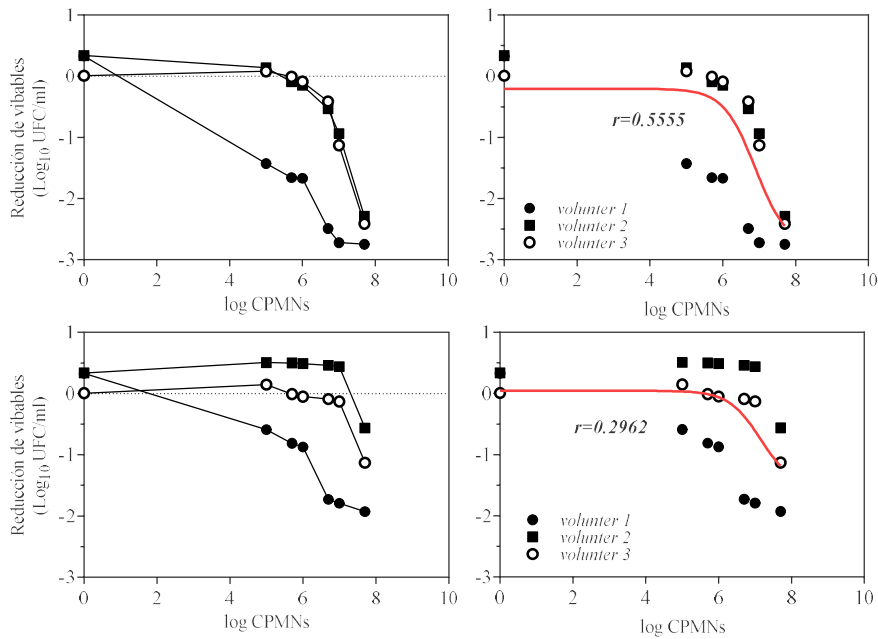


Figura 27. *P. aeruginosa*. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.



Con estas similitudes en las respuestas de los tres voluntarios, la ecuación de tres parámetros ajustó también fuertemente el efecto antimicrobiano vs. logC de PMNs

(paneles a la derecha de cada figura) cuando los datos de los tres voluntarios fueron modelados de forma conjunta para cada una de estas cepas, MSSA, MRSA y *E. coli*. El ajuste fue más moderado en comparación para las curvas de PMNs en presencia de suero inactivado (MSSA; $r=0.9073$ y 0.7067 , MRSA; $r=0.9410$ y 0.9496 , *E. coli*; $r=0.9334$ y 0.7528 para las curvas de PMNs en presencia de suero sin inactivar e inactivado por calor). La curva generada por el modelo a partir de los datos combinados de los tres voluntarios no fue significativamente diferente (análisis comparativo Ftest) a las curvas ajustadas por el modelo a partir de los datos de cada voluntario por separado (MSSA, $P=0.2145$ y $P=0.5433$; MRSA, $P=0.8256$ y $P=0.1067$; *E. coli*, $P=0.1318$ y $P=0.6680$, para las curvas de PMNs en presencia de suero sin inactivar e inactivado respectivamente).

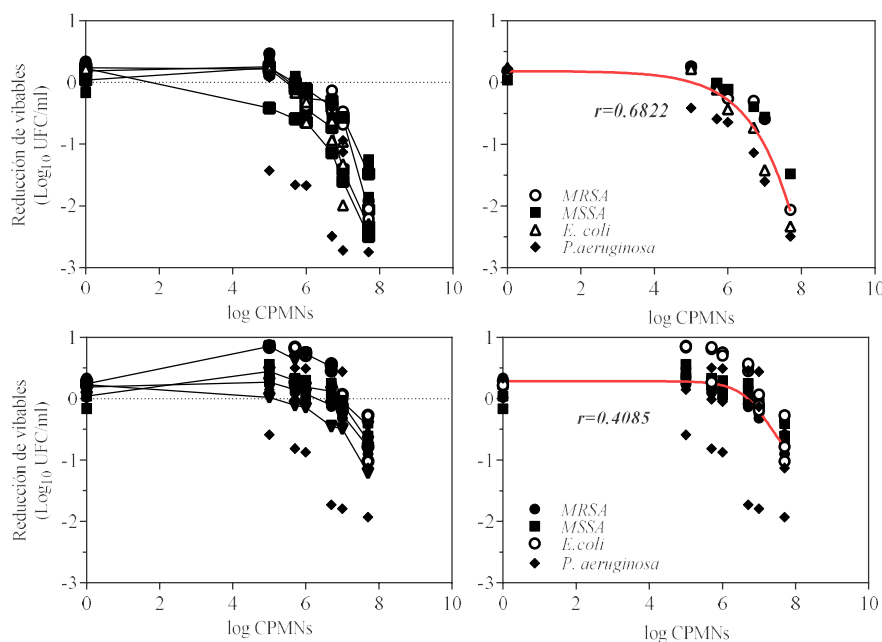
A diferencia, frente a *P. aeruginosa* (figura 27), la curva del efecto antibacterianos vs. $\log C$ de PMNs para los datos combinados fue significativamente diferente a las obtenidas con los datos de cada voluntario por separado ($P<0.0001$ y $P=0.0154$, Ftest para las curvas de PMNs en presencia de suero sin inactivar e inactivado por calor) y el ajuste de los datos drásticamente inferior ($r=0.5555$ y 0.2962 vs. $r=0.8985-0.9915$ y $r=0.9258-0.9787$ para los datos combinados vs. separados por voluntarios en las curvas de PMNs con suero sin inactivar e inactivado).

Estas diferencias en el modelado indicaron que las respuestas antibacterianas de los PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactivado frente a las cepas SASM, SARM y *E. coli* fueron independientes del voluntario pero no así la respuesta antibacteriana frente a *P. aeruginosa*, que claramente fue diferente para los distintos voluntarios.

Como era de esperar, de acuerdo a estas diferencias, la ecuación de tres parámetros ajustó peor el efecto antibacteriano vs. $\log C$ de PMNs (en suero sin inactivar o inactivado) combinando en un solo modelo ($P<0.0001$ F test) los datos de todas las especies ensayadas (figura 28).

10. Resultados

Figura 28 . Modelado dosis–respuesta con los datos combinados de todas las especies. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.



Del mismo modo, la curva dosis–respuesta obtenida combinando los datos de las cepas SASM y SARM (figura 29) fue significativamente diferente ($P=0.0056$ y $P=0.0006$ en presencia de suero sin inactivar e inactivado) a las curvas obtenidas para cada cepa de forma separada, sugiriendo que la respuesta antibacteriana es especie dependiente y cepa dependiente.

La magnitud de los parámetros que adquirió la ecuación que mejor define el cambio en el efecto antibacteriano con la variación de la concentración de PMNs, en presencia de suero sin inactivar y en presencia de suero inactivado, frente a cada una de las cepas, se resume en las tablas 14 , 15. Dado que el ajuste de los datos combinados de los tres voluntarios vs. el logC PMNs (en suero sin inactivar o inactivo) no fue significativamente diferente del ajuste de los datos de cada voluntario por separado para las cepas SASM, SARM y *E. coli* pero si para *P. aeruginosa* en este último caso se reflejan los parámetros de la ecuación que definió el ajuste dosis–respuesta individual para cada voluntario.

De esta forma, a partir del pronóstico generado por el modelo dosis–respuesta, la concentración mínima de PMNs, en suero sin inactivar o de PMNs en suero inactivado, que estimó el modelo no lineal como la requerida para conseguir reducir tras 5 horas de exposición, el recuento de bacterias basales en 0, 1 y 2 log UFC/ml para las cepas SARM, SASM, *E. coli* (ATCC) y *P. aeruginosa* (ATCC) se resume en la tablas 16 y 17.

Figura 29. Modelado dosis–respuesta con los datos combinados de todas las cepas de *S. aureus*. Panel superior; PMNs en presencia de suero sin inactivar. Panel inferior; PMNs en presencia de suero inactivado.

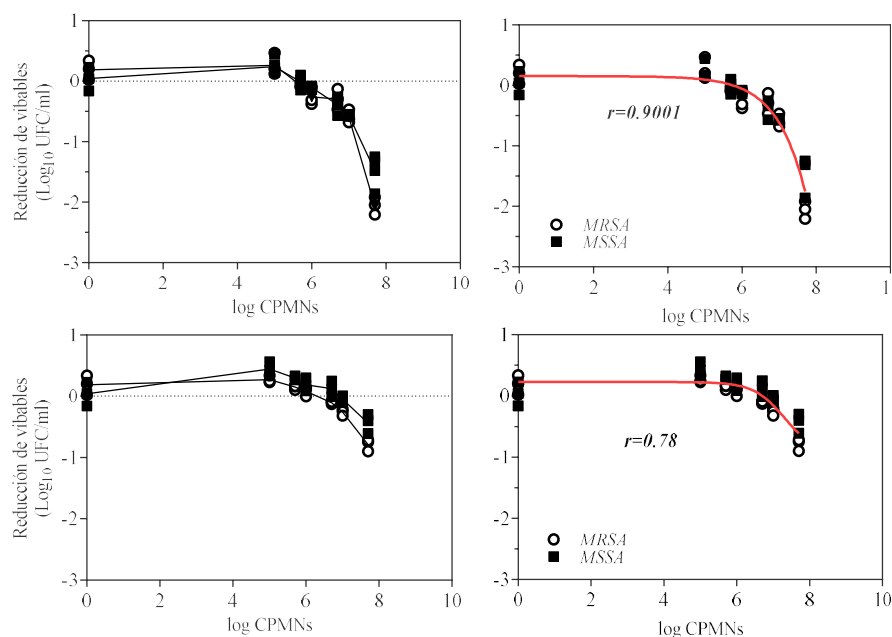


Tabla 14. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC PMNs en presencia de suero sin inactivar para SASM, SARM y *E. coli*. Los parámetros de la ecuación para *P. aeruginosa* reflejan la variabilidad en la respuesta entre voluntarios.

	MSSA	MRSA	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i> Vol 1	<i>P. aeruginosa</i> Vol 2	<i>P. aeruginosa</i> Vol 3
y_{max}	-2,112	-4,227	-2,771	-2,488	-3,262	-3,621
y_{min}	0,08223	0,07446	0,1238	0,2427	0,1346	0,06935
LogIC₅₀	7,322	7,708	6,963	5,043	7,309	7,382
IC₅₀	2,09x10 ⁷	5,11x10 ⁷	9,18x10 ⁶	1,10x10 ⁵	2,04x10 ⁷	2,41x10 ⁷
y_{min}-y_{max}	2,194	4,302	2,895	2,730	3,397	3,690

Emax; efecto máximo. Emin; efecto mínimo. IC50; concentración que origina el 50% del efecto máximo

10. Resultados

Tabla 15. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC PMNs en presencia de suero inactivado para SASM, SARM y E. coli. Los parámetros de la ecuación para P. aeruginosa reflejan la variabilidad en la respuesta entre voluntarios.

	MSSA	MRSA	E. coli	PA Vol 1	PA Vol 2*	PA Vol *3
y_{max}	-0,8486	-1,132	-1,492	-1,921	-	-
y_{min}	0,2549	0,2028	0,6516	0,05438	0,5083	0,04289
LogIC₅₀	7,471	7,244	7,460	5,842	11,79	11,33
IC₅₀	2,96x10 ⁷	1,75x10 ⁷	2,89x10 ⁷	6.96x10 ⁵	6,20x10 ¹¹	2,13x10 ¹¹
y_{min}-y_{max}	1,103	1,335	2,143	1,976	-	-

PA; P. aeruginosa. E_{max}; efecto máximo. E_{min}; efecto mínimo. IC₅₀; concentración que origina el 50% del efecto máximo

*algunos parámetros no fueron definidos adecuadamente debido a un pobre ajuste de los datos

El impacto de la inactivación del suero en la concentración de PMNs necesaria para conseguir un determinado efecto microbiológico, se describe a través del cociente S/S* o cociente entre la concentración mínima de PMNs en presencia de suero inactivado dividido concentración mínima de PMNs en presencia de suero sin inactivar. En el caso de P. aeruginosa los resultados se expresaron en forma de rango.

Tabla 16. Concentración mínima de PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactivado requerida para conseguir el efecto perseguido

	PMNs + S		PMNs + S*		S*/S
	LogC	C	LogC	C	
SASM					
0	5,91	8,17x10 ⁵	6,95	8,88x10 ⁶	10,87
-1	7,31	2,04x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
-2	>7,7	>5.00x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
SARM					
0	5,95	9,00x10 ⁵	6,50	3,14x10 ⁶	3,49
-1	7,23	1,70x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
-2	7,68	4,76x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
E. coli					
0	5,61	4,10x10 ⁵	6,97	9,41x10 ⁶	22,94
-1	6,77	5,83x10 ⁶	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
-2	7,40	2,53x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
P. aeruginosa^a					
0	4,03-5,92	1,08x10 ⁴ -8,40x10 ⁵	4,29-7,39	1,97x10 ⁴ -2,46x10 ⁷	1,83-29,29
-1	4,97-7,01	9,23x10 ⁴ -1,02x10 ⁷	5,90->7,7	7,96x10 ⁵ ->5x10 ⁷	4,56-8,63
-2	5,71-7,54	5,08x10 ⁵ -3,44x10 ⁷	>7,7	>5x10 ⁷	ND

S; PMNs en presencia de suero de los voluntarios. S*; PMNs en presencia de suero inactivado por calor.

LogC; concentración de plaquetas en logaritmo. C; concentración de plaquetas.

S*/S; cociente concentración de PMNs en S*/ concentración PMNs en S.

ND; no determinado^a

Tabla 17. Concentración mínima de PMNs en presencia de suero sin inactivar o inactivado requerida para conseguir el efecto perseguido en *P. aeruginosa* de acuerdo a la respuesta en cada voluntario

	PMNs + S		PMNs + S*		S*/S
	LogC	C	LogC	C	
Voluntario 1					
0	4,03	1,08x10 ⁴	4,29	1,97 x10 ⁴	1,83
-1	4,97	9,23x10 ⁴	5,90	7,96 x10 ⁵	8,63
-2	5,71	5,08x10 ⁵		>5x x10 ⁷	ND
Voluntario 2					
0	5,92	8,40x10 ⁵	7,39	2,46x10 ⁷	29,29
-1	7,01	1,02x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
-2	7,54	3,44x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND
Voluntario 3					
0	5,66	4,62 x10 ⁵	6,27	1,85x10 ⁶	4,00
-1	6,99	9,84 x10 ⁶	7,65	4,49x10 ⁷	4,56
-2	7,49	3,08 x10 ⁷	>7,70	>5.00x10 ⁷	ND

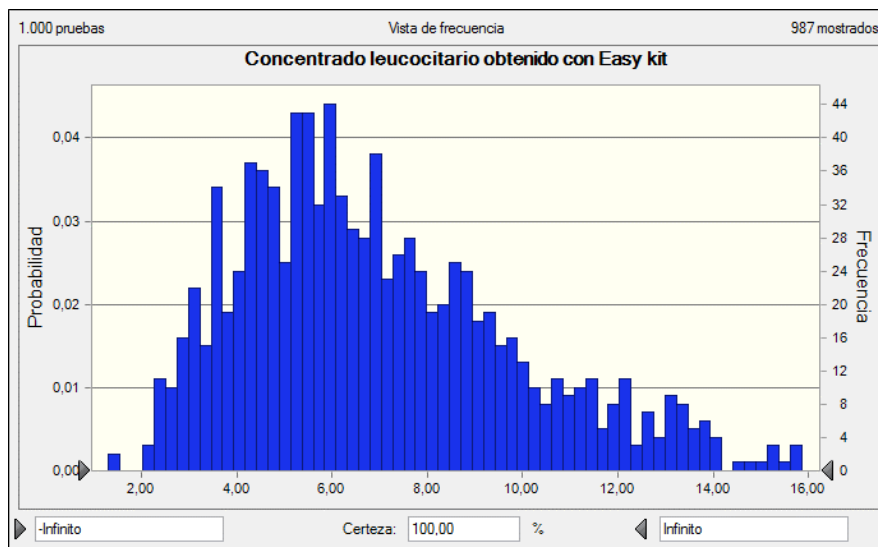
En líneas generales, concentraciones de neutrófilos en el medio de entre 5x10⁵-1x10⁶ neutrófilos/ml serían suficientes para iniciar una respuesta antimicrobiana frente a cualquiera de las cepas ensayadas en presencia de los componentes del suero sin inactivar. Estas concentraciones aumentarían sensiblemente en presencia de suero inactivado. En concreto y de acuerdo al cociente S*/S, las concentraciones necesarias serían del orden de aproximadamente 2 a 30 veces superiores. En presencia de suero sin inactivar, la obtención de efectos antimicrobianos de al menos 1 log UFC/ml de reducción de la carga basal requeriría de concentraciones de neutrófilos de entre 5x10⁶-2x10⁷ neutrófilos/ml frente a todas las cepas. En *P. aeruginosa*, como muestra la tabla S, estas concentraciones variarían sustancialmente entre voluntarios (tabla 17).

10.2.7. PROBABILIDAD DE ÉXITO DE LA INFUSIÓN DEL CONCENTRADO LEUCOCITARIO EN ÚLCERAS INFECTADAS

La simulación de Montecarlo (o simulación de la probabilidad de aparición del evento y frecuencia en largas poblaciones de acuerdo a una distribución natural observada en un pequeño grupo de individuos) desarrollada a partir del recuento de neutrófilos en los 26 sujetos que formaron parte del ensayo clínico desarrollado con el dispositivo Easy kit, se representa en la figura 30.

10. Resultados

Figura 30. Simulación de Montecarlo ($n=1000$ sujetos) a partir de los datos medios de neutrófilos obtenidos en los 26 voluntarios en el ensayo clínico con el dispositivo Easy kit



En la tabla 18 se muestra el porcentaje de pacientes que, de acuerdo a la densidad de neutrófilos conseguida con el sistema Easy kit, alcanzarían un efecto antimicrobiano equivalente al efecto estático (0 log UFC/ml de reducción) o un efecto equivalente a una reducción de la carga de al menos 1 log UFC/ml. En presencia de suero activo, un mayor porcentaje de pacientes conseguiría mantener, sin incrementos, la carga basal tras la administración de los concentrados de neutrófilos. Sin embargo, en presencia de suero inactivado por calor, el porcentaje de pacientes que conseguirían mantener este efecto descendería dramáticamente frente a las cepas MSSA, *E. coli* y los pacientes tipo equivalentes al voluntario 2, en el caso de *P. aeruginosa*. Como muestra la figura, solo un porcentaje muy reducido de pacientes conseguiría un efecto antimicrobiano de al menos 1 log UFC/ml de reducción de la carga basal. Este efecto solo podría alcanzarse frente a *P. aeruginosa* en la totalidad de sujetos que mostrasen un perfil equivalente al voluntario 1.

La cobertura de pacientes que alcanza este efecto de 1 log UFC/ml se reduce drásticamente con el resto de métodos y dispositivos capaces de concentrar leucocitos. Todos en cambio, cubrirían sin diferencias con respecto a Easy kit a todos los sujetos si se persigue un efecto antimicrobiano estático.

Atendiendo a las diferencias en los concentrados de neutrófilos de acuerdo al avance de la edad en hombres y mujeres, con la excepción de las mujeres de > 50 años, en todos los sujetos se conseguiría un efecto estático con la infusión de neutrófilos concentrados desde Easy kit. La extensión del efecto (1 log UFC/ml) se alcanzaría con mayor probabilidad en hombres jóvenes.

