

# Plasma rico en plaquetas (PRP) como sistema de entrega local de antibióticos en infecciones óseas: estudio in vitro

Dr. Julián Camargo\*, Dra. Natasha Vanegas\*\*, Dr. Juan David Vélez\*, Dr. Juan Carlos López\*, Dr. Juan Manuel Herrera\*

\* Posgrado de Ortopedia y Traumatología, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

\*\* Instituto de Genética Molecular Bacteriana, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Correspondencia:

Dr. Juan Manuel Herrera

Calle 134 No. 7B-83 Of. 1014, Edificio El Bosque, Bogotá, Colombia.

Tel. (571) 5200086

juanmherrera@cable.net.co

Fecha de recepción: 9 de julio de 2009

Fecha de aprobación: 10 de febrero de 2010

## Resumen

**Introducción:** el polimetilmetacrilato (PMMA) es el único sistema de entrega local de antibióticos aprobado por la FDA. Actualmente, este tipo de sistemas ha mejorado los resultados en el tratamiento de las infecciones asociadas con implantes ortopédicos con una seguridad biológica amplia, dada la disminución de toxicidad antibiótica sistémica. Se plantea la búsqueda de un sistema alternativo de entrega local de antibióticos debido a que en algunos casos el PMMA actúa como un cuerpo extraño, y en otros libera el antibiótico en rangos subterapéuticos actuando incluso como una superficie amigable para la formación de un *biofilm* por parte de las bacterias.

**Materiales y métodos:** se diseñó un estudio in vitro, estandarizado, controlado, con el método de difusión agar, según los parámetros establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en el 2007 para determinar si el gel rico en plaquetas (PRP) suplementado con antibiótico sirve como sistema de transporte y liberación local de antibiótico inhibiendo el crecimiento de una cepa conocida de *S. aureus*.

**Resultados:** los antibióticos evaluados fueron transportados y liberados por el gel rico en plaquetas. Se produjo inhibición del crecimiento bacteriano a mayores concentraciones de antibióticos. La oxacilina en la dilución 32 µg/ml tuvo un halo de inhibición mayor al sensidisco; la vancomicina generó los halos de inhibición de menor diámetro, y la ciprofloxacina presentó la menor capacidad de inhibición con respecto al control.

**Discusión:** se demostró in vitro la capacidad que tiene el PRP como transportador y liberador de antibiótico. Dado el comportamiento heterogéneo recogido en los diferentes ensayos, se supone que cada antibiótico tiene una capacidad de difusión propia, la cual debe ser tenida en cuenta si se quiere emplear el gel de PRP como sistema de entrega local de antibióticos.

**Palabras clave:** plasma rico en plaquetas, agentes antibacterianos, in vitro.

[Rev Col Or Tra 2012; 26(1): 39-49]

## Abstract

**Introduction:** Currently polymethylmethacrylate is the most commonly used vehicle for antibiotic local delivery, approved by FDA. Current data have demonstrated that the use of this system has improved the outcome on patients beneath treatment of infection associated or caused by orthopedic implants, mainly because of its ability to achieve very high local concentrations of antibiotic without associated systemic toxicity. Nevertheless, it is also a concern that sometimes PMMA may act as a foreign body within our body, once it has completed its antibiotic release, and specially, once the antibiotic release rate has dropped below therapeutic levels. Perhaps, sometimes PMMA could even act as a friendly surface for bacterial biofilm.

**Methods:** A standardized controlled in-vitro study was designed following the agar diffusion method, according to parameters set by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) in 2007, in order to determine if the platelet rich plasma (PRP) loaded with antibiotic could work as a carrier and as an antibiotic local delivery system, by inhibiting a known *S. aureus* subtype growth.

**Results:** All antibiotics tested were transported and released by the PRP. We find out a direct relationship between bacterial inhibition halos and antibiotic concentration dilutions. As higher the concentration as bigger the halo. Oxacilin at 1:32 dilution had a bacterial inhibition halo even greater than the sensidisc. The bacterial inhibition halos produced by the Vancomycin were the smaller ones. Ciprofloxacin shown the lowest bacterial inhibition capacity compared to control.

**Discussion:** PRP has the ability to perform as an antibiotic carrier as well as a local antibiotic delivery system in-vitro. Due to the heterogeneous behavior shown in these different antibiotic trials, it is assumed that each antibiotic has its own diffusion capacity which must be taken in consideration any time the PRP wants to be used as a local antibiotic delivery system.