Tabla 18. Porcentaje de pacientes que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de neutrófilos obtenido con los diferentes dispositivos comerciales en úlceras infectadas por las cepas ensayadas. PA; *P. aeruginosa*

	Suero sin inactivar										Suero inactivado									
	Efecto	MSSA	MRSA	E. coli	PA vol.1	PA vol.1.1	PA vol.1.2	PA vol.2	PA vol.3	MSSA	MRSA	E. coli	PA vol.1	PA vol.1.1	PA vol.1.2	PA vol.2	PA vol.3			
Easy kit	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	23,56	94,41	19,56	100,00	100,00	0,00	0,00	99,74			
	-1	0,27	0,73	59,43	100,00	100,00	14,72	16,93	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	-	0,00	0,00			
	-2	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-		
Tubo EDTA	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	60,83	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	97,99			
	-1	0,00	0,00	2,96	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	-	0,00	-	0,00			
	-2	-	-	0,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-		
Tubo citrado	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,03	42,44	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	94,67			
	-1	0,00	0,00	5,83	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	-	0,00	-	0,00			
	-2	-	-	0,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-		
GloPRP	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	77,77			
	-1	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	100,00	-	0,00	-	0,00			
	-2	-	-	-	100,00	100,00	-	-	-	-	-	0,00	0,00	-	-	-	-			
cl-PRP	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

PA; *P. aeruginosa*. vol.; voluntario

Tabla 19. Porcentaje de pacientes, según sexo y edad, que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de neutrófilos obtenido con Easy kit en úlceras infectadas por las cepas ensayadas

Efecto	Suero sin inactivar										Suero inactivado									
	MSSA	MRSA	E. coli	PA vol.1	PA vol.2	PA vol.3	MSSA	MRSA	E. coli	PA vol.1	PA vol.2	PA vol.3	MSSA	MRSA	E. coli	PA vol.1	PA vol.2	PA vol.3		
Hombres <50 años	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	74,90	100,00	66,53	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00		
	-1	0,00	0,00	100,00	30,74	0,84	0,00	0,00	0,00	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-	-		
	-2	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	-		
Hombres >50 años	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	5,43	100,00	1,49	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00		
	-1	0,00	0,00	94,60	0,44	0,82	0,00	0,00	0,00	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-	0,00		
	-2	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	-		
Mujeres <50 años	0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	18,93	100,00	14,34	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00		
	-1	0,00	0,00	65,31	9,97	11,84	0,00	0,00	0,00	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-	0,00		
	-2	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	-		
Mujeres >50 años	0	99,89	99,86	100,00	99,98	100,00	11,41	83,99	9,12	100,00	0,00	100,00	0,00	99,89	0,00	100,00	0,00	99,23		
	-1	0,00	0,00	37,16	6,25	6,97	0,00	0,00	0,00	100,00	-	99,89	-	99,89	-	99,89	-	0,00		
	-2	-	-	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	0,00	-	-		

PA; P. aeruginosa. vol.; voluntario

10.2.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PLAQUETAS

10.2.8.1. Recuento de células sanguíneas en los concentrados sanguíneos conseguidos con el sistema clasico prp (Wego Clasic prp kit)

El recuento medio de plaquetas en el concentrado de plasma rico en plaquetas-PRP se resume en la *tabla 20*. La tabla refleja el resultado medio para los tres voluntarios a partir de tres determinaciones independientes en días distintos realizadas en un mismo voluntario.

Tabla 20. Recuento de células sanguíneas tras concentrar con el dispositivo.

	PRP (Wego classic PRP Kit)		P vs. SP
	Media \pm DS (IC 95%)	Mediana [IQR]	
Plaquetas	411,60 \pm 79.79 (213.40-609.80)	390.60 [155.40]	.2452
Leucocitos	-	-	.0001
Neutrófilos	-	-	.0001

Abreviaturas: DE; desviación estándar. RI; rango intercuartílico. P; significación estadística mediante el t-test para muestras pareadas. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. SP; sangre periférica.

Como refleja la tabla, aunque el sistema separó satisfactoriamente a las diferentes fracciones de la sangre, la concentración de plaquetas conseguida en el plasma rico en plaquetas fue superior pero no significativamente diferente a la observada en sangre pura. Este aspecto que no es objeto de discusión en el presente trabajo ha sido descrito con anterioridad por nuestro grupo poniendo de manifiesto la limitada eficiencia de algunos sistemas comerciales de separación y fraccionamiento de la sangre para la preparación de plasma rico en plaquetas.

El valor medio de plaquetas en el PRP de cada participante, determinado tras las visitas basales, se utilizó como concentración madre para la preparación de las concentraciones de plaquetas utilizadas en el ensayo. La dilución se efectuó como se expuso anteriormente con suero procedente de cada paciente.

12.3.7 RECuento DE BACTERIAS ANTES Y DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN A PLAQUETAS

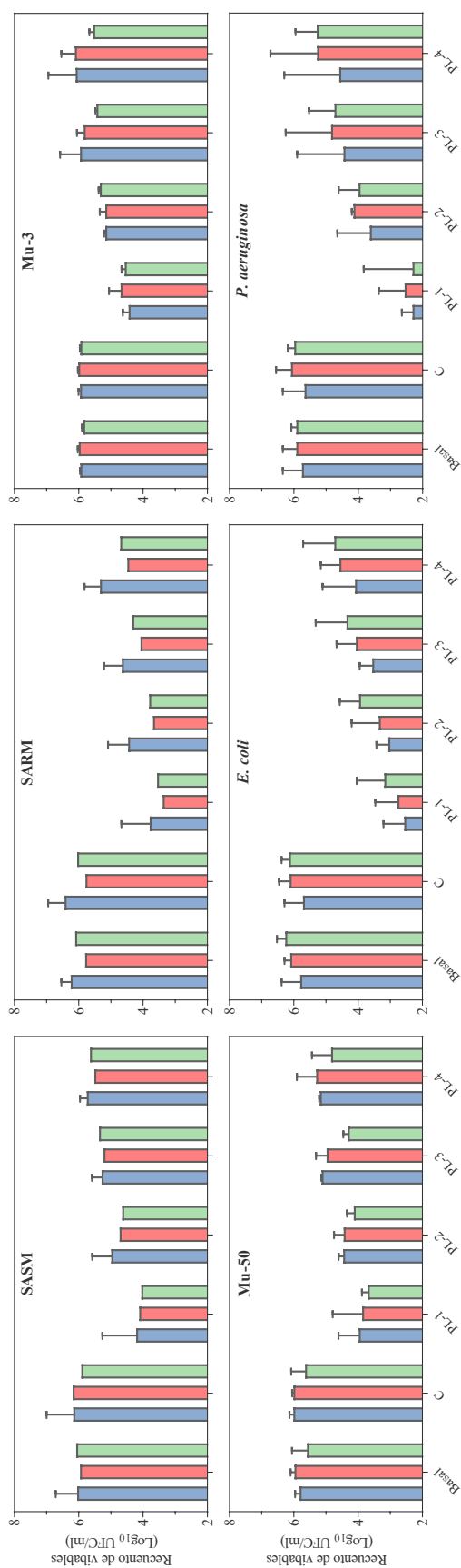
El recuento de bacterias viables (en log₁₀ UFC/ml) antes de comenzar el experimento (basal) y tras 5 horas de incubación en medio HBSS (control; C) y plasma rico en plaquetas, ajustado a las concentraciones ensayadas (PL-1 a PL-4), para las cepas SARM, SASM, Mu-3, Mu-50, *E. coli* y *P. aeruginosa* se muestra en la figura 31, según el donador y en la figura 32 con independencia del sujeto.

La variabilidad en el recuento bacteriano en las curvas experimentales, como se muestra en la figura 31, no fue significativa entre voluntarios. A diferencia de la variabilidad observada en las curvas con neutrófilos, los recuentos frente a *P. aeruginosa* fueron en este caso homogéneos entre donantes.

En líneas generales, el recuento medio de la carga basal para todas las cepas estudiadas osciló entre 5,80-6,06 log UFC/ml ($6,31 \times 10^5$ - $1,23 \times 10^6$ UFC/ml). Tras la incubación de las curvas experimentales, los controles presentaron una carga de bacterias semejante a la inicial. En cambio disminuyó progresivamente en las curvas con plaquetas conforme aumentó la concentración de plaquetas en el medio. Independientemente de la concentración de plaquetas, la carga de SASM, SARM, *E. coli* y *P. aeruginosa* fue significativamente más baja que la carga basal. En cambio frente a Mu-3 solo las cargas en PL-1 y PL-2 y las cargas bacterianas en PL-1, PL-2 y PL-3 frente a Mu-50, fueron significativamente inferiores a la carga basal.

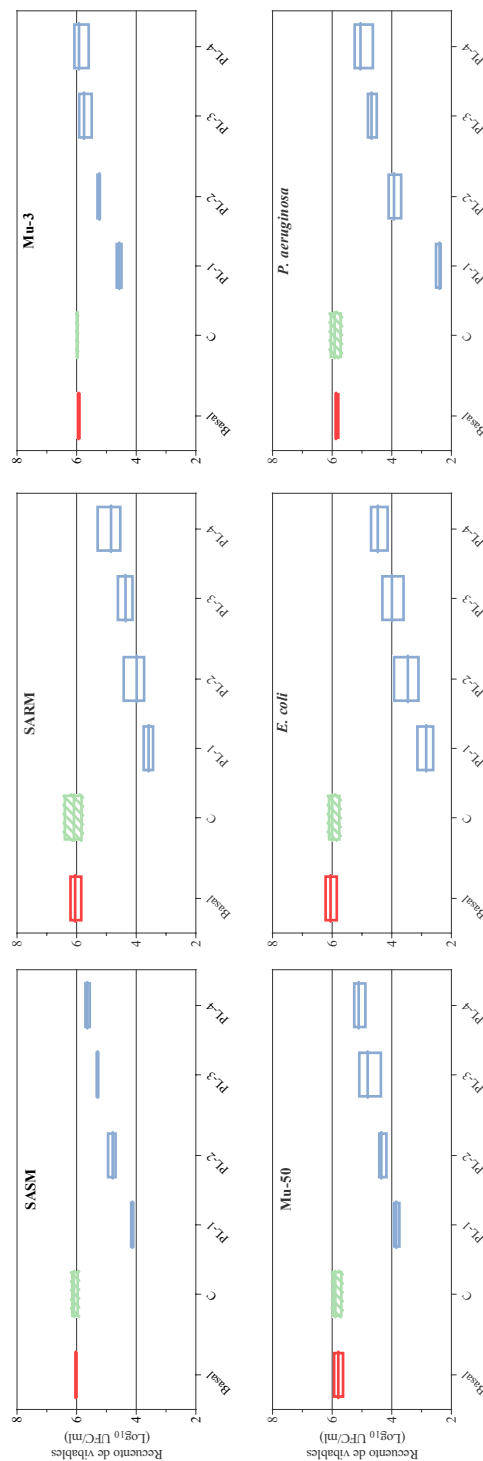
La carga en PL-1 fue significativamente inferior a la del resto de concentrados plaquetarios frente a las cepas SASM, Mu-3 y *P. aeruginosa*. En SARM solo lo fue frente a PL-4, y en Mu-50 y *E. coli* frente a los concentrados PL-3 y PL-4.

Figura 31. Variabilidad en el recuento de bacterias entre los sujetos participantes en las curvas control y en las curvas con plaquetas



10. Resultados

Figura 32. Recuento medio de bacterias viables al comienzo y después de la incubación en las curvas control y en presencia de plaquetas agrupando a los tres sujetos que participaron en el estudio.



SASM. P<0.01 PL-1 vs. resto. P<0.01 PL-2 vs. controles, PL3 y PL-4. P<0.01 PL-3 vs. controles y PL-4. P<0.05 PL-4 vs. controles.

SARM. P<0.01 PL1-PL-4 vs. controles. P<0.01 PL-1 vs. PL-4

Mu-3. P<0.01 PL-1 vs. resto. P<0.05 PL-2 vs. controles, PL-3 y PL-4

Mu-50. P<0.01 PL1-PL-3 vs. controles. P<0.01 PL-1 vs. PL-3 y PL-4. P<0.05 PL-2 vs. PL-4

E. coli. P<0.01 PL1-PL-4 vs. controles. P<0.05 PL-1 vs. PL3 y PL-4. P<0.05 PL-2 vs. PL-4

P. aeruginosa. P<0.01 PL1-PL-4 vs. controles. PL-1 vs. PL-2-PL4. P<0.05 PL-2 vs. controles, PL-3 y PL-4

10.2.8.3. Medida del efecto antimicrobiano de las plaquetas

El efecto antimicrobiano de los concentrados plaquetarios (reducción de la carga basal en log₁₀ UFC/ml) se resume la figura 33.

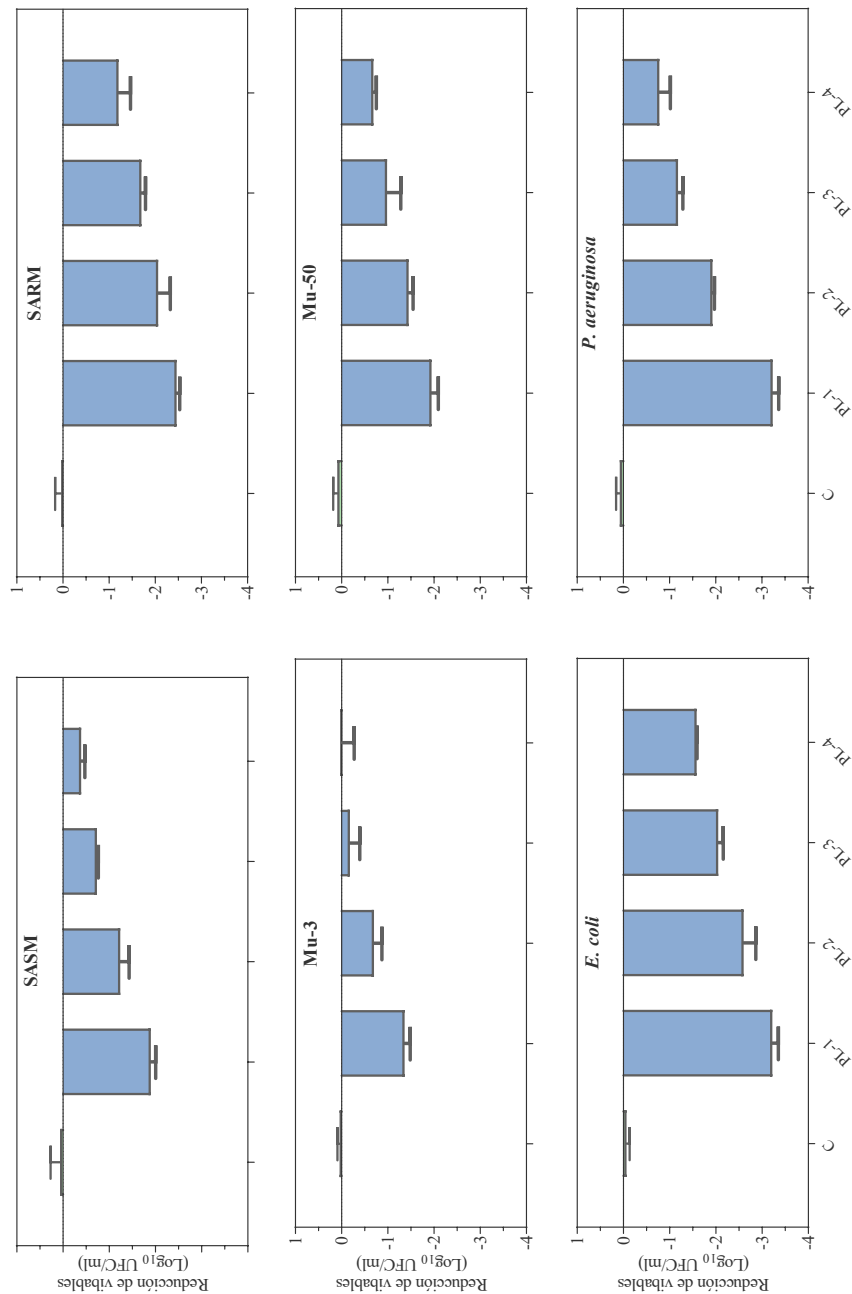
Como era esperable de acuerdo a los recuentos bacterianos observados en las diferentes curvas experimentales, la respuesta antibacteriana cuantificada no fue significativamente diferente entre voluntarios. En las curvas control (HBSS), la carga bacteriana media se mantuvo constante ($\approx 0-0,1$ Log UFC/ml) con respecto a la carga inicial al finalizar el experimento (figura 33). El efecto antibacteriano de las plaquetas aumentó dependientemente de la concentración de plaquetas en el medio y de la especie ensayada, siendo más elevado frente a las cepas *P. aeruginosa* o *E. coli* que sobre las cepas de *S. aureus*. En esta especie, el efecto de las plaquetas fue superior en la cepa SARM y más reducido frente a las variantes con determinantes de resistencia específicos a vancomicina, Mu-3 y Mu-50.

El efecto antimicrobiano máximo se observó en las curvas PL-1; -3.33 Log UFC/ml frente a *E. coli* y -1.50 frente a la cepa Mu-50. En todos los casos, el efecto antibacteriano se redujo progresivamente conforme disminuyó la concentración de plaquetas en el medio hasta -1.58 y -1,05 en *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente, y hasta -0.91 (MRSA) y 0.15 (Mu-3) entre los *S. aureus*. En efecto de los concentrados plaquetarios (cualquier concentración) fue significativamente superior comparado con el efecto del medio control en todas las cepas a excepción de Mu-3. Frente a esta cepa solo PL-1 y PL-2 mostraron diferencias significativas frente al control.

La concentración PL-1 fue significativamente más activa que el resto de concentraciones de plaquetas frente a las cepas a todas las cepas a excepción de Mu-3 donde PL1 y PL-2 no presentaron una actividad significativamente diferente. Como se resume en esta figura 33, en las cepas Mu-50, *E. coli* y *P. aeruginosa* también se observaron fuertes diferencias entre las concentraciones más diluidas de plaquetas.

10. Resultados

Figura 33. Efecto antimicrobiano medio, agrupando todos los sujetos, en presencia y ausencia de plaquetas frente a las cepas ensayadas



SASM. $P < 0.01$, PL-1-PL3 vs. control. $P < 0.05$, PL-4 vs. control. $P < 0.01$, PL-1 vs. resto. $P < 0.01$, PL-2 vs. PL-3 y PL-4.

SARM. $P < 0.01$, PL-1-PL4 vs. control. $P < 0.01$, PL1 vs. PL3 y PL-4. $P < 0.01$, PL2 vs. PL-4. $P < 0.05$, PL-3 vs. PL-4.

Mu-3. $P < 0.01$, PL-1 vs. resto. $P < 0.05$, PL2 vs. control y PL-3 y PL4.

Mu-50. $P < 0.01$, PL-1-PL4 vs. control. $P < 0.05$, PL-1 vs. PL-2-PL4. $P < 0.05$, PL-2 vs. PL3 y PL-4.

E. coli. $P < 0.01$, PL-1-PL-4 vs. control. $P < 0.01$, PL-1 vs. PL-2-PL4. $P < 0.01$; PL2 vs. PL-3 y PL-4. $P < 0.05$, PL-3 vs. PL-4.

P. aeruginosa. $P < 0.01$, PL-1-PL-4 vs. control. $P < 0.01$, PL-1 vs. PL-2-PL4. $P < 0.01$, PL2 vs. PL-3 y PL-4. $P < 0.05$, PL-3 vs. PL-4.

12.3.9. MODELO DOSIS-RESPUESTA DE LAS PLAQUETAS

La relación entre el cambio en el recuento de bacterias frente a la concentración de plaquetas expuestas (expresadas en logC de plaquetas) se estableció tras inspección visual de los trazados y ajuste de los datos empleando un modelado no lineal de dosis respuesta. De acuerdo al criterio informativo de Akaike, el ajuste de los datos empleando un modelo inhibitorio del efecto máximo (tres parámetros) fue con una probabilidad de entre el 89- >99,9% superior al del resto de ecuaciones comparadas.

Como se observa en las siguientes figuras (33, 35) el trazado de las curvas del cambio de bacterias vs. logC plaquetas para cada uno de los voluntarios en las diferentes especies, fue muy similar. De esta forma, las curvas obtenidas al combinar los datos de los tres voluntarios en un único modelo (datos combinados) no fue significativamente diferente en las diferentes especies ensayadas (MSSA, P=0.9426; MRSA, P=0.8320; Mu-3, P=0.4105; Mu-50, P=0.7712; *E. coli*, P=0.9891; *P. aeruginosa*, P=0.9953 para el modelado de los datos por separado vs. combinado empleando el FTest).

Como se refleja en las figuras el modelo arrojó un ajuste robusto de los datos (MSSA; r=0.9042, MRSA; r=0.9237, Mu-3; r=0.9268, Mu-50; r=0.8563, *E. coli*; r=0.9063, *P. aeruginosa*; r=0.9025) similar al ajuste de los datos para los diferentes voluntarios por separado (MSSA; r=0,9324-0,9579. MSSA; r=0.8897- 0,9809. Mu-3; 0,8758-0,9945. Mu-50; r=0,8680-0,9435. *E. coli*; r=0,8856-0,9340. *P. aeruginosa*; r=0,8735-0,9306).

En cambio, las curvas obtenidas tras modelado combinado de los datos de todas las especies o de las cepas de *S. aureus* (MRSA, MSSA, Mu-3 y Mu-50), figuras 32 y 33, fueron significativamente diferentes (P<0.0001) a las obtenidas a partir del modelado de cada cepa por separado.

Esto indicó que los parámetros del modelo inhibitorio de efecto máximo fueron semejantes para los diferentes voluntarios frente a una cepa bacteriana en particular, pero diferentes entre cepas de la misma especie o de diferentes especies. Consecuentemente el pronóstico de la eficacia antibacteriana de las plaquetas es independiente del voluntario pero es dependiente de la cepa y de la especie bacteriana expuesta.

10. Resultados

Figura 34. Modelado dosis respuesta para cepas diferentes de *A. E. coli*. B; *P. aeruginosa*

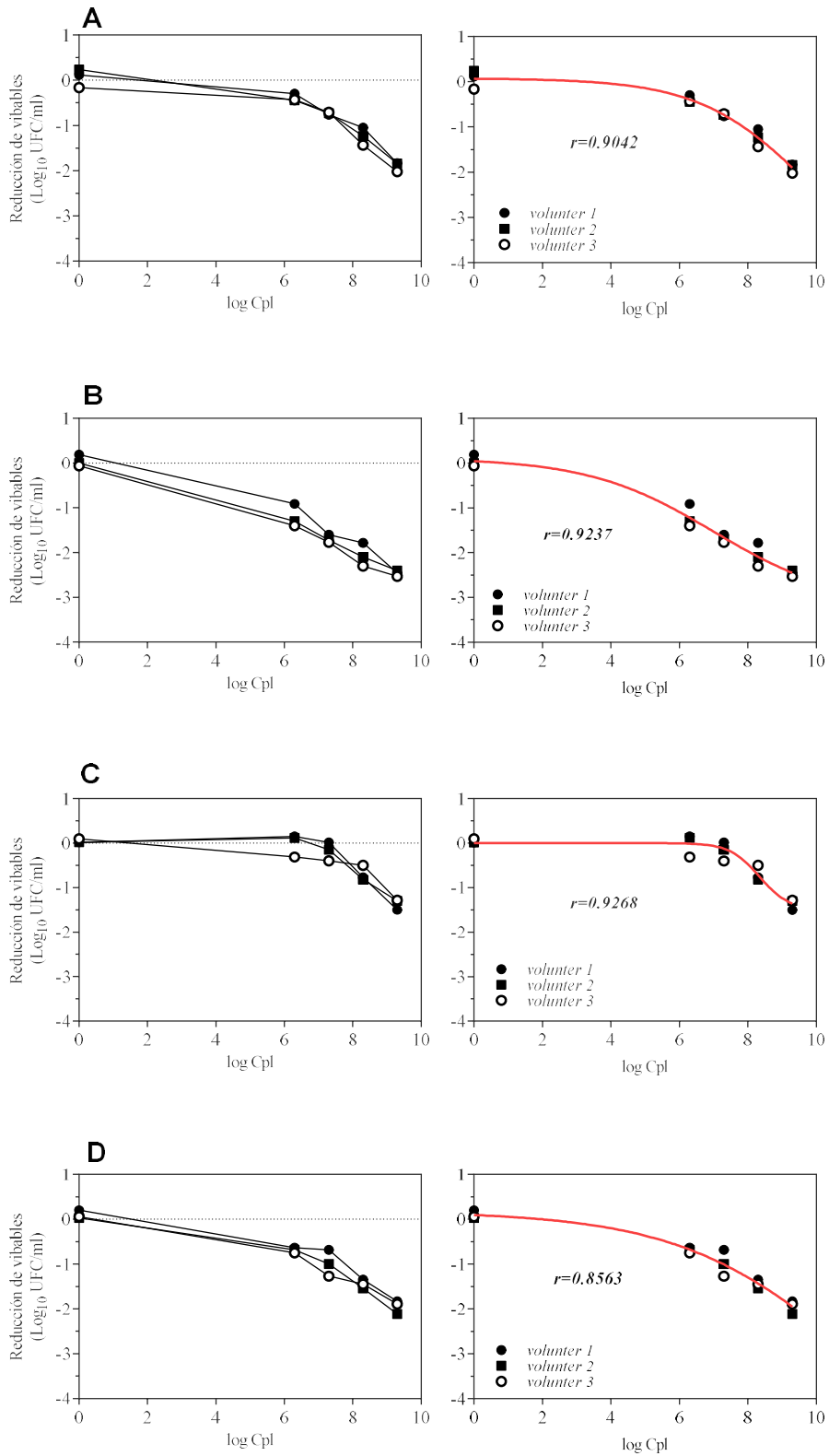


Figura 35. Modelado dosis respuesta para cepas diferentes de *A. E. coli*. B; *P. aeruginosa*

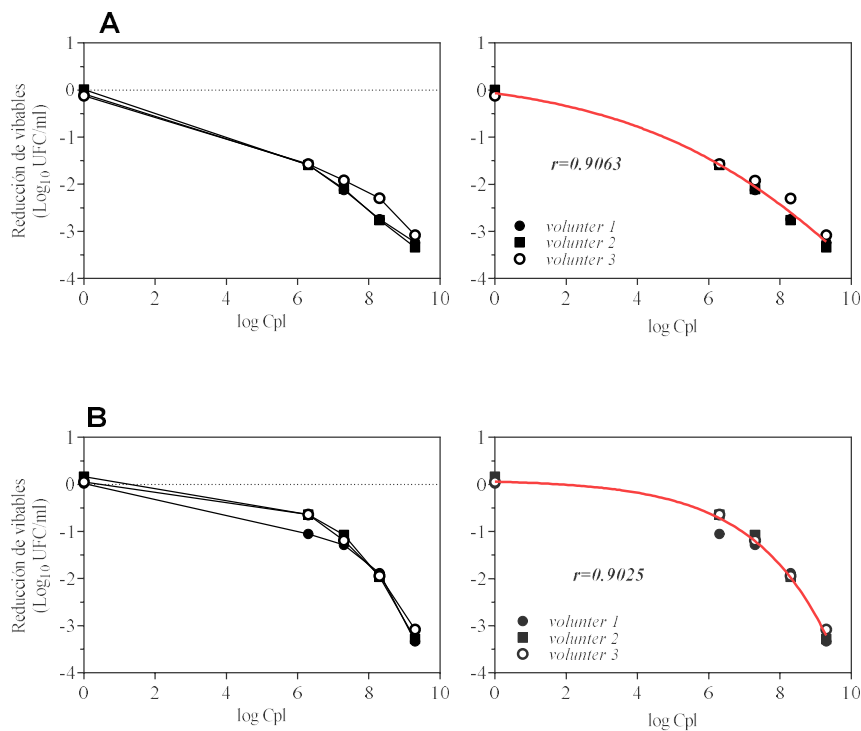


Figura 36. Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las especies

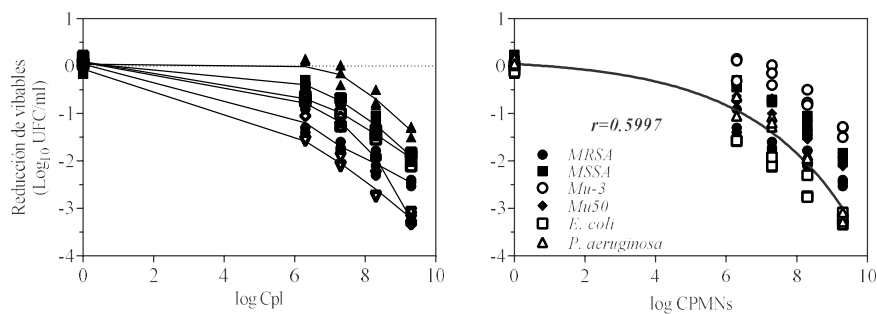
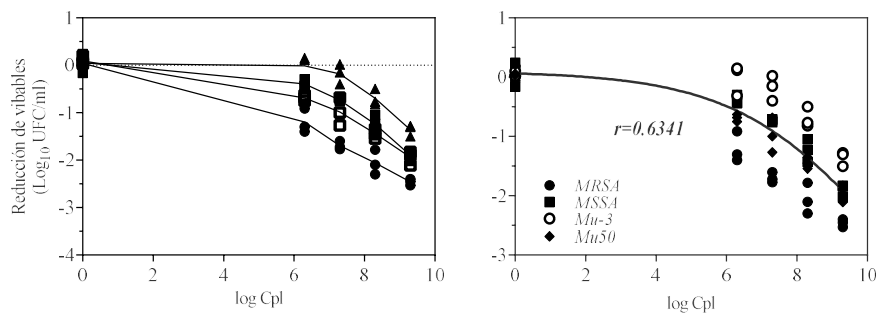


Figura 37. Modelado dosis-respuesta con los datos combinados de todas las cepas de *S. aureus*



10. Resultados

La magnitud de los parámetros de la ecuación que mejor definió el cambio en el efecto antibacteriano con la variación de la concentración de plaquetas expuestas, frente a cada una de las cepas, se resume en la siguiente tabla (tabla 21):

Tabla 21. Parámetros que adoptó la ecuación que ajustó los datos combinados de los tres voluntarios vs. logC plaquetas para cada una de las cepas estudiadas.

	<i>MSSA</i>	<i>MRSA</i>	<i>Mu-3</i>	<i>Mu-50</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>E_{max}</i>	-2,165	-1,821	-1,505	-1,743	-2,752	-3,364
<i>E_{min}</i>	0,02465	-0,1639	0,003229	-0,1396	-0,09872	-0,4556
<i>LogIC₅₀</i>	6,266	7,765	8,341	7,125	6,301	8,173
<i>IC₅₀</i>	1,84x10 ⁶	5,82x10 ⁷	2,19x10 ⁸	1,33x10 ⁷	2,00x10 ⁶	1,49x10 ⁸
<i>E_{min}-E_{max}</i>	2,19	1,657	1,508	1,603	2,653	2,908

De acuerdo a estos parámetros, la concentración de plaquetas que se estima necesaria para conseguir un efecto antibacteriano equivalente a un cambio en el recuento basal de bacterias de 0, 1, 2 y 3 logaritmos se resume en la tabla 22.

Tabla 22. Concentración mínima de plaquetas necesaria para conseguir un efecto antimicrobiano equivalente a una reducción de la carga basal de 0, 1, 2 y 3 logaritmos tras 5 horas de incubación A; *S. aureus*. B; *E. coli* y *P. aeruginosa*

A		MSSA		MRSA		Mu3		Mu50	
<i>Efecto</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	
0	<LD	1x10 ⁴	<LD	1x10 ⁴	5,67	4,71x10 ⁵	<LD	1x10 ⁴	
-1	7,87	7,45x10 ⁷	5,78	6,04x10 ⁵	8,64	4,36x10 ⁸	7,28	1,92x10 ⁷	
-2	9,45	2,79x10 ⁹	8,08	1,19x10 ⁸	>LD	-	9,39	2,48x10 ⁹	
-3	>LD	-	>LD	-			>LD	-	

<LD; <1x10⁴. >LD; >1x10¹⁰

B		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
<i>Efecto</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	<i>LogC</i>	<i>C</i>	
0	<4	1x10 ⁴	<4	1x10 ⁴	
-1	4,76	5,75x10 ⁴	6,94	8,80x10 ⁶	
-2	7,20	1,59x10 ⁷	8,33	2,12x10 ⁸	
-3	8,96	9,15x10 ⁸	9,16	1,45x10 ⁹	

<LD; <1x10⁴

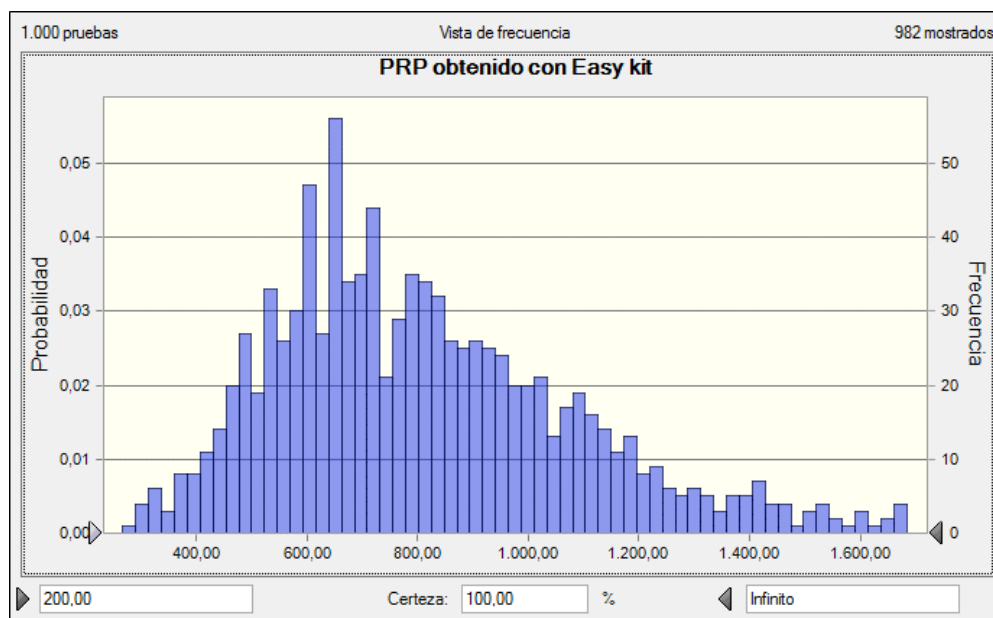
A diferencia del efecto antimicrobiano desarrollado por los neutrófilos, muy bajas concentraciones de plaquetas inducirían ya un cierto efecto antimicrobiano indepen-

dientemente de la cepa ensayada ($\leq 4,71 \times 10^5$ plaquetas/ml). Como muestran las tablas, la densidad de plaquetas requerida para obtener efectos superiores (1 log UFC/ml de reducción) aumenta sensiblemente y de manera diferente para todas las cepas, entre $5,75 \times 10^4$ - $6,04 \times 10^5$ plaquetas/ml para las cepas MRSA y *E. coli*, $8,8 \times 10^6$ para *P. aeruginosa* y entre $7,45 \times 10^7$ - $4,36 \times 10^8$ para las cepas MSSA, Mu-3 y Mu50. Un efecto superior, 2 log UFC/ml de reducción, podría ser conseguido frente a casi todas las cepas y de 3 log UFC/ml de reducción frente a las especies Gram-negativas, dada la densidad relativa de plaquetas en circulación periférica.

Probabilidad de éxito de la infusión de PRP en úlceras infectadas

La simulación de Montecarlo desarrollada a partir del recuento de plaquetas en los 26 sujetos que formaron parte del ensayo clínico desarrollado con el dispositivo Easy kit, se representa en la figura 38.

Figura 38. Simulación de Montecarlo ($n=1000$ sujetos) a partir de los datos medios de plaquetas obtenidos en los 26 voluntarios en el ensayo clínico con el dispositivo Easy kit



En la tabla 24 se describe el porcentaje de los 1000 sujetos simulados que a partir del producto final conseguido con Easy kit, podrían alcanzar la concentración mínima de plaquetas que es requerida para obtener un efecto antimicrobiano particular (tabla 22) frente a las diferentes cepas. Como muestra la tabla, el PRP concentrado por Easy Kit

podría conseguir sin dificultad una reducción de la carga bacteriana de al menos 1 log UFC/ml frente a todas las cepas ensayadas en la práctica totalidad de los pacientes. Incluso sería posible extender el efecto antimicrobiano hasta los 2 log UFC/ml de reducción de la carga basal frente a las cepas MRSA, *E. coli* y *P.aeruginosa* en la totalidad de la población. Solo en un pequeño porcentaje de pacientes la concentración de plaquetas aplicadas sería adecuada para obtener un efecto bactericida (3 log UFC/ml) y solo frente a cepas no *S. aureus*.

Tabla 23. Porcentaje de pacientes que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de plaquetas obtenido con los diferentes dispositivos comerciales en úlceras infectadas por las cepas ensayadas

	Efecto	MSSA	MRSA	Mu3	Mu50	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Easy kit	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	95,53	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	32,1	4,26
Tubo EDTA	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	88,22	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	0	0
Tubo citrado	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	92,52	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	4,76	0,04
GloPRP	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	61,81	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	0	0
cl-PRP	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	25,64	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	0	0

En líneas generales, la probabilidad de éxito del tratamiento con el resto de métodos de obtención de PRP, no sería muy diferente a Easy kit aunque la extensión del efecto estaría muy disminuida frente a algunas cepas como Mu-3 y en menor medida frente a *P.aeruginosa* o *E. coli*. Las diferencias con respecto a Easy kit sería menos notables con los métodos de concentración basados en tubos, EDTA o citrato.

De igual modo, atendiendo a los factores demográficos capaces de modificar la calidad y composición del PRP, el avance de la edad según el sexo, se observa (tabla 24) que aunque en todos los grupos la administración del concentrado originaria un efecto antimicrobiano de al menos 1 Log UFC/ml de reducción en la totalidad de los pacientes, la cobertura del tratamiento y su extensión sería inferior en las mujeres mayores de 50 años que en el resto de grupos analizados.

Tabla 24. *Porcentaje de pacientes, según sexo y edad, que alcanzarían el efecto antimicrobiano predeterminado (reducción de la carga basal en 1, 2 y 3 log UFC/ml) tras la infusión del concentrado de plaquetas obtenido con Easy kit en úlceras infectadas por las cepas ensayadas*

	<i>Efecto</i>	<i>MSSA</i>	<i>MRSA</i>	<i>Mu3</i>	<i>Mu50</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Hombres <50 años	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	100	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	72,83	2,72
Hombres > 50 años	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	99,34	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	32,7	0,88
Mujeres <50 años	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	97,76	100	100	100
	-2	0	100	0	0	100	100
	-3	0	0	0	0	39,8	4,16
Mujeres >50 años	0	100	100	100	100	100	100
	-1	100	100	74,72	100	100	100
	-2	0	99,89	0	0	98,36	100
	-3	0	0	0	0	18,13	3,34

11. DISCUSIÓN

El plasma rico en plaquetas autólogo (PRP) es una terapia sanguínea segura y eficaz (138) que ha emergido en la medicina regenerativa como una estrategia prometedora para reparar y rejuvenecer los tejidos dañados por lesiones o enfermedades crónicas (56,60,138,139). La terapia PRP ha ganado popularidad en las últimas dos décadas en varias modalidades médicas, incluida la medicina deportiva, ortopédica, cirugía general y la cirugía estético-reparadora (56,60,139) y en la actualidad está ofreciendo resultados muy satisfactorios en el tratamiento complementario de las úlceras del pie diabético, principalmente por la capacidad para regenerar y cicatrizar tejidos (62–64).

Los beneficios regenerativos del PRP derivan de la acción en tándem de los factores de crecimiento, varios neurotransmisores y el calcio liberado por las plaquetas (64,140,141). La co-infiltración de leucocitos mejora el contenido proteómico del PRP y proporciona propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras que podrían resultar de gran interés en determinadas aplicaciones clínicas (75,127)

A pesar que el tratamiento autólogo con PRP se encuentra en pleno apogeo clínico, aún son numerosas las dudas pendientes de resolver al respecto de la efectividad real de esta novedosa alternativa terapéutica. La literatura científica concentra una extensa evidencia sobre la eficacia clínica del PRP en aplicaciones regenerativas, pero cada vez son más frecuentes los ensayos clínicos bien diseñados que advierten que el PRP no mejora o no tiene ningún beneficio adicional en la fascitis plantar, las lesiones de tejidos blandos musculoesqueléticos o la tendinopatía de Aquiles o en la distensión muscular (138,142–144). Además, existe evidencia débil del beneficio del PRP en la curación de tendones y ligamentos y la artritis de rodilla (145,146).

Gran parte de estas inconsistencias clínicas derivan de la falta de estandarización del método de preparación del PRP y de la falta de conocimiento sobre de las diferentes propiedades de captura de células sanguíneas de los sistemas de separación y fraccionamiento de la sangre. La obtención de PRP es un proceso extremadamente dependiente del esquema de centrifugación y de la propia fisionomía del dispositivo concentrador (52,53,74–76). La arbitrariedad metodológica condiciona una concentración y composición celular y bioquímica dispar en los PRP obtenidos por diferentes dispositivos. Implícitamente, el

PRP no estará optimizado para nuestros propósitos clínicos haciendo la factible la infiltración de concentraciones subóptimas de plaquetas y de factores de crecimiento, o que entren en escena otros actores, a veces más importantes que el concentrado de plaquetas, como los leucocitos (147,148). En cualquier caso la composición intrínseca del PRP debería ser predeterminada y guiada en función de la patología susceptible de ser tratada.

La coadministración clínica de leucocitos como adyuvante del PRP es objeto de una fuerte controversia debido a que la reacción inflamatoria natural que inducen los leucocitos es vista como una fuerte limitación para el uso de estos preparados en la práctica clínica. Esta creencia, muy afianzada, se acrecienta por la escasa literatura disponible que demuestra que este efecto es inferior al beneficio clínico que se consigue (53,54,127). En el tratamiento reparo-regenerador de defectos óseos, en lesiones crónicas de tendón, osteoartritis y en la regeneración temprana del disco intervertebral, el PRP pobre o libre de leucocitos es de elección sobre el PRP concentrado en leucocitos. La efectividad de la terapia con el PRP concentrado en leucocitos no es inferior, pero el efecto proinflamatorio que induce la fracción de células blancas exagera un dolor evitable en el paciente (53,54,127).

La infiltración de PRP rico en leucocitos como estrategia para regenerar epitelios dañados estaría fuertemente cuestionada bajo el actual conocimiento de la fisiopatología de la curación de las heridas agudas y crónicas. El avance de la infección en las úlceras diabéticas crónicas y la acumulación de productos de glucosilación avanzada en situaciones de hiperglucemia sostenida, aumentan el estrés oxidativo originando la inflamación prolongada y el consecuente aumento de la infiltración de neutrófilos y de la actividad proteasa que negativamente afecta al epitelio (64,72,147). Esta inflamación local prolongada conduce a una drástica reducción de la actividad mitogénica y consecuentemente a un retraso en la cicatrización que favorece la cronicidad de las heridas infectadas.

Sin embargo diversos estudios demuestran que la aplicación tópica de PRP autólogo originan tasas de curación clínica estadísticamente superiores al manejo convencional de este tipo de heridas crónicas (64,72,147). Las propiedades curativas estuvieron en relación con la composición de estos preparados, normalmente geles fibrina ricos en plaquetas y leucocitos (147). El fuerte impacto de los leucocitos en la curación se atribuye a su efecto antimicrobiano, pero también a la influencia de los leucocitos en las reacciones inmunes (147), y en la liberación de factores plaquetarios y de factores de crecimiento directamente desgranulados al medio extracelular como el factor de crecimiento endotelial vascular (53,75,127).

Como efectores primarios del sistema inmunológico, esta respuesta antimicrobiana estaría largamente orquestada por neutrófilos, células blancas más abundantes de la sangre y en menor extensión por monocitos, mediante fagocitosis y liberación al medio extracelular de multitud de péptidos y enzimas antimicrobianos. Los linfocitos juegan un papel más decisivo cuando la infección evoluciona, aunque algunos tipos de linfocitos T, como las células NK pueden también contribuir por su rápida activación tras la exposición antigénica en la defensa contra patógenos invasores (147).

La hipótesis más probable es que en estas heridas diabéticas recalcitrantes la carga biológica que está siendo deficientemente contenida por un sistema defensivo deteriorado por acción de la hiperglucemia sostenida, conduce a un esquema de retroalimentación que mantiene la inflamación local e incrementa la quimiotaxis. Las acciones que reduzcan la biocarga de microorganismos de la úlcera, conducirán a la restauración del proceso normal de cicatrización del epitelio dañado.

En este escenario clínico donde la terapia antimicrobiana es ineficaz (45) y el paciente se encuentra en riesgo de amputación, la coadministración de leucocitos podría resultar una alternativa terapéutica muy interesante.

Sin embargo hay otros múltiples ejemplos que demuestran que el plasma rico en plaquetas y leucocitos es extraordinariamente efectivo en la reducción del número de infecciones y en la estimulación de la angiogénesis y de la epitelización en otras patologías como la cirugía ortopédica y cardíaca (149).

Todos estos ejemplos ilustran el papel clave de los leucocitos en la aplicación clínica del PRP rico en leucocitos, pero hay que advertir que el efecto beneficioso estará condicionado por la fórmula leucocitaria presente en el PRP resultante.

En esta memoria demostramos que los neutrófilos exhiben actividad antimicrobiana suficiente para contener la carga de los microorganismos más prevalentes en las infecciones del pie de diabético, *S. aureus* sensible (SASM) y resistente (SARM) a metilicina, *E. coli* y *P. aeruginosa* en representación de las diferentes configuraciones de las especies que adoptan las úlceras de pie de diabético conforme progresan en severidad (ref IDSA) y que la concentración óptima de neutrófilos que debe contener el PRP para conseguir este efecto de contención puede ser alcanzada con relativa facilidad empleando algunos de los sistemas concentradores de sangre examinados. Sin embargo fue más llamativo, en comparación, el efecto antimicrobiano del concentrado plaquetario y en particular, la extensión de la actividad antimicrobiana desarrollada frente a todos los microorganismos estudiados a

partir de concentrados de plaquetas relativamente pequeños de acuerdo a la muy favorable capacidad de concentración de esta fracción de la sangre empleando diferentes dispositivos de concentración.

Es estudio directo del concentrado de PRP conseguido a partir de la sangre de un individuo empleando un sistema concentrador particular, es quizás la aproximación más práctica y relevante desde un punto de vista clínico para determinar la actividad antimicrobiana del producto final de PRP.

Diferentes estudios han demostrado que el gel de PRP rico en leucocitos concentrado desde voluntarios sanos (150), exhibe ex vivo una fuerte actividad antimicrobiana frente a un importante rango de microorganismos. No obstante dependiendo del trabajo examinado los resultados son contradictorios. Bielecki y col. (147) encontraron una fuerte actividad antimicrobiana del preparado frente al SASM y una inhibición moderada del crecimiento de SARM y *E. coli* pero no sobre *Enterococcus faecium* o *P. aeruginosa*. Al contrario, en un segundo estudio de este grupo (150) el preparado de PRP rico en leucocitos exhibió una actividad antimicrobiana excelente sobre *Enterococcus faecium* o *P. aeruginosa* y más débil sobre MSSA o MRSA. Moojen y cols, (130) confirmaron empleando curvas de muerte bacteriana la excelente actividad del PRP rico en leucocitos tras las primeras horas de aplicación empleando una cepa SARM.

Estos estudios definen satisfactoriamente el posible espectro de acción del preparado de PRP rico en leucocitos emulando una situación clínica, pero fallaron a la hora de establecer el potencial microbicida y en especial la actividad antimicrobiana que es atribuida a cada una de las fracciones celulares. Este hecho es de vital importancia dada la fuerte respuesta antibacteriana observada en nuestro trabajo con las plaquetas. El efecto antimicrobiano obtenido en estos trabajos debe entenderse como un sumatorio de respuestas producto de la acción combinada del concentrado de plaquetas y leucocitos. Es más, debido a la metodología utilizada, la difusión en disco, el efecto antibacteriano cuantificado derivó exclusivamente de la acción directa de las sustancias solubles desgranuladas sin considerar el efecto de la fagocitosis. No menos importante es el desconocimiento de la composición en efectores principales del efecto antimicrobiano en la formula leucocitaria, altamente dependiente del método empleado y de la extensión del efecto antibacteriano (147,150), soporte fundamental para la optimización de las terapias antimicrobianas (151).

El diseño de nuestro estudio pierde el componente de reproducibilidad del escenario clínico per sé, que aporta el examen directo del preparado de PRP. No obstante aporta

11. Discusión

bases teóricas precisas que permiten estimar con exactitud y de forma específica el comportamiento de las fracciones concentradas descartando el efecto de componentes de la sangre no deseados y con independencia del dispositivo concentrador. Con la relación entre la densidad conocida efecto de las células que son expuestas es posible predecir el comportamiento de un producto diana en el entorno clínico. Es más, a través de simulaciones de MonteCarlo conseguimos establecer la probabilidad de éxito microbiológico del PRP y de los concentrados de neutrófilos a una extensa población de sujetos atendiendo a las variaciones de composición del PRP producto de la diferente eficiencia de captura de células de los distintos sistemas concentradores y la variabilidad entre sujetos

11.1. EFECTO ANTIMICROBIANO DE NEUTRÓFILOS Y PLAQUETAS

El efecto de los neutrófilos en el control de la infección se encuentra ampliamente detallado en la literatura desde hace más de cuatro décadas. (151–153). La quimotaxis favorece la infiltración de neutrófilos en el foco infeccioso que inician en proceso de fagocitosis con la consecuente destrucción intracelular del patógeno a través de mecanismos independientes de oxígeno o dependientes de oxígeno que pueden ser mediados o no por la mieloperoxidasa (154).

En modelos experimentales con animales neutrópenicos se ha demostrado que densidades extremadamente bajas, de hasta cinco órdenes de magnitud inferiores, pueden conducir a tasas de mortalidad idénticas a las observadas en animales con concentraciones fisiológicas de PMNs inoculados con muy altas concentraciones de bacterias (153). Este concepto, junto con el conocimiento que individuos deficientes en mecanismos defensivos mediados por neutrófilos son propensos a la infección por organismos oportunistas (106,153) (explica que los neutrófilos juegan un papel fundamental en el proceso defensivo y que el efecto de esta acción está orquestado a partir de una concentración crítica de neutrófilos presentes en el medio, que soportaría la biocarga de microorganismos con independencia del tamaño (106). Estos valores se establecen en el umbral de 5×10^5 por ml, que predispone a neutropenia clínica.

No obstante la demostración práctica de este aspecto teórico solo ha sido demostrada frente a especies comensales como *S. epidermidis*.

Por este motivo nuestra investigación incluyó a diferentes especies y en concreto a las más prevalentes involucradas en las infecciones de pie diabético. El establecimiento de la concentración crítica es vital para conocer en función de la capacidad de concentración de esta fracción de la sangre con los diferentes dispositivos, el potencial beneficio clínico de la administración del preparado.

Nuestros resultados confirman que la actividad antimicrobiana de los neutrófilos es dependiente de la densidad de neutrófilos que se exponen (106) y que la extensión de este efecto es dependiente de la especie bacteriana (152), e incluso del donador (155), aunque esta variabilidad entre sujetos no ocurre frente a todas las especies ensayadas.

Como reflejamos, el efecto antimicrobiano de los neutrófilos aumentó conforme se incrementó la concentración de neutrófilos en el medio independientemente de la presencia de suero fresco o inactivado, pero al margen de la concentración de neutrófilos que es expuesta, fue más favorable con suero fresco. Esto es debido a que la fagocitosis de los neutrófilos aumenta significativamente con la presencia de opsoninas, inmunoglobulinas, estables al calor o el componente C3 del complemento, termolábil, presentes en el suero (152,155,156). Las opsoninas se fijan sobre estructuras de la superficie de la bacteria e incrementan el reconocimiento antigénico de los neutrófilos, bien por vía clásica previo reconocimiento del Ig ligado al antígeno o alternativa una vez activado C3 a C3b (152,155,157). La activación de C3 a C3b en la vía alternativa ocurre en presencia del LPS (lipopolisacárido) presente en las bacterias gramnegativas que actuaría por homología con la estructura de anclaje de las Ig. Esto explica que la extensión del efecto sea superior en *E. coli* o *P. aeruginosa* que en las bacterias grampositivas SASM o SARM. Como reflejan nuestras curvas control del suero fresco, la acción bactericida de los componentes del suero es insignificante en ausencia de neutrófilos.

Este papel de las opsoninas explicaría también la variabilidad en la respuesta de los neutrófilos entre sujetos frente a *P. aeruginosa*, la única especie testada frente a la que se observaron discrepancias entre donadores. Como hemos detallado en los resultados de esta memoria uno de los voluntarios presentó una respuesta significativamente superior a los otros dos sujetos tanto en presencia de suero activado como inactivado. Descartando la ruta alternativa que quedaría interrumpida por la acción del calor sobre las proteínas del complemento, el efecto visto en este sujeto es debido a la presencia de Ig específicas frente a *P. aeruginosa*. Por este motivo el efecto antimicrobiano de los neutrófilos en presencia de suero inactivado por calor continuó siendo elevado aunque inferior (por depleción de la vía alternativa) a la actividad observada en presencia de suero fresco.

No hay que olvidar que los neutrófilos liberan al medio externo multitud de péptidos, como el LL-37 que es secretado abundantemente, y enzimas con poder antimicrobiano (150,153) y que muchos de estos compuestos son termoresistentes y podrían influir en la respuesta mediada por la fagocitosis tanto en presencia de suero fresco como inactivado por calor.

La concentración crítica de neutrófilos que desencadenaría el mínimo efecto antimicrobiano, fue estimada a partir del cambio del efecto antimicrobiano con la variación de la densidad de neutrófilos expuesta al microorganismo. En esta relación tanto la de-

pendencia de la especie como la variabilidad de efectos entre donantes jugaron un papel determinante.

La correlación entre la densidad de neutrófilos en el medio y el efecto antimicrobiano empleando los datos de los tres sujetos, fue muy robusta para las cepas SASM, SARM y *E. coli* ($r^2 > 0,90$), pero muy débil en comparación para *P. aeruginosa* ($r^2 = 0,555$). Al examinar el trazado individual de las curvas de cada sujeto frente a SASM, SARM o *E. coli*, no se apreciaron diferencias significativas (F-test) con respecto al trazado medio establecido con los datos de los tres voluntarios en su conjunto, pero sí frente a *P. aeruginosa* ($P < 0,0001$; F-test), indicando que el pronóstico de eficacia no varía entre sujetos para SASM, SARM y *E. coli*, pero que frente a *P. aeruginosa* debe ser establecido separadamente, según las características del suero del sujeto.

Las curvas dosis-respuesta obtenidas combinando los datos de todas las cepas ($p < 0,001$; F-test) o solo los datos de ambas cepas de *S. aureus* ($P = 0,0056$; F-test), en un modelo único fueron (a pesar de la elevada correlación en el caso del modelado conjunto de ambos *S. aureus*; $r^2 = 0,90$) significativamente diferentes al modelado de las cepas por separado, indicando que este pronóstico no solo es diferente para diferentes microorganismos sino también para diferentes cepas de la misma especie o al menos para cepas con la característica diferenciadora de la resistencia a meticilina.

No obstante, en general y a pesar de esta variabilidad entre donadores para *P. aeruginosa* y entre especies, nuestros resultados revelan que las concentraciones críticas necesarias para contener la carga microbiana en todas las especies e independientemente del sujeto (*P. aeruginosa*) se situaría en el umbral de la neutropenia (5×10^5 neutrófilos/ml) al igual que en *S. epidermidis* (106). Para ambos *S. aureus* y en *P. aeruginosa* con el voluntario 2, próxima a 1×10^6 neutrófilos/ml y por debajo del umbral para *E. coli* y *P. aeruginosa* en los dos restantes voluntarios. Concentraciones de neutrófilos muy superiores, en el entorno de 1×10^7 , se estimaron necesarias para reducir en un 90% (1 log UFC/ml) la carga de SASM, SARM y *E. coli* del foco infeccioso. A partir del suero tipo del voluntario 1, los neutrófilos a concentraciones próximas al umbral de neutropenia podrían alcanzar incluso reducciones de hasta el 99% (2 log UFC/ml) de la carga bacteriana de *P. aeruginosa*, indicando que la presencia en el suero de un sujeto de respuestas inmunes específicas podrían incrementar significativamente la actividad del preparado de leucocitos. En comparación, las concentraciones necesarias para alcanzar este efecto antimicrobiano, fueron sustancialmente superiores en todas las cepas en presencia de suero inactivado. No obstante, y de

nuevo frente a *P. aeruginosa* con el voluntario 1, solo serían necesarias concentraciones de neutrófilos de $7,95 \times 10^5$ para alcanzar reducciones de biocarga de al menos 1 log UFC/ml.

El efecto antibacteriano de las plaquetas está perfectamente documentado en la literatura científica (147,150,153,158–163). No obstante fue sorprendente para nosotros que el gel de plaquetas exhibiera una actividad antimicrobiana muy superior a la observada con los neutrófilos, considerados como los principales efectores del sistema defensivo del individuo. A nuestro entender, este es el primer documento que compara simultáneamente ambas fracciones de sangre desde los mismos donadores, sin interferencias en la respuesta, y que revela que las plaquetas exhiben una actividad antimicrobiana sustancialmente superior a la de los neutrófilos. Resaltamos, que la extracción y purificación de neutrófilos empleando la técnica de centrifugación diferencial descrita por Eggleton y cols (137), descartó la introducción de otras fracciones blancas en el estudio y preservó intacta la viabilidad (>95%) de la mayoría de los neutrófilos concentrados (137). Por otro lado, la utilización del gel separador presente en sistema clásico de extracción de plaquetas (Kit wego) nos permitió la obtención de un concentrado plaquetario anticoagulado libre de otros actores presentes en la sangre.

El efecto antimicrobiano de las plaquetas siguió un patrón de actividad antimicrobiana muy similar a la de los neutrófilos pero, a diferencia de las células blancas, la respuesta de los tres donadores fue perfectamente superponible, con independencia de la concentración de plaquetas o de la cepa ensayada. El efecto antimicrobiano fue consistente con una fuerte dependencia de la concentración de plaquetas; a mayor densidad mayor efecto, y una fuerte dependencia de la especie e incluso de la cepa ensayada (al menos para *S. aureus*). En contraposición a los neutrófilos, la actividad atribuida a las plaquetas ha sido muy controvertida, con variaciones importantes tanto en el espectro como en la extensión del efecto antimicrobiano (147,150,160,162) Mientras que algunos estudios han demostrado una completa ausencia de actividad frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. facium* o *Streptococcus sp.*, y una fuerte aleatoriedad en las respuestas frente a cepas de SARM (130,147,160) otros en cambio demostraron que la actividad antimicrobiana no muestra selectividad por los diferentes organismos Gram-positivas o Gram-negativas, aunque la extensión del efecto puede variar entre especies (150,158,162). Tanto la metodología empleada en estos trabajos como la densidad de plaquetas o la adecuada activación del gel antes de la inoculación del microorganismo podrían explicar, en parte, la arbitrariedad en el espectro de acción y la diferente extensión del efecto antibacteriano previamente documentada. Se ha

demostrado que las plaquetas exhiben, aunque en menor extensión, efecto antimicrobiano tanto en el plasma pobre en plaquetas como en plasma rico en plaquetas e incluso en plaquetas viejas obtenidas de bolsas de extracción de sangre caducadas y cuando los geles de plaquetas son activados por trombina autóloga o bovina o naturalmente sin aditivos (158,159,162). La técnica de la difusión en disco, utilizada de forma masiva en todos estos trabajos, no es, quizás, el método más apropiado para demostrar la actividad antimicrobiana de las plaquetas, ya que en suma a los anteriores factores modificadores de la respuesta, la difusión de componentes a lo largo del agar puede verse comprometida infravalorando el efecto del concentrado plaquetario.

De hecho, el efecto antibacteriano de las plaquetas está íntimamente ligado a la producción de péptidos con acción antibacteriana como FP-A, FP-B, T -4, PBP, CTAP-3, RANTES y PF-4 (Tang 2002). Estos péptidos han sido aislados y purificados desde el material liberado de plaquetas humanas después de la estimulación con trombina, aunque al menos dos, T-4 y CTAP-3, son liberados sin activación previa de las plaquetas (158) algunos incluso interactúan sinérgicamente en el efecto microbicida *in vitro* (161).

Empleando la misma aproximación que en el caso de los neutrófilos, demostramos que es factible optimizar el tratamiento con concentrados plaquetarios. Los modelos dosis-respuesta cuando se incluyeron los datos de los tres voluntarios, originaron estimaciones de actividad frente a cada una de las cepas que no fueron significativamente diferentes a las obtenidas para cada uno de los voluntarios por separado ($P > 0,05$; F test), debido a que las trazados de actividad frente al cambio en la densidad de plaquetas de todos los sujetos fueron completamente superponibles. No obstante estas estimaciones fueron significativamente diferentes cuando el modelo dosis-respuesta incluyó los datos de todas las especies o de todas las cepas de *S. aureus*, indicando que cada especie o cada cepa (al menos para *S. aureus*) muestra un comportamiento distinto frente a la densidad de plaquetas expuesta. Paradójicamente, y en contraposición a los trabajos de Bielecky y cols, y Tohidnezhad y cols, (147,160) nosotros observamos la mayor actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* y *E. coli* y con independencia de la densidad (reducciones de la carga inicial de más de 3 log UFC/ml; 99,9% de reducción de la biocarga). Curiosamente, Tang y cols, (161), demostraron que en condiciones ligeramente ácidas los péptidos PF-4 y CTAP-3 actúan sinérgicamente originando una destrucción dependiente de la dosis de *E. coli* y que este efecto sinérgico es muy inferior sobre *S. aureus*. En nuestro estudio, entre las cepas de *S. aureus*, encontramos un mayor efecto sobre SARM y la cepa Mu-50, y más reducido

frente a Mu-3 (con independencia del sujeto), que en todo caso a máximas densidades de plaquetas, se situó en torno a 1,5 Log UFC/ml de reducción.

De acuerdo a nuestras estimaciones, una densidad de plaquetas muy baja, $4,71 \times 10^5$ plaquetas/ml, serían suficiente para contener la biocarga de microorganismos constituida por cualquiera de estas especies. Concentraciones inferiores a $4,36 \times 10^8$ plaquetas/ml y $2,79 \times 10^9$ plaquetas/ml condicionarían descensos de 1 y 2 Log UFC/ml en esta biocarga, aunque para MRSA, *E. coli* y *P. aeruginosa*, estas densidades serían sustancialmente inferiores, al menos 10 veces inferiores. En el entorno de 2×10^9 las plaquetas conducirían a un efecto bactericida (3 log UFC/ml) en biocargas constituidas por especies Gram negativas.

Además se ha sugerido que determinados péptidos antimicrobianos microbicidas de las plaquetas, potencian los mecanismos antimicrobianos de los leucocitos (164–166). Estos péptidos colaborarían en el fagolisosoma maduro ligeramente adificado, a través de mecanismos no oxidativos (164–166).

11.2. SISTEMAS DE CONCENTRACIÓN DE LA SANGRE. SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE FACTORES MODIFICADORES DEL PREPARADO FINAL

El desconocimiento de las propiedades de captura de células de los sistemas de separación-concentración de sangre han propiciado que el recuento de leucocitos en las muestras de PRP sea ignorado con frecuencia y que muy pocos estudios hayan examinado la presencia de esta fracción en el PRP (45,52,53,75), cuya presencia en los productos finales es altamente dependiente del sistema y de las condiciones de trabajo aplicadas (52,53,75,76). El análisis sistemático de la composición de los glóbulos blancos en los leucocitos concentrados ha sido menos exhaustivo (45,53).

Sin embargo, los factores implicados no se limitan a los anteriores. Una fuerte variabilidad intraindividual (53,114) y, lo que es más importante, entre sujetos también afectan la calidad del PRP obtenido. Las variaciones entre sujetos son más complejas y, a menudo, están relacionadas con el envejecimiento natural, el sexo o la presencia de enfermedades subyacentes (54,81,115,117) .

Es bien sabido que el envejecimiento tiene una influencia negativa en la respuesta a la curación y la degeneración de los tejidos elásticos (118). Los marcadores moleculares protectores disminuyen con la edad (81,115) y de manera más marcada en hombres que en mujeres (119), destacando una relación entre el dimorfismo hormonal; a través de la regulación diferencial de la expresión de múltiples factores de crecimiento y la ocurrencia de estos eventos (116,121). Los estrógenos ralentizan los efectos del envejecimiento, que se vuelven más notorios después de la menopausia (116). Este dimorfismo hormonal también conlleva un dimorfismo inmunológico (117,122,123) asociado a la expresión diferencial de receptores de citocinas (124) y una predisposición diferente por género a las enfermedades (124,128).

Existe una gran cantidad de sistemas comerciales disponibles que dan como resultado productos de plaquetas con una amplia gama de concentraciones de plaquetas y glóbulos blancos, aunque hay información limitada disponible sobre el contenido óptimo de plaquetas y glóbulos blancos necesarios para lograr un efecto biológico

deseado y es posible que los productos específicos sean mejores para unas aplicaciones u otras (76,79)

En nuestro estudio participaron cinco donantes y se probaron 3 sistemas comerciales y 2 métodos basados en tubos de analítica general simultáneamente, y se observó que a pesar de partir de volúmenes similares de sangre y utilizar protocolos de extracción muy similares, el Easy Kit presentó mejores resultados que el resto de sistemas y tubos.

Por un lado se siguió un protocolo de giro único, este consiste en una centrifugación en un solo paso de la muestra extraída, evitando el tiempo y los riesgos de contaminación microbiana relacionados con las técnicas de centrifugación en dos pasos (52,132,167,168) esta estrategia de giro único también se adaptó para los métodos de tubos de extracción de sangre con fines de comparación, siendo conscientes de que los protocolos de centrifugación en un solo paso dan como resultado concentraciones de plaquetas más bajas y un factor de crecimiento beta transformador más bajo (TGF- β 1), este procedimiento previene la activación prematura de las plaquetas y su agregación (167) mejorando el manejo clínico de PRP y la eficacia terapéutica, permitiendo la extracción de células blancas sanguíneas (52,167)

Por otro lado, se ha sugerido que la concentración de plaquetas del PRP se correlaciona positivamente con el aumento del volumen de sangre total extraído en el sistema y con la creciente fuerza de aceleración centrífuga (52) sin embargo, en nuestro estudio, el Easy kit, con solo 3 ml más de volumen sanguíneo con sigue un rendimiento superior concentrando entre un 40 y un 60% más de plaquetas que los demás dispositivos con la misma fuerza centrífuga. Por lo tanto, con base en las predicciones teóricas hechas recientemente por Piao et al. para establecer las condiciones óptimas para la preparación de PRP, creemos que tanto la geometría del dispositivo como el uso de tiempos de rotación relativamente cortos (4-5 minutos) juegan un papel importante en las tasas de recuperación de las plaquetas (74) Recordamos que los volúmenes totales de sangre extraída por los dispositivos eran de 11 ml para Easy Kit , 9 ml para GloPRP y el kit PRP clásico y 8 ml para tubos analíticos generales de EDTA y citrato, y aunque el aumento del factor de plaquetas para el sistema de Easy kit en nuestro estudio (3,56 veces el recuento basal de plaquetas) fue superior al del resto de sistemas, aun estuvo lejos de la eficiencia del sistema mostrada por el fabricante (7-9 veces veces el recuento basal de plaquetas) por lo que corroboramos que la habilidad del clínico y la familiaridad con el uso del dispositivo son factores esenciales para predecir la eficiencia de captura de plaquetas de los diferentes sistemas de separación

de PRP en el entorno clínico y así poder asesorar satisfactoriamente a los pacientes sobre el contenido de PRP proporcionado por cada uno de ellos.

Amaral et al el describieron que el anticoagulante incorporado en el sistema modifica la eficiencia de la separación-concentración de las fracciones sanguíneas encontrando ciertas ventajas con el uso de citrato de sodio. Esto explicaría las diferencias entre ambos métodos basados en tubos de analítica general que, respectivamente, lograron el 56%, con los tubos anticoagulados con EDTA y el 60%, con los tubos anticoagulados con citrato, del total de plaquetas concentradas por el sistema Easy kit (citrato). Ambos sistemas consiguieron una mayor eficiencia que los sistemas comerciales GloPRP (citrato), 46% del total de plaquetas recuperadas por Easy kit o el clásico kit PRP (citrato), 38% de total y por lo tanto es plausible que con el uso de EDTA como anticoagulante, esta tasa de recuperación fuese menor aún.

Otro hallazgo importante que encontramos en el estudio es la diferencia significativa de células blancas sanguíneas obtenidas por cada sistema. Nuevamente el Easy Kit demostró ser capaz de concentrar mayor cantidad de células blancas, logrando densidades significativamente mas altas que las encontradas en la sangre periférica, sin embargo, los leucocitos en los concentrados obtenidos por los métodos basados en la recolección de tubos sanguíneos o por GloPRP prácticamente no aumentan desde los niveles basales de sangre. No fue sorprendente la ausencia de células blancas en los sistemas clásic kit PRP ya que este dispositivo incorpora una tecnología de gel separador que proporciona una barrera física para eliminar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos y sería de esperar que este gel estuviera involucrado también en la baja concentración de plaquetas que ofrece este kit.

Los neutrófilos, junto con los monocitos-macrófagos, son los efectores de la respuesta inmune innata de la fracción blanca de la sangre y tienen una mayor representación y una mayor actividad microbicida (169). Nuestro estudio reveló que, independientemente de las eficiencias específicas de cada sistema, el factor de concentración celular dependía del tamaño de las células sanguíneas; cuanto menor es el tamaño de las células sanguíneas, mayor es el factor de concentración. Además de las plaquetas, altamente concentradas en función del tamaño, el factor de concentración entre los leucocitos fue mayor para los linfocitos que para los monocitos que para los neutrófilos . Por lo tanto, esta eficiencia basada en el tamaño de la célula que implica una sobrerrepresentación de la fracción de linfocitos en la fracción blanca de la sangre, sería dramática para nuestras expectativas terapéuticas

con células blancas si los métodos con una pobre eficiencia en la concentración, si utilizáramos como sistemas de concentración los tubos de EDTA o SC o el sistema GloPRP. Estos métodos concentraron linfocitos, incluso significativamente, pero disminuyeron la concentración de neutrófilos basales en sangre. Por esta razón, si realmente estamos interesados en el uso clínico de plaquetas junto con células blancas sanguíneas, sería muy recomendable conocer de antemano el poder de concentración del sistema para las diferentes fracciones de células blancas.

Nuestro estudio se basa en un tamaño de muestra muy pequeño, que limita su capacidad para detectar grandes diferencias entre sistemas, especialmente cuando se redujo el poder de concentración. Sin embargo, su fortaleza es el uso de donantes únicos para probar todos los sistemas al mismo tiempo, donde los participantes sirven como sus propios controles, lo que ayuda a minimizar las posibles variables de confusión al hacer comparaciones entre los sistemas PRP probados.

Es necesario estudios futuros más grandes para caracterizar aún más la variabilidad entre sistemas y dentro de cada sistema la capacidad concentradora de plaquetas y células blancas. También sería interesante más estudios para elaborar protocolos sobre la necesidad o no de la utilización de células blancas junto con el concentrado de plaquetas en las diferentes patologías a tratar y con ello establecer la dosis óptima de PRP para las lesiones de tratamiento ortopédico que pueden beneficiarse de esta terapia y con ello proporcionar un tratamiento PRP efectivo.

Una vez obtenido el sistema concentrador que mejores resultados era capaz de concentrar, se nos planteó la duda de si los sujetos de estudio plantearían variaciones a la hora de concentrar las fracciones de la sangre. Está descrito que las variaciones entre sujetos son más complejas y, a menudo, se relacionan con el envejecimiento natural, el sexo o la presencia de enfermedades subyacentes (54,81,115,116). Se han sugerido variaciones intraindividuales ya que un sistema puede proporcionar diferentes rendimientos y productos finales para el mismo individuo cuando las preparaciones se repiten en el tiempo siguiendo un protocolo de trabajo estandarizado (113). La variabilidad biológica de las concentraciones de plaquetas y leucocitos entre los individuos también puede contribuir a la eficacia de la terapia con PRP, pero esta correlación ha sido poco explorada (126) por lo que probamos si el envejecimiento podría ser un factor que influyera en la tasa de recuperación de plaquetas, y confirmamos que así era.

En nuestra cohorte de estudio, encontramos diferencias dramáticas en el recuento de plaquetas y leucocitos obtenidos en el producto de plasma rico en plaquetas recuperado de la sangre del grupo de adultos mayores, participantes mayores de 65 años, utilizando el sistema seleccionado previamente con los mejores resultados, el Easy kit. En este grupo de edad avanzada, el recuento medio de plaquetas y leucocitos fue entre 30 y 40% menor que el recuento de células en el PRP del grupo control, participantes menores de 65 años, establecido según la definición de la OMS de persona mayor (136)

Las diferencias observadas en las preparaciones de PRP después de dividir la población de estudio según la edad se debieron exclusivamente a las diferencias significativas pre-existentes en el hematocrito de ambos grupos de población. Además, independientemente de la edad y en ausencia de enfermedades de base en la población estudiada, el resto de variables demográficas caracterizadas no fueron estadísticamente diferentes entre grupos, asumiendo que la variación en el hematocrito es principalmente consecuencia del envejecimiento.

Un estudio reciente ha demostrado que la dilución del volumen de sangre incorporado en los sistemas concentradores aumenta la tasa de recuperación de plaquetas y leucocitos en las preparaciones de PRP (74). Nuestro grupo de adultos mayores exhibió un hematocrito diluido basado en el recuento de plaquetas y leucocitos (30% más bajo) que el grupo de control. Sin embargo, nuestra población de estudio incluyó exclusivamente a voluntarios no anémicos y, por lo tanto, es factible pensar que, la mejora en el rendimiento de los métodos de concentración después de la dilución de la sangre se produce por la simple dilución de la sangre, evitando su interferencia con el proceso de captura de plaquetas o células blancas por el sistema y, que la preexistencia de valores reducidos de plaquetas o células blancas en el hematocrito conduciría inexorablemente a una pobre concentración de estas líneas celulares en el PRP, independientemente de si se realiza la dilución de sangre o se mejora el rendimiento del sistema.

Por lo tanto, la variabilidad demográfica determinada por la edad del sujeto, y dado que esta afectan directamente al producto final, debe ser tomada en cuenta, y no con fines comerciales, sino para establecer un enfoque personalizado de tratamiento como posibles receptores válidos de un tratamiento con PRP con o sin células blancas y poder establecer las probabilidades de éxito de dicho tratamiento.

Tras los resultados obtenidos con la edad de los voluntarios se amplió el estudio para tratar de determinar si el sexo de los participantes sería también una variable a tener en

cuenta a la hora de establecer un protocolo de éxito en la infusión de los concentrados sanguíneos.

Se sabe que los marcadores moleculares protectores disminuyen con la edad (81,115) y más marcadamente en los hombres que en las mujeres (170) destacando una relación entre el dimorfismo hormonal; a través de la regulación diferencial de la expresión de múltiples factores de crecimiento y la ocurrencia de estos eventos (120,170). Los estrógenos ralentizan los efectos del envejecimiento que se vuelven más notorios después de la menopausia (170). Este dimorfismo hormonal también conlleva un dimorfismo inmunológico (116,121,122) asociado con la expresión diferencial de los receptores de citocinas (123) y una predisposición diferente por género a las enfermedades (123,124).

Al igual que en estudios anteriores, no encontramos que en su conjunto el sexo del sujeto influyera en el recuento de plaquetas o leucocitos del PRP (Evanson 2014; Weibrich 2002; Xiong 2018). Estos interesantes trabajos enfocaron las inconsistencias en los resultados de los ensayos clínicos de PRP a las variaciones en el contenido proteómico de PRP entre hombres y mujeres y, con el aumento de la edad del individuo. Sin embargo, no comprobaron los cambios en la composición celular en grupos de edad y sexo, cuando se sabe que la presencia de leucocitos puede alterar los niveles de factores de crecimiento. (53,127).

En nuestro estudio se encontraron diferencias significativas en la concentración de neutrófilos en el PRP de hombres y mujeres, que se restringieron a grupos específicos de edad y sexo después de la división de cada género por edad; los hombres jóvenes tenían neutrófilos significativamente más altos en PRP que las mujeres después de los 50 años. La composición de los linfocitos también varió significativamente entre los grupos de edad y sexo, siendo la edad un factor más relevante que el sexo, a pesar de que las diferencias de género eran insignificantes antes de estratificar la población por edad.

Por lo tanto, el sexo del voluntario sería una variable demográfica útil para predecir diferencias en el contenido de neutrófilos en PRP, pero no para predecir la composición de leucocitos, que fue fuertemente influenciada por la edad.

Las diferencias en la composición de leucocitos entre los grupos de edad y sexo fueron más pronunciadas en la sangre periférica que en el PRP. La influencia del dimorfismo sexual y el envejecimiento natural en la composición de los leucocitos en la sangre periférica se ha descrito en detalle en grandes poblaciones de donantes (116,121). Las células mononucleares del sistema inmunológico disminuyen con el envejecimiento, aunque de

forma más sostenida en mujeres que en hombres (121) , mientras que la densidad de neutrófilos en sangre aumenta significativamente en hombres y disminuye en mujeres a medida que avanza la edad, con concentraciones más altas en mujeres menores de 50 años que en hombres jóvenes (116,122). Este dimorfismo inmunológico está estrechamente relacionado con las hormonas sexuales, ya que el retraso de la apoptosis de neutrófilos y la disminución de la producción de linfocitos se asocian con el nivel circulante de estradiol (116,171) y también con cambios inherentes al proceso de envejecimiento que dan como resultado niveles elevados de niveles basales inflamación y capacidad alterada para montar respuestas inmunes innatas y adaptativas eficientes a los patógenos (123,172). En conjunto explicaría la evolución en el número circulante de neutrófilos y linfocitos observada en nuestro trabajo en los grupos de edad-sexo, así como la fuerte disminución de neutrófilos y linfocitos observada en mujeres mayores de 50 años frente a jóvenes o la fuerte disminución de linfocitos, mayor en hombres que en mujeres, en personas mayores de 50 años.

La disminución de la variabilidad interindividual para todas las fracciones celulares en la sangre circulante y la disminución de la variabilidad de la eficiencia del sistema cuando se dividió la población en grupos de edad reflejaron esta influencia de la edad en el dimorfismo sexual.

De esta forma se podría pensar que la densidad de leucocitos circulantes en sangre según grupos de edad y sexo debería ser un buen predictor de la concentración celular en PRP. Sin embargo, como hemos visto, las discrepancias en las densidades celulares entre los grupos en sangre no se correlacionaron con las encontradas en PRP. Esto se atribuyó a la diferente eficiencia del sistema para capturar células entre géneros y entre grupos de edad y sexo.

Si recordamos, nuestro sistema funciona con un gradiente de captura de células, las células mas pequeñas se recuperan mejor que las mas grandes e influye el protocolo de centrifugación en la recuperación de las mismas, aunque en todos los protocolos se siguieron estrictamente los indicados por el fabricante. Durante el estudio la eficiencia en la concentración de linfocitos prácticamente duplicó la de las células fagocíticas. Otros sistemas incluso los cuadruplican (53). Esto conduce a una sobrerrepresentación de la línea de linfocitos en PRP en comparación con la de las células fagocíticas, con respecto a los valores en sangre periférica y explica la gran variación entre sujetos en la captura de linfocitos, ya que los linfocitos comprenden un conjunto heterogéneo de células que varían con envejecimiento y sexo de los voluntarios (123). Es importante señalar que el papel de los

linfocitos sería insignificante en comparación con las células fagocíticas en las infecciones agudas, si se desea la terapia de infiltración de leucocitos.

En segundo lugar, se observó un gradiente de eficiencia dependiente de la densidad particular de cada célula sanguínea; cuanto menor sea la densidad de la sangre circulante, mayor será la captura de células. Esta eficiencia del sistema dependiente de la densidad fue más pronunciada para la recuperación de leucocitos, dadas las condiciones de aceleración desfavorables impuestas para las células blancas en comparación con las plaquetas. La suma de los efectos de ambos gradientes de eficiencia debería ser más notable para los tipos de células mal capturadas con baja densidad en la sangre circulante.

La eficiencia de captura diferencial según el tipo de glóbulo y la densidad relativa de cada tipo de célula en sangre, explicaría por qué las diferencias en la composición leucocitaria de PRP entre sexos o grupos de edad-sexo no se traducen en diferencias en el recuento del conjunto de células blancas en el PRP y también para explicar por qué muchas diferencias en la composición de la sangre no estaban presentes en el PRP. Esta “eficiencia compensatoria del sistema” tendió a reducir e incluso revertir la diferente composición de los glóbulos blancos entre los grupos predicha por el recuento sanguíneo circulante (como comparación de monocitos entre géneros o comparaciones de varios glóbulos blancos entre grupos de edad y sexo). En el PRP, solo las diferencias más marcadas en sangre para los tipos de células con baja eficiencia de captura persistieron significativamente, mientras que para las células con una eficiencia de captura más óptima permanecieron sin cambios (linfocitos).

Por lo tanto, tanto la edad como el sexo deben tenerse en cuenta como modificadores importantes de la composición del PRP, que debe predecirse a partir de las densidades celulares en la sangre circulante y después del conocimiento de la capacidad del sistema para concentrar glóbulos y su eficiencia compensatoria según el tipo de sangre. Esto podría controlarse con el resultado del hemograma del paciente antes de obtener el PRP con el fin igualmente de optimizar la extracción y estandarizar protocolos.

11.3. MONTECARLO; PROBABILIDAD DE ÉXITO DE LA TERAPIA

La simulación de MonteCarlo es una aproximación matemática que permite extender el pronóstico de la eficacia antimicrobiana a una población de sujetos extremadamente amplia tomando como punto de partida la respuesta observada en un reducido número de sujetos y la variabilidad en la respuesta en una población más amplia que presenta factores modificadores de esta respuesta (173). A partir de esta aproximación matemática pudimos determinar, en 1.000 sujetos, la probabilidad de alcanzar el éxito terapéutico, contención y reducción de la biocarga microbiológica, atendiendo a la eficiencia del dispositivo concentrador empleado para la captura de neutrófilos y plaquetas y la variabilidad del concentrado de acuerdo a las variables demográficas documentadas en esta memoria que actuarían como principales factores que pueden modificar la respuesta.

Como reflejan nuestros resultados, cualquiera de los dispositivos utilizados, a excepción del sistema clásico de Wego, que dispone de un gel separador que excluye a las células blancas, podría ser efectivamente utilizado para la contención de la carga bacteriana en las DPIs siempre que los leucocitos fueran inoculados en presencia de suero fresco del voluntario. Solo el sistema Easy-kit, con mayor capacidad de captura de neutrófilos (y células blancas en general) podría implementar este efecto en un pequeño porcentaje de la población consiguiendo reducciones de hasta 1 log UFC/ml. En comparación, el resto de dispositivos exhibirían un comportamiento semejante aunque sería preferible el uso de los tubos citrados por sus mínimas, aunque mejores probabilidades de éxito en cuanto a la extensión del efecto. El sistema Easy-kit se mostraría más efectivo frente a hombres jóvenes y alcanzaría menores tasas de éxito, comparativamente, en mujeres mayores de 50 años de edad, especialmente frente a los organismos Gran-negativos.

La presencia de respuestas específicas (Ig), contribuiría a alcanzar éxito terapéutico en el 100% de los sujetos cuando se persigue un efecto bactericida, con independencia del sistema (a excepción del sistema clásico de Wego) y de los factores demográficos de sexo o edad del individuo.

En el caso de la terapia con plaquetas, cualquier dispositivo podría disponer de densidades de plaquetas para cubrir prácticamente el 100% de los pacientes aportando reducciones de la biocarga en al menos 1 Log UFC/ml. De acuerdo a la extensión del efecto,

probabilidad de alcanzar reducciones en más de 1 log UFC/ml, el sistema Easy-kit y a mayor distancia, el método que empleó tubos citrados, serían de elección, especialmente frente a las infecciones por especies Gram negativas. Al igual que con los neutrófilos, la densidad de plaquetas que consigue el sistema Easy-kit de acuerdo al sexo y edad del sujeto, aportaría una mayor extensión del efecto y un mayor éxito en hombres menores de 50 años, semejante en hombres mayores de 50 años y mujeres menores de 50 años y más limitado, especialmente frente a las especies Gram negativas, frente a mujeres mayores.

A pesar de la gran actividad antimicrobiana observada y las altas tasas de éxito pronosticadas a partir de los diferentes sistemas de captura de células y en función de las características demográficas de los pacientes, la corta duración de nuestros ensayos (5 horas) no permite especular sobre el efecto sostenido de la terapia y por lo tanto resultaría atrevido promover el uso del PRP rico en leucocitos como estrategia única y definitiva de las UDIs. Este periodo de experimentación se definió en consonancia con la dificultad de mantener la viabilidad, *ex vivo*, de los neutrófilos durante periodos prolongados (155), si bien es cierto que la supervivencia de las plaquetas podría haber sido significativamente superior (158). Por otro lado nuestros resultados deben ser entendidos a partir de una estrategia que implique la administración independiente de ambas fracciones y la secuencialidad de esta administración no ha sido examinada en el presente estudio. En nuestro estudio la actividad de los leucocitos refiere a un estado de aplicación en suspensión, y por lo tanto suma junto al efecto de la liberación de sustancias activas desde los leucocitos el efecto fundamental de la fagocitosis, cuando en la práctica clínica, los leucocitos son aplicados en un gel de fibrina (150,163). Un estudio especuló que la concentración crítica de neutrófilos en los geles de fibrina debería ser superior a la densidad de neutrófilos en suspensión para alcanzar el mismo efecto antimicrobiano (106), y esto estaría probablemente relacionado con la obstaculización del proceso de fagocitosis de los neutrófilos embebidos en gel.

Además un estudio reciente ha revelado que el gel de fibrina puede actuar disminuyendo la difusión de sustancias antimicrobianas degranuladas por ambas, plaquetas y leucocitos (163). No obstante en este caso, si bien el efecto es patente, la técnica de difusión en disco utilizada para valorar la actividad induce a pensar que esta limitación tendría un fuerte componente artificioso producto de la baja sensibilidad de la técnica que sobreestima este impedimento de la liberación de sustancias activas a un todo o nada. Este aspecto unido a la fuerte variabilidad observada entre donantes sobre *P. aeruginosa* (como hemos visto en nuestro estudio) podría explicar los inconsistentes resultados de espectro (161) y

de actividad documentados en diferentes estudios con el gel de plaquetas y con el gel de PRP-leucocitos frente a esta especie (147,150,162,163).

Importantemente varios estudios (163,174) revelan que el reemplazo de la centrifugación en ángulo fijo por una centrifugación horizontal, conduce a un dramático incremento de la actividad antimicrobiana del gel de plaquetas y leucocitos. Las densidades de las fracciones sanguíneas obtenidas son equivalentes con ambos tipos de centrifugaciones pero el gel procedente de la centrifugación horizontal origina un mayor espectro de acción y mayor extensión del efecto antimicrobiano. Estos autores especulan que la actividad del gel húmedo frente al gel seco conseguido con la centrifugación convencional no es solamente atribuido a un aumento de la actividad leucocitaria sino también a una fuerte correlación con el alto componente del exudado que es liberado.

Independientemente, bien administradas separadamente o en gel, el PRP rico en leucocitos debería ser considerado un complemento que reforzase el manejo normal de la úlcera diabética soportado por el desbridamiento mecánico convencional y, o, por el tratamiento antimicrobiano preciso de la úlcera. En este escenario la actividad de los neutrófilos se debería incrementar significativamente dado que incluso a concentraciones sub-inhedoras se ha demostrado que los antimicrobianos potencian la fagocitosis, bien por acción directa colaborando intracelularmente sobre las bacterias fagocitadas o bien indirectamente al modificar la fisiología y factores de virulencia bacterianos que en circunstancias normales limitarían la acción de los fagocitos (155,175).

Todas estas estas estrategias perseguirían el objetivo único de reducir la biocarga biológica de las úlceras infectadas facilitando así la restauración natural del proceso de cicatrización (154).

12. CONCLUSIONES

12. CONCLUSIONES

1. Los neutrófilos y especialmente las plaquetas, exhiben un potente efecto antibacteriano frente a las especies bacterianas más prevalentes en las infecciones de pie diabético. El patrón de actividad es muy similar para ambas fracciones de la sangre y es consistente con una fuerte dependencia de la concentración expuesta, de la especie bacteriana y al menos en *S. aureus* de la cepa ensayada.
2. La fagocitosis es el principal mecanismo de la acción de los neutrófilos como demuestra el incremento de la actividad neutrofílica en presencia de *opsoninas* termoestables. La presencia de opsoninas termorresistentes en el suero del sujeto; por ejemplo las inmunoglobulinas, debería incrementar significativamente la actividad fagocitaria.
3. Concentraciones de neutrófilos próximos al umbral de neutropenia serían suficientes para contener la biocarga de las úlceras infectadas por estos microorganismos. Concentraciones de $\approx 1 \times 10^7$ neutrófilos/ml podrían desencadenar reducciones en la biocarga de hasta 1 log UFC/ml. No obstante estas concentraciones de neutrófilos difícilmente se alcanzan con los sistemas concentradores de sangre utilizados.
4. Concentraciones de plaquetas inferiores a $4,7 \times 10^5$ plaquetas/ml, serían suficientes para contener la biocarga de las úlceras infectadas por estos microorganismos. Concentraciones $\approx 2 \times 10^9$ neutrófilos/ml, factibles de alcanzar con los sistemas concentradores de la sangre examinados, desencadenarían reducciones en la biocarga de hasta 2 log UFC/ml, independientemente de la especie bacteriana y de hasta 3 log UFC/ml en las Gram-negativas.
5. Atendiendo a la composición del PRP preparado a partir de los diferentes sistemas de fraccionamiento y concentración de la sangre, el dispositivo comercial Easy Kit ofrece ventajas sustanciales con respecto a la densidad final de plaquetas y neutrófilos concentrados. Easy Kit quintuplica la densidad de plaquetas en suero y duplica la densidad concentrada por el resto de dispositivos. Duplica la densidad de neutrófilos en suero y en el concentrado de los dispositivos no sujetos a la tecnología de separación del gel de sílice, que muestran, en general, serias deficiencias para la preparación de concentrados leucocitarios.

7. La destreza del especialista clínico en la preparación del PRP influye en la calidad del producto final obtenido. Los concentrados conseguidos con Easy Kit en este trabajo estuvieron muy alejados de los estándares de calidad que atribuye al producto el fabricante.
8. La variabilidad entre sujetos condiciona la calidad del PRP obtenido. Esta variabilidad está predeterminada por los factores demográficos, edad y sexo. Identificamos que la edad del sujeto es un factor más determinante que el sexo en la preparación del PRP aunque, tras la menopausia, el dimorfismo sexual altera significativamente la composición de leucocitos presente en el PRP.
9. El sistema de fraccionamiento y separación de la sangre influye en la captura diferencial de las células de la sangre. Los sistemas muestran una tendencia natural a concentrar más eficientemente plaquetas y linfocitos que neutrófilos o monocitos. Esta captura selectiva impide el pronóstico de la concentración de los principales efectores de la respuesta inmediata frente a la infección a partir del recuento total de leucocitos determinado en los concentrados.
11. Los sistemas de fraccionamiento y separación de la sangre además muestran un gradiente de concentración que depende de la densidad específica de cada tipo de célula sanguínea en el hematocrito del sujeto; a menor concentración en el hematocrito mayor eficiencia de captura del dispositivo. Este mecanismo compensa parcialmente las deficiencias de neutrófilos y monocitos en el hematocrito de determinados grupos de sujetos de acuerdo a su edad y sexo en los concentrados preparados por los sistemas no sujetos a la tecnología del gel de sílice.
12. La probabilidad de alcanzar el éxito terapéutico, contención y reducción de la biocarga microbiológica, de acuerdo a la eficiencia del dispositivo concentrador y la variabilidad del concentrado atendiendo a la edad y sexo de los sujetos, sería superior utilizando el sistema Easy kit en la preparación del PRP. Los concentrados preparados con este sistema podrían alcanzar reducciones de la biocarga de cualquiera de las especies más prevalentes en las infecciones de pie diabético, próximas a 1 log UFC/ml, gracias a los neutrófilos concentrados y en más de 1 log UFC/ml, gracias a las plaquetas concentradas, en la totalidad de sujetos con independencia de su edad y sexo.
13. La terapia combinada de PRP con leucocitos parece idónea para restablecer la cicatrización de las heridas infectadas. No obstante la limitada duración de nuestros

12. Conclusiones

experimentos llama a utilizar este procedimiento con cautela y en todo caso en combinación con otros procedimientos habituales de manejo de las úlceras diabéticas infectadas, el desbridamiento y, o, el tratamiento antimicrobiano.

12. CONCLUSIONS

1. Neutrophils, and especially platelets, exhibit a powerful antibacterial effect against the bacterial species that are most prevalent in diabetic foot infections. The activity pattern is remarkably similar for both blood fractions and is strongly dependent on the exposure concentration, bacterial species, and, at least in the case of *Staphylococcus aureus*, of the assayed strain.
2. The main mechanism of action of neutrophils is phagocytosis, as shown by the increase in neutrophilic activity in the presence of thermostable opsonins. The presence of heat resistant opsonins (e.g., immunoglobulins) in patient serum should significantly increase phagocytic activity.
3. Neutrophil concentrations close to the neutropenic threshold are sufficient to contain the bioburden of ulcers infected by bacterial microorganisms. Indeed, concentrations of $\approx 1 \times 10^7$ neutrophils/mL can lead to reductions in the bioburden of up to 1 log CFU/mL. However, it is difficult to reach these concentrations of neutrophils with currently used blood concentrating systems.
5. Platelet concentrations lower than 4.7×10^5 platelets/mL are sufficient to contain the bioburden of ulcers infected by these microorganisms. Concentrations of 2×10^9 neutrophils/mL, which can be feasibly achieved with the blood concentrating systems examined here, would trigger bioburden reductions of up to 2 log CFU/mL regardless of the bacterial species, and of up to 3 log CFU/mL in Gram-negative species.
6. Considering the composition of the platelet-rich plasma (PRP) prepared from different blood concentration and fractionation systems, there are notable advantages to the commercial Easy Kit device in terms of the final density of platelets and concentrated neutrophils that can be obtained using it. Easy Kit quintupled the density of platelets in the serum and doubled the concentrated density achieved by the other devices tested. It doubled both the serum neutrophil density as well as the concentration achieved with devices that do not use silica gel separation technology, which in general, show some serious deficiencies related to the preparation of leukocyte concentrates.
7. Regarding the preparation of PRP, the skill of the clinical specialist somewhat influences the quality of the final product obtained. The concentrates obtained with

Easy Kit in this present work greatly varied from the quality standards attributed to the product by its manufacturer.

8. The quality of the PRP obtained is conditioned by patient variability. This variability is predetermined by demographic factors, age, and sex. We found that patient age was a more determining factor than sex in the preparation of PRP, although after menopause, sexual dimorphism caused significant alterations in the composition of PRP in terms of the number of leukocytes present.
9. The blood fractionation and separation system influenced the differential capture of blood cells. The systems tested tended to concentrate platelets and lymphocytes more efficiently than neutrophils or monocytes. This selective capture impeded prediction of the concentrations of the main effectors of the immediate response to infection, which is based on the total leukocyte count determined in the concentrates.
10. Blood fractionation and separation systems were also shown to have a concentration gradient that depended on the specific density of each type of blood cell present in the patient's haematocrit; the lower the haematocrit concentration, the higher the capture efficiency of the device. This mechanism partially compensated for the deficiencies in neutrophils and monocytes in the haematocrit of certain groups of patients, according to their age and sex, especially in the concentrates prepared by systems not subject to silica gel technology.
11. The probability of achieving therapeutic success, containment, and a reduction in the microbiological bioburden, according to the efficiency of the concentrator device and variability of the concentrate based on patient age and sex, was higher when using the Easy kit system to prepare the PRP. In every patient, regardless of age and sex, the concentrates prepared with this system could reduce the bioburden (close to 1 log CFU/mL) of any of the most prevalent species in diabetic foot infections thanks to the concentrated neutrophils (at more than 1 log CFU/mL) and concentrated platelets.
12. A combination therapy of PRP with leukocytes appears to be suitable for restoring the self-healing capacity of infected wounds. However, the limited duration of our experiments means that this procedure must be used with caution and always in combination with other common procedures for the management of infected diabetic ulcers, such as debridement and/or antimicrobial treatment.

13. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

13.1. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- Trevisón B, Becerro-de-Bengoa-Vallejo R, Sevillano D, González N, Losa- Iglesias M, López-López D, Alou L. Commercial blood cell separation systems vs tube centrifugation methods for the preparation of platelet-rich plasma: A preliminary cross-sectional study. Rev Assoc Med Bras. 2020. Aceptado

13.2. CURSOS

- Actividades formativas 1 y 2 del doctorado salud y motricidad humana. Año académico 2019/2020
- Programa formativo en competencias avanzadas en investigación clínica. Estadística aplicada a la investigación clínica. Acreditado por la comisión de formación continuada de las profesiones sanitarias SNS con 5,3 créditos de formación, con número de expediente 07-AFOC-03035.1/2019. Marzo 2020.
- Programa formativo en competencias avanzadas en investigación clínica. Lectura crítica de artículos científicos. Acreditado por la comisión de formación continuada de las profesiones sanitarias SNS con 3 créditos de formación, con número de expediente 07-AFOC-02988.1/2019. Marzo 2020.
- Búsqueda de información científica en las áreas de ciencia e ingenierías (Doctorado). Escuela de formación Universidad de León. 10 horas lectivas. Junio 2020.
- Actividad formativa 4 contemplada en la memoria de verificación del programa de doctorado de salud y motricidad humana. Junio 2020.
- Gestión de publicaciones en salud, sociedad e innovación. 3 horas lectivas. Julio 2020.

13.3. ESTANCIAS

- Estancia de formación en el área de microbiología del departamento de Medicina, formación especializada y de perfeccionamiento sobre el tratamiento antiinfeccioso en la patología humana; Estudio de los métodos de sensibilidad a los antibacterianos e iniciación al estudio de vigilancia epidemiológica. 2018/2019. Universidad Complutense de Madrid. Duración; 700 horas.
- Estancia de formación en Investigación y Proyectos Microbiológicos S.L., formación especializada y de perfeccionamiento sobre técnicas microbiológicas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los agentes antiinfecciosos: octubre 2019/ enero 2020. Universidad Complutense de Madrid. Duración; 240 horas.
- Estancia internacional predoctoral, orientada al conocimiento docente de la titulación de grado, postgrado y doctorado, conocimiento de técnicas y nuevas infraestructuras de investigación, y a la realización del trabajo de investigación de la tesis doctoral. 1 Junio 2019/ 15 Septiembre 2020. Universidad Oporto Portugal.

14. BIBLIOGRAFÍA

14. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. WHO. 2013;
2. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2020 Sep 6];37(SUPPL.1):S81–90. Available from: https://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S81
3. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus [Internet]. Vol. 122, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. Georg Thieme Verlag; 2014 [cited 2020 Sep 6]. p. 384–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25014088/>
4. OMS | Informe mundial sobre la diabetes. WHO [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 6]; Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>
5. Dardano A, Penno G, Del Prato S, Miccoli R. Optimal therapy of type 2 diabetes: A controversial challenge. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 6];6(3):187–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24753144/>
6. Skin Complications | ADA [Internet]. [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/complications/skin-complications>
7. Eye Complications | ADA [Internet]. [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/complications/eye-complications>
8. Neuropathy | ADA [Internet]. [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/complications/neuropathy>

9. DKA (Ketoacidosis) & Ketones | ADA [Internet]. [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/complications/dka-ketoacidosis-ketones>
10. Kidney Disease (Nephropathy) | ADA [Internet]. [cited 2020 Sep 6]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/complications/kidney-disease-nephropathy>
11. Brem H, Sheehan P, Boulton AJM. Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *Am J Surg*. 2004 May 1;187(5 SUPPL. 1):S1–10.
12. American diabetes association standards of medical care in diabetes-2017.
13. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1997: Endothelial dysfunction, neuropathy and the diabetic foot, diabetic mastopathy, and erectile dysfunction. In: *Diabetes Care* [Internet]. American Diabetes Association Inc.; 1998 [cited 2020 Oct 12], p. 183–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9538990/>
14. Cole BE. Diabetic Peripheral Neuropathic Pain: Recognition and Management. *Pain Med* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2020 Oct 12];8(suppl 2):S27–32. Available from: <https://academic.oup.com/painmedicine/article-lookup/doi/10.1111/j.1526-4637.2007.00349.x>
15. PR C, JS U, GM C. New developments in the biomechanics of the diabetic foot. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2000 [cited 2020 Oct 12];16 Suppl 1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11054880/>
16. Thomas PK. Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. In: *Diabetes* [Internet]. American Diabetes Association Inc.; 1997 [cited 2020 Nov 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9285500/>

14. Bibliografía

17. Kästenbauer T, Irsigler P, Sauseng S, Grimm A, Prager R. The prevalence of symptoms of sensorimotor and autonomic neuropathy in Type 1 and Type 2 diabetic subjects. *J Diabetes Complications* [Internet]. 2004 Jan 2 [cited 2020 Oct 12];18(1):27–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15019596/>
18. Mueller MJ, Hastings M, Commean PK, Smith KE, Pilgram TK, Robertson D, et al. Forefoot structural predictors of plantar pressures during walking in people with diabetes and peripheral neuropathy. *J Biomech* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2020 Oct 12];36(7):1009–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12757810/>
19. Meijer J-WG, Bosma E, Lefrandt JD, Links TP, Smit AJ, Stewart RE, et al. Clinical Diagnosis of Diabetic Polyneuropathy With the Diabetic Neuropathy Symptom and Diabetic Neuropathy Examination Scores [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <http://care.diabetesjournals>.
20. Faglia E, Clerici G, Caminiti M, Quarantiello A, Gino M, Morabito A. The Role of Early Surgical Debridement and Revascularization in Patients With Diabetes and Deep Foot Space Abscess: Retrospective Review of 106 Patients With Diabetes. *J Foot Ankle Surg* [Internet]. 2006 Jul [cited 2020 Oct 12];45(4):220–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16818148/>
21. Strandness de, priest re, gibbons ge. combined clinical and pathologic study of diabetic and nondiabetic peripheral arterial disease. *Diabetes* [Internet]. 1964 [cited 2020 Oct 12];13:366–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14210680/>
22. Puras-Mallagray E, Gutiérrez-Baz M, Cáncer-Pérez S, Alfayate-García JM, De Benito-Fernández L, Perera-Sabio M, et al. A study of the prevalence of peripheral arterial disease and diabetes in Spain. *Angiologia*. 2008 Jan 1;60(5):317–26.

23. N Senneville E. Infection and diabetic foot. *Rev Med Interne*. 2008;29((Suppl. 2):3):243-8o.
24. Schaper NC. Diabetic foot ulcer classification system for research purposes: A progress report on criteria for including patients in research studies. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2004 May [cited 2020 Oct 12];20(SUPPL. 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15150820/>
25. Aragón-Sánchez J. Treatment of diabetic foot osteomyelitis: A surgical critique. *Int J LowExtrem Wounds*. 2019;9(1):37-59.
26. Ledoux WR, Shofer JB, Smith DG, Sullivan K, Hayes SG, Assal M, et al. Relationship between foot type, foot deformity, and ulcer occurrence in the high-risk diabetic foot. *J Rehabil Res Dev* [Internet]. 2005 Sep [cited 2020 Oct 12];42(5):665-71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16586192/>
27. Viadé J. Guía práctica para la prevención, evaluación y tratamiento. Ed Médica. Pie Diabético. Madrid; 2006.
28. Bus SA. Foot structure and footwear prescription in diabetes mellitus. In: *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* [Internet]. *Diabetes Metab Res Rev*; 2008 [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18386782/>
29. Jeffcoate WJ, Macfarlane RM, Fletcher EM. The Description and Classification of Diabetic Foot Lesions. *Diabet Med* [Internet]. 1993 [cited 2020 Oct 12];10(7):676-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8403832/>
30. J. MR. Úlceras de la extremidad inferior. Glosa. Barcelona; 2005.

14. Bibliografía

31. Esmatjes E, Vidal J. Cardiac repercussion in diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 1998 [cited 2020 Oct 12];51(8):661–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9780781/>
32. Prompers L, Huijberts M, Apelqvist J, Jude E, Piaggese A, Bakker K, et al. High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. *Diabetologia* [Internet]. 2007 Jan [cited 2020 Oct 12];50(1):18–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17093942/>
33. Lipsky BA, Berendt AR, Cornia PB, Pile JC, Peters EJG, Armstrong DG, et al. 2012 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guideline for the Diagnosis and Treatment of Diabetic Foot Infections a. 2012;54:132–73.
34. Pecoraro RE, Reiber GE, Burgess EM. Pathways to diabetic limb amputation: Basis for prevention. *Diabetes Care* [Internet]. 1990 [cited 2020 Oct 12];13(5):513–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2351029/>
35. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections [Internet]. Vol. 39, *Clinical Infectious Diseases*. *Clin Infect Dis*; 2004 [cited 2020 Oct 12]. p. 885–910. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15472838/>
36. Goldstein EJC, Citron DM, Nesbit CA. Diabetic foot infections: Bacteriology and activity of 10 oral antimicrobial agents against bacteria isolated from consecutive cases. *Diabetes Care* [Internet]. 1996 [cited 2020 Oct 12];19(6):638–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8725864/>

37. Lipsky BA, Berendt AR, Deery HG, Embil JM, Joseph WS, Karchmer AW, et al. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections [Internet]. Vol. 117, Plastic and Reconstructive Surgery. *Plast Reconstr Surg*; 2006 [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16799390/>
38. Pathare NA, Bal A, Talvalkar GV AD. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. *Indian J Pathol Microbiol*. 1998;41(4):437–41.
39. Hartemann-Heurtier A, Robert J, Jacqueminet S, Ha Van G, Golmard JL, Jarlier V, et al. Diabetic foot ulcer and multidrug-resistant organisms: Risk factors and impact. *Diabet Med* [Internet]. 2004 Jul [cited 2020 Oct 12];21(7):710–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15209763/>
40. San Sebastian KM, Lobato I, Hernández I, Burgos-Alonso N, Gomez-Fernandez MC, López JL, et al. Efficacy and safety of autologous platelet rich plasma for the treatment of vascular ulcers in primary care: Phase III study. *BMC Fam Pract* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 6];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547983/>
41. Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):1–10.
42. Li L, Chen D, Wang C, Yuan N, Wang Y, He L, et al. Autologous platelet-rich gel for treatment of diabetic chronic refractory cutaneous ulcers: A prospective, randomized clinical trial. *Wound Repair Regen*. 2015;23(4):495–505.
43. Serra N. Tratamiento local de las úlceras. In: *Anales de Cirugía Cardíaca y Vascular*. 2001. p. 7(4):326–335.

14. Bibliografía

44. Edmonds M, Foster A. The use of antibiotics in the diabetic foot. *Am J Surg* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2020 Oct 15];187(5 SUPPL. 1):S25–8. Available from: <http://www.americanjournalofsurgery.com/article/S0002961003003003/fulltext>
45. Kalan LR, Meisel JS, Loesche MA, Horwinski J, Soaita I, Chen X, et al. Strain- and Species-Level Variation in the Microbiome of Diabetic Wounds Is Associated with Clinical Outcomes and Therapeutic Efficacy. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019 May 8 [cited 2020 Oct 15];25(5):641-655.e5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31006638/>
46. Zamudio Godínez L. Cálculos del volumen sanguíneo. Vol. 10, *Rev Mex Med Tran.* 2017.
47. Przygodzki T, Luzak B, Kassassir H, Mnich E, Boncler M, Siewiera K, et al. Diabetes and hyperglycemia affect platelet GPIIIa expression. Effects on adhesion potential of blood platelets from diabetic patients under in vitro flow conditions. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 2 [cited 2020 Dec 20];21(9). Available from: [/pmc/articles/PMC7247361/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344441/)
48. P. mt. interpretaci3n cl3nica del hemograma. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 2015 Nov 1;26(6):713–25.
49. Lilian Sanhueza M, Luciana Concha L., Pilar Durruty A. MG de los RA. Alteraciones hematológicas en la Diabetes Mellitus. *Rev chil endocrinol diabetes.* 2014;7:137–42.
50. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):638–46.

51. Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Borzini P. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex®. *Vox Sang* [Internet]. 2008 Apr [cited 2020 Nov 2];94(3):202–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179680/>
52. Fadadu PP, Mazzola AJ, Hunter CW, Davis TT. Review of concentration yields in commercially available platelet-rich plasma (PRP) systems: A call for PRP standardization [Internet]. Vol. 44, *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. BMJ Publishing Group; 2019 [cited 2020 Jul 5]. p. 652–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30992411/>
53. Mazzocca AD, Mccarthy MBR, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, et al. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. 2012;
54. Xiong G, Lingampalli N, Koltsov JCB, Leung LL, Bhutani N, Robinson WH, et al. Men and Women Differ in the Biochemical Composition of Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2020 Jul 23];46(2):409–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29211968/>
55. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification [Internet]. Vol. 4, *Skin Appendage Disorders*. S. Karger AG; 2018 [cited 2020 Sep 7]. p. 18–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29457008/>
56. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med* [Internet]. 2006 Nov [cited 2020 Jul 7];34(11):1774–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16735582/>

14. Bibliografia

57. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: Basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* [Internet]. 2008 Jul [cited 2020 Nov 2];22(6):433–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18594311/>
58. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: From the wound healing to bone regeneration [Internet]. Vol. 10, *Immunity and Ageing. Immun Ageing*; 2013 [cited 2020 Nov 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23763951/>
59. Wang SZ, Fan WM, Jia J, Ma LY, Yu J Bin, Wang C. Is exclusion of leukocytes from platelet-rich plasma (PRP) a better choice for early intervertebral disc regeneration? *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Jul 18 [cited 2020 Nov 2];9(1). Available from: </pmc/articles/PMC6052621/?report=abstract>
60. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery [Internet]. Vol. 18, *Facial Plastic Surgery*. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2002 [cited 2020 Nov 2]. p. 27–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11823930/>
61. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. Vol. 37, *American Journal of Sports Medicine*. *Am J Sports Med*; 2009. p. 2259–72.
62. Pinto NR, Ubilla M, Zamora Y, Del Rio V, Dohan Ehrenfest DM, Quirynen M. Leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iplt20>

63. Hirase T, Ruff E, Surani S, Ratnani I. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: A systematic review. *World J Diabetes* [Internet]. 2018 Oct 15 [cited 2020 Oct 15];9(10):172–9. Available from: [/pmc/articles/PMC6198285/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31009668/)
64. Hesseler MJ, Shyam N. Platelet-rich plasma and its utility in medical dermatology: A systematic review [Internet]. Vol. 81, *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby Inc.; 2019 [cited 2020 Nov 2]. p. 834–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31009668/>
65. Kontopodis N, Tavlas E, Papadopoulos G, Pantidis D, Kafetzakis A, Chalkiadakis G, et al. Effectiveness of Platelet-Rich Plasma to Enhance Healing of Diabetic Foot Ulcers in Patients with Concomitant Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia. *Int J Low Extrem Wounds* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2020 Oct 15];15(1):45–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25795280/>
66. Dougherty EJ. An evidence-based model comparing the cost-effectiveness of platelet-rich plasma gel to alternative therapies for patients with nonhealing diabetic foot ulcers. *Adv Skin Wound Care* [Internet]. 2008 [cited 2020 Oct 15];21(12):568–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19065083/>
67. Ahmed M, Reffat SA, Hassan A, Eskander F. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Clean Diabetic Foot Ulcers. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Oct 15];38:206–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27522981/>
68. Subbiah DP, Kumar DG, Svan D, Kumar DP, Prashanth D, Rekha D. Treatment of Ulcers with Platelet Rich Plasma Impregnated Dressings. 2017;

14. Bibliografía

69. María Elizabeth Enríquez-Vega D, Omar Bobadilla-Flores N, Andrés Rodríguez-Jiménez Ó, Guerra-Márquez Á, Carrasco-Nava L, Varela-Silva J. Plasma rico en plaquetas para el tratamiento de úlceras isquémicas del paciente diabético. Vol. 40, Revista Mexicana de ANGIOLOGIA. 2012.
70. DP K. Plasma rico en plaquetas y eliminación del dolor neuropático. *Mol Neurobiol.* 2013;48:315–32.
71. Kuffler DP. El plasma rico en plaquetas promueve la regeneración de axones, la cicatrización de heridas y la reducción del dolor: realidad o ficción. *Mol Neurobiol.* 2015;52:990-1014.
72. Hirase T, Ruff E, Surani S, Ratnani I. Topical application of platelet-rich plasma for diabetic foot ulcers: A systematic review. *World J Diabetes [Internet].* 2018 Oct 15 [cited 2020 Jul 2];9(10):172–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30364787/>
73. Bernuzzi G, Tardito S, Bussolati O, Adorni D, Cantarelli S, Fagnoni F, et al. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: The experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. *Blood Transfus [Internet].* 2010 [cited 2020 Oct 15];8(4):237–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20967164/>
74. Piao L, Park H, Jo CH. Theoretical prediction and validation of cell recovery rates in preparing platelet-rich plasma through a centrifugation. Wang JH-C, editor. *PLoS One [Internet].* 2017 Nov 2 [cited 2020 Jul 5];12(11):e0187509. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0187509>
75. Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of Platelet-Rich Plasma Extraction: Variations in Platelet and Blood Components Be-

- tween 4 Common Commercial Kits. Orthop J Sport Med [Internet]. 2017 Jan 3 [cited 2020 Nov 2];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28210651/>
76. Castillo TN, Pouliot MA, Hyeon Joo Kim, Dragoo JL. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J Sports Med*. 2011;39(2):266–71.
77. Welsh WJ. Autologous platelet gel: clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmet Derm*. 2000;11:13.
78. Moreno Díaz R, Carreño MG, Torres JJ, Herreros JMA, Villimar A, Sánchez PL. Methods to obtain platelet-rich plasma and osteoinductive therapeutic use. *Farm Hosp* [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 7];39(3):130–6. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-63432015000300002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
79. McLellan J, Plevin S. Does it matter which platelet-rich plasma we use? *Equine Vet Educ* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2020 Jun 8];23(2):101–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-3292.2010.00185.x>
80. Hamid MSA. Cost Effectiveness of a Platelet-rich Plasma Preparation Technique for Clinical Use. *Wounds a Compend Clin Res Pract*. 2018;30(7):186–90.
81. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2002;30(2):97–102.
82. Gómez Martín B, Becerro de Bengoa Vallejo R LI, ME SGR. Plasma rich in growth factors (PRGF). *Rev Int Ciencias Podol*. 2007;1:7–10.

14. Bibliografía

83. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Ski Appendage Disord.* 2018;4(1):18–24.
84. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582012000100002
85. Lane TA. Granulocyte Storage. *Transfus Med Rev* [Internet]. 1990 [cited 2020 Sep 3];4(1):23–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2134614/>
86. El descubrimiento de las plaquetas. - Revista Biomédica [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: <https://www.yumpu.com/es/document/view/4282784/el-descubrimiento-de-las-plaquetas-revista-biomedica>
87. Martínez L. médicos-odontológicos. 7:150–62.
88. Lagunas JG, Especial A. Platelet-rich plasma.
89. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa [Internet]. [cited 2020 Sep 7]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-02892012000300002&lng=es&nrm=iso
90. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG GP. Las plaquetas liberan su contenido lisosómico in vivo en humanos tras la activación. *Thromb Haemost.* 2000;83:157–64.
91. Koupenova M, Kehrel BE, Corkrey HA FJ. Trombosis y plaquetas: una actualización. *Eur Hear J.* 2017;38:785–791.
92. Ali RA, Wuescher LM, Dona KR, Worth RG. Platelets Mediate Host Defense against *Staphylococcus aureus* through Direct Bactericidal Activity and by En-

- hancing Macrophage Activities . J Immunol [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2020 Jul 2];198(1):344–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27895175/>
93. Herron C. Know your WBCs. Nurs Made Incred Easy! [Internet]. 2012 Jan [cited 2020 Oct 18];10(1):11–5. Available from: <http://journals.lww.com/00152258-201201000-00005>
94. Atlas de hematología y análisis de frotis de sangre periférica | Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. [cited 2020 Oct 18]. Available from: <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1717§ionid=114913044>
95. Bertha G, Robledo V. Linfocitos [Internet]. Vol. 52, Rev Fac Med UNAM. 2009 [cited 2020 Oct 18]. Available from: www.medigraphic.comwww.medigraphic.org.mx
96. Rotger A, Gomez A, Cantón R, Vila J, Martín E, Cercenado E et al. Microbiología sanitaria y clínica. Madrid: Sintesis SA; 1997. 31–81 p.
97. Schiffer CA. Granulocyte Transfusions: An Overlooked Therapeutic Modality. Transfus Med Rev [Internet]. 1990 [cited 2020 Sep 7];4(1):2–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2134613/>
98. Wood AJJ, Pizzo PA. Management of Fever in Patients with Cancer and Treatment-Induced Neutropenia [Internet]. Vol. 328, New England Journal of Medicine. N Engl J Med; 1993 [cited 2020 Sep 3]. p. 1323–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469254/>
99. Hammer MC, Baltch AL, Sutphen NT, Smith RP, Conroy J V. Pseudomonas aeruginosa: quantitation of maximum phagocytic and bactericidal capabilities of nor-

14. Bibliografia

- mal human granulocytes. *J Lab Clin Med* [Internet]. 1981 Dec 1 [cited 2020 Sep 6];98(6):938–48. Available from: <https://europepmc.org/article/med/6796635>
100. Leijh PC, van den Barselaar MT, van Zwet TL, Dubbeldeman-Rempt I, van Furth R. Kinetics of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. *Immunology* [Internet]. 1979 Jun [cited 2020 Sep 6];37(2):453–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/381182>
101. Aboulafia DM MR. Hematologic abnormalities in AIDS. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1991;5(2):195-214.
102. Bartlett DB, Fox O, McNulty CL, Greenwood HL, Murphy L, Sapey E, et al. Habitual physical activity is associated with the maintenance of neutrophil migratory dynamics in healthy older adults. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2020 Sep 7];56:12–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26928196/>
103. Minervino D, Gumiero D, Nicolazzi MA, Carnicelli A, Fuorlo M, Guidone C, et al. Leukocyte Activation in Obese Patients. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015 Oct 9 [cited 2020 Sep 7];94(40):e1382. Available from: <http://journals.lww.com/00005792-201510010-00005>
104. Tasegian A, Curcio F, Dalla Ragione L, Rossetti F, Cataldi S, Codini M, et al. Hypovitaminosis D3, Leukopenia, and Human Serotonin Transporter Polymorphism in Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa. *Mediators Inflamm*. 2016;2016.
105. Bartholomeu-Neto J, Brito CJ, Nóbrega OT, Sousa VC, Oliveira Toledo J, Silva Paula R, et al. Adaptation to Resistance Training Is Associated with Higher Phagocytic (but Not Oxidative) Activity in Neutrophils of Older Women. *J Immunol*

- Res [Internet]. 2015 [cited 2020 Sep 7];2015. Available from: /pmc/articles/PMC4617425/?report=abstract
106. Li Y, Karlin A, Loike JD, Silverstein SC. A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Jun 11 [cited 2020 Sep 7];99(12):8289–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12060772/>
107. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Hoa NTT, Parry CM, et al. Quantitation of bacteria in blood of typhoid fever patients and relationship between counts and clinical features, transmissibility, and antibiotic resistance. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998 [cited 2020 Sep 7];36(6):1683–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9620400/>
108. Werner AS, Cobbs CG, Kaye D, Hook EW. Studies on the Bacteremia of Bacterial Endocarditis. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1967 Dec 16 [cited 2020 Sep 7];202(3):199–203. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/335715>
109. Price TH, Bowden RA, Boeckh M, Bux J, Nelson K, Liles WC, et al. Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* [Internet]. 2000 Jun 1 [cited 2020 Sep 7];95(11):3302–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/content/full/95/11/3302>
110. Johal H, Khan M, Yung S hang P, Dhillon MS, Fu FH, Bedi A, et al. Impact of Platelet-Rich Plasma Use on Pain in Orthopaedic Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis [Internet]. Vol. 11, *Sports Health*. SAGE Publications Inc.;

14. Bibliografia

- 2019 [cited 2020 Jul 23]. p. 355–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31136726/>
111. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489–96.
 112. Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: A meta-analysis. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2012 Feb 15;94(4):298–307.
 113. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg.* 2012 Mar;28(3):429–39.
 114. Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, Fu F, Terry MA, Randelli P, et al. Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: Evidence-based recommendations for treatment [Internet]. Vol. 21, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* *J Am Acad Orthop Surg*; 2012 [cited 2020 Jul 8]. p. 739–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24292930/>
 115. Evanson JR, Guyton MK, Oliver DL, Hire JM, Topolski RL, Zumbun SD, et al. Gender and Age Differences in Growth Factor Concentrations From Platelet-Rich Plasma in Adults. *Mil Med* [Internet]. 2014 Jul [cited 2020 Jul 23];179(7):799–805. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003868/>
 116. Chen Y, Zhang Y, Zhao G, Chen C, Yang P, Ye S, et al. Difference in Leukocyte Composition between Women before and after Menopausal Age, and Distinct Sexual Dimorphism. Kuivaniemi H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Sep 22 [cited 2020 Nov 2];11(9):e0162953. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162953>

117. Goldspink G, Harridge SDR. Growth factors and muscle ageing [Internet]. Vol. 39, Experimental Gerontology. Exp Gerontol; 2004 [cited 2020 Nov 2]. p. 1433–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501012/>
118. GS A, CM K, MA H, MW F. Age-related changes in the temporal and spatial distributions of fibrillin and elastin mRNAs and proteins in acute cutaneous wounds of healthy humans. J Pathol [Internet]. 1997 [cited 2020 Jul 23];183(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9370952/>
119. Ashcroft GS, Dodsworth J, Van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. Nat Med [Internet]. 1997 [cited 2020 Nov 2];3(11):1209–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9359694/>
120. Payne KA, Didiano DM, Chu CR. Donor sex and age influence the chondrogenic potential of human femoral bone marrow stem cells. Osteoarthr Cartil [Internet]. 2010 May [cited 2020 Jul 8];18(5):705–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20171308/>
121. Hirokawa K, Utsuyama M, Hayashi Y, Kitagawa M, Makinodan T, Fulop T. Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. Immun Ageing [Internet]. 2013 Dec [cited 2020 Nov 2];10(1):19. Available from: [/pmc/articles/PMC3663722/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24711112/)
122. Bain BJ. Ethnic and sex differences in the total and differential white cell count and platelet count. J Clin Pathol [Internet]. 1996 [cited 2020 Nov 2];49(8):664–6. Available from: [/pmc/articles/PMC500612/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501012/)
123. Lin Y, Kim J, Metter EJ, Nguyen H, Truong T, Lustig A, et al. Changes in blood lymphocyte numbers with age in vivo and their association with the levels of cyto-

14. Bibliografia

- kines/cytokine receptors. *Immun Ageing* [Internet]. 2016 Dec 18 [cited 2020 Nov 2];13(1):24. Available from: <http://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-016-0079-7>
124. Larsson S, Nordenson A, Glader P, Yoshihara S, Lindén A, Slinde F. A gender difference in circulating neutrophils in malnourished patients with COPD. *Int J COPD* [Internet]. 2011 [cited 2020 Nov 2];6(1):83–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21407820/>
125. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J Cell Biol* [Internet]. 2001 Aug 6 [cited 2020 Jul 2];154(3):485–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11489912/>
126. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004 Apr;34(4):665–71.
127. Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2003 Nov;85(4):283–9.
128. Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, et al. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Nov 2];21(5):683–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503185/>

129. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care* [Internet]. 2013 Sep [cited 2020 Nov 2];2(7):379–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24527354/>
130. Moojen DJF, Everts PAM, Schure RM, Overdevest EP, Van Zundert A, Knape JTA, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against staphylococcus aureus. *J Orthop Res* [Internet]. 2008 Mar [cited 2020 Nov 2];26(3):404–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17960651/>
131. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot [Internet]. Vol. 366, *Lancet. Lancet*; 2005 [cited 2020 Nov 2]. p. 1736–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16291068/>
132. BW E. Platelet-rich Plasma: Harvesting With a Single-Spin Centrifuge. *J Oral Implantol*. 2002;28(6).
133. JL R, JM T, CL B, JL S, NM R, DM S, et al. Analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. *J Oral Implantol*. 2008 Jan 1;34(1):25–33.
134. Peterson NS, Dean Reeves K. Human Subject Committee: International Cellular Medicine Society ICMS-2012-003. Vol. 6, *Journal of Prolotherapy*. 2014.
135. Nagata MJH, Messoria MR, Furlaneto FAC, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of Two Methods for Preparation of Autologous Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Rabbits. *Eur J Dent*. 2010 Oct;04(04):395–402.
136. WHO | Proposed working definition of an older person in Africa for the MDS Project. WHO. 2016;

14. Bibliografia

137. Eggleton P, Gargan R, Fisher D. Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J Immunol Methods* [Internet]. 1989 Jul 6 [cited 2021 Feb 12];121(1):105–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2474025/>
138. Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Matteo B, Merli ML, Marcacci M. Platelet-rich plasma: why intra-articular? A systematic review of preclinical studies and clinical evidence on PRP for joint degeneration [Internet]. Vol. 23, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. Springer Verlag; 2015 [cited 2020 Jul 7]. p. 2459–74. Available from: </pmc/articles/PMC4541701/?report=abstract>
139. Ramaswamy Reddy S, Reddy R, Babu Nc, Ashok G. Stem-cell therapy and platelet-rich plasma in regenerative medicines: A review on pros and cons of the technologies. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 2];22(3):367. Available from: </pmc/articles/PMC6306612/?report=abstract>
140. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. Springer New York LLC; 2011. p. 2706–15.
141. O'Shaughnessey K, Matuska A, Hoepfner J, Farr J, Klaassen M, Kaeding C, et al. Autologous protein solution prepared from the blood of osteoarthritic patients contains an enhanced profile of anti-inflammatory cytokines and anabolic growth factors. *J Orthop Res*. 2014;32(10):1349–55.
142. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries [Internet]. Vol. 2013, *Cochrane Database of*

- Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2013 [cited 2020 Nov 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24363098/>
143. Reurink G, Goudswaard GJ, Moen MH, Weir A, Verhaar JAN, Bierma-Zeinstra SMA, et al. Rationale, secondary outcome scores and 1-year follow-up of a randomised trial of platelet-rich plasma injections in acute hamstring muscle injury: The Dutch Hamstring Injection Therapy study. *Br J Sports Med* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2020 Nov 20];49(18):1206–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25940636/>
144. Sandrey MA. Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy [Internet]. Vol. 49, *Journal of Athletic Training*. National Athletic Trainers' Association Inc.; 2014 [cited 2020 Nov 2]. p. 428–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24840581/>
145. Chen X, Jones IA, Park C, Vangness CT. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing: A Systematic Review and Meta-analysis With Bias Assessment [Internet]. Vol. 46, *American Journal of Sports Medicine*. SAGE Publications Inc.; 2018 [cited 2020 Nov 2]. p. 2020–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29268037/>
146. Han Y, Huang H, Pan J, Lin J, Zeng L, Liang G, et al. Meta-analysis Comparing Platelet-Rich Plasma vs Hyaluronic Acid Injection in Patients with Knee Osteoarthritis. *Pain Med (United States)* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2020 Nov 2];20(7):1418–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30849177/>
147. Cieslik-Bielecka A, Gazdzik TS, Bielecki TM, Cieslik T. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? Vol. 103, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. Mosby; 2007. p. 303–5.

14. Bibliografia

148. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). Vol. 27, Trends in Biotechnology. Trends Biotechnol; 2009. p. 158–67.
149. Yuan T, Zhang C, Zeng B. Treatment of chronic femoral osteomyelitis with platelet-rich plasma (PRP): A case report. Transfus Apher Sci [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 Feb 10];38(2):167–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18343727/>
150. Bielecki T, M. Dohan Ehrenfest D, A. Everts P, Wiczowski A. The Role of Leucocytes from L-PRP/L-PRF in Wound Healing and Immune Defense: New Perspectives. Curr Pharm Biotechnol [Internet]. 2012 Jun 12 [cited 2021 Feb 10];13(7):1153–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21740376/>
151. Craig W. Pharmacodynamics of antimicrobial agents as a Basis for Determining Dosage Regimens [Internet]. Vol. 12, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Springer; 1993 [cited 2021 Feb 10]. p. S6–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02389870>
152. Leijh PCJ, Van Den Barselaar T, Daha MR, Van Furth R. Participation of immunoglobulins and complement components in the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. Infect Immun [Internet]. 1981 Sep 1 [cited 2021 Feb 10];33(3):714–24. Available from: <http://iai.asm.org/>
153. Rada B. Interactions between neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis [Internet]. Vol. 6, Pathogens. MDPI AG; 2017 [cited 2021 Feb 10]. Available from: </pmc/articles/PMC5371898/>

154. Mandell LA. Effects of antimicrobial and antineoplastic drugs on the phagocytic and microbicidal function of the polymorphonuclear leukocyte. [Internet]. Vol. 4, Reviews of infectious diseases. Rev Infect Dis; 1982 [cited 2021 Feb 12]. p. 683–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6750738/>
155. Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Giménez MJ, Laguna B, Echeverría O, et al. Effect of opsonophagocytosis mediated by specific antibodies on the co-amoxiclav serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after administration of a single oral dose of pharmacokinetically enhanced 2000/125 mg co-amoxiclav to healthy volunteers. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2005 May [cited 2021 Feb 12];55(5):742–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15761068/>
156. Berrón Pérez Renato, Penagos Paniagua Martín de Jesús, Zaragoza Benítez Juan Manuel, Rodríguez Álvarez Jacobo BGL. Vías clásica y de la lectina que se une a la manosa. Alerg e Inmunol Pediatr. 2003;12(2):46–52.
157. Casal J, Giménez MJ, Aguilar L, Yuste J, Jado I, Tarragó D, et al. β -Lactam activity against resistant pneumococcal strains is enhanced by the immune system [Internet]. Vol. 50, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. J Antimicrob Chemother; 2002 [cited 2021 Feb 12]. p. 83–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12556437/>
158. Zabidi MA, Yusoff NM KZ. Preliminary comparative analysis of antibacterial effects of activated and non-activated of expired platelet concentrate by disc diffusion method. Indian J Pathol Microbiol. 2012;55:47–51.
159. Dankert J, Van Der Werff J, Zaat SA, Joldersma W, Klein D HJ. Involvement of Bactericidal Factors from Thrombin-Stimulated Platelets in clearance of Adhe-

14. Bibliografia

- rent Viridans Streptococci in Experimental Infective Endocarditis. *Infect Immun*. 1994;63:663–71.
160. Tohidnezhad M, Varoga D, Wruck CJ, Podschun R, Sachweh BH, Bornemann J, et al. Platelets display potent antimicrobial activity and release human beta-defensin 2. *Platelets* [Internet]. 2012 May [cited 2021 Feb 12];23(3):217–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21913811/>
161. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Dec [cited 2021 Feb 12];70(12):6524–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438321/>
162. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion* [Internet]. 2013 Jan [cited 2021 Feb 12];53(1):138–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22563709/>
163. Feng M, Wang Y, Zhang P, Zhao Q, Yu S, Shen K, et al. Antibacterial effects of platelet-rich fibrin produced by horizontal centrifugation. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Feb 12];12(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-00099-w>
164. Shafer WM, Martin LE, Spitznagel JK. Late intraphagosomal hydrogen ion concentration favors the in vitro antimicrobial capacity of a 37-kilodalton cationic granule protein of human neutrophil granulocytes. *Infect Immun* [Internet]. 1986 [cited 2021 Feb 12];53(3):651–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3527987/>

165. Yeaman MR. The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/25/5/951/341498>
166. Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat*. 1999 Apr 1;2(2):116–26.
167. Seidel SRT, Vendruscolo CP, Moreira JJ, Fülber J, Ottaiano TF, Oliva ML V., et al. Does Double Centrifugation Lead to Premature Platelet Aggregation and Decreased TGF- β 1 Concentrations in Equine Platelet-Rich Plasma? *Vet Sci* [Internet]. 2019 Aug 21 [cited 2020 Jul 5];6(3):68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31438534/>
168. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*. 2001;41(10):1217–24.
169. Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease [Internet]. Vol. 371, *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2018 [cited 2020 Jul 5]. p. 551–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29387942/>
170. Gilliver SC, Ashcroft GS. Sex steroids and cutaneous wound healing: The contrasting influences of estrogens and androgens [Internet]. Vol. 10, *Climacteric*. *Climacteric*; 2007 [cited 2020 Jul 23]. p. 276–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17653954/>
171. Molloy EJ, O'Neill AJ, Grantham JJ, Sheridan-Pereira M, Fitzpatrick JM, Webb DW, et al. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: The role of estradiol and progesterone. *Blood* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2020 Nov 2];102(7):2653–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12791649/>

14. Bibliografia

172. Gubbels Bupp MR. Sex, the aging immune system, and chronic disease [Internet]. Vol. 294, Cellular Immunology. Academic Press Inc.; 2015 [cited 2020 Nov 2]. p. 102–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25700766/>
173. Mouton JW. Impact of pharmacodynamics on breakpoint selection for susceptibility testing [Internet]. Vol. 17, Infectious Disease Clinics of North America. W.B. Saunders; 2003 [cited 2021 Feb 12]. p. 579–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14711078/>
174. Cieřlik-Bielecka A, Reichert P, Skowroński R, Królikowska A, Bielecki T. A new aspect of in vitro antimicrobial leukocyte- and platelet-rich plasma activity based on flow cytometry assessment. Platelets [Internet]. 2019 Aug 18 [cited 2021 Feb 12];30(6):728–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30252585/>
175. Labro, M.T., Babin-Chevaye, C., Hakim J. Effects of cefotaxime and ceftazidime on human granulocyte functions in vitro. J Antimicrob Chemother. 1986;18:233–7.