**Key words:** platelet-rich plasma, antibacterial agents, in vitro.

[*Rev Col Or Tra* 2012; 26(1): 39-49]

## Introducción

Múltiples bacterias son causantes de infecciones musculoesqueléticas. El agente patógeno depende de la edad del paciente, la vía de inoculación, las circunstancias en las cuales se produjo la infección y la respuesta inmune individualizada de cada paciente. Los microorganismos que predominan en las infecciones de prótesis e implantes, además de osteomielitis y artritis séptica, son el *Staphylococcus aureus* y el *Staphylococcus coagulasa negativo* (1, 2). Muchas de las bacterias implicadas en la osteomielitis crónica, particularmente el *S. epidermidis* y algunas cepas de *S. aureus*, producen un glucocálix que limita la actividad de los antibióticos; este glucocálix hace que la bacteria se adhiera a cuerpos extraños como el polimetilmetacrilato (PMMA) y los implantes metálicos generando una de las principales causas de resistencia antibiótica y recurrencia de la infección en un proceso que ha sido denominado “competencia por la superficie”.

La recomendación terapéutica actual para la mayoría de las infecciones osteoarticulares consiste en un desbridamiento quirúrgico de todo el tejido necrótico, asociado a una terapia agresiva con antibióticos intravenosos por un mínimo de 4-6 semanas. El obtener una adecuada respuesta de la infección es un gran desafío debido a que las concentraciones altas de antibióticos en suero llevan a un riesgo de toxicidad sistémica generada por dosis altas y múltiples, además de la

pobre adherencia al tratamiento por parte de los pacientes a causa de los efectos secundarios del antibiótico.

Para evitar los problemas relacionados con accesibilidad, adherencia al tratamiento y toxicidad que producen los antibióticos sistémicos, se ha planteado el uso de sistemas de entrega local de antibiótico. En el típico microambiente de una infección osteoarticular, que se caracteriza por una zona de tejido avascular rodeada por un ambiente con pH ácido e hipoxémico, el sitio de la infección se constituye en un área inaccesible, tanto para la respuesta inmune del huésped a la infección, como para el mismo antibiótico. Los sistemas de entrega local de antibióticos tienen la capacidad y/o habilidad para alcanzar concentraciones extremadamente altas de antibióticos a nivel tisular localizado, sobre todo cuando se comparan con el método tradicional de terapia con antibiótico sistémico, sin presentar el riesgo inherente de toxicidad sistémica asociada. La seguridad de los sistemas de entrega local de antibióticos se ha comprobado en algunos estudios, incluso realizados en pacientes con alteración de la función renal (3).

Los diferentes sistemas de entrega local de antibiótico tienen como principio básico la entrega local del antibiótico

en concentraciones altas y la minimización de sus efectos secundarios y toxicidad sistémica. La idea de utilizar cemento de PMMA como una forma de antibioticoterapia local fue introducida en la literatura por Buchholz y cols. en 1970, con la incorporación de un antibiótico con el cemento óseo o PMMA (4). En 1981, la primera publicación acerca de su trabajo reporta una tasa de éxito del 77 % (5) tratando las artroplastias infectadas con lavado, desbridamiento, retiro del material y cemento óseo precargado con antibiótico. Se desarrollaron perlas de PMMA impregnadas en gentamicina, las cuales se encuentran disponibles comercialmente desde 1977. Este sistema de antibioticoterapia local utiliza una mezcla prefabricada de PMMA cargado con antibiótico, el cual se utiliza como espaciador en artroplastias o como cadenas de perlas impregnadas de antibiótico en infecciones musculoesqueléticas. El éxito de este sistema se atribuye a que el PMMA no genera respuesta inmune en el huésped y a que la forma de perlas le confiere una amplia área de superficie de liberación del antibiótico, además de facilitar su rápida liberación. La selección del antibiótico que puede ser aplicado en estas preparaciones depende de su estabilidad ante temperaturas elevadas (más de 100 °C) necesarias para la polimerización del PMMA. Los aminoglucósidos, por ser estables a dichas temperaturas, son ampliamente utilizados en estas preparaciones. Estudios *in vitro* han demostrado que los aminoglucósidos y las quinolonas se liberan a mayores concentraciones que otros antibióticos, alcanzando su pico de liberación durante el primer día. A medida que el cemento pierde su viscosidad, se incrementa la liberación del antibiótico. *In vivo*, el suero, los fluidos inflamatorios y el antibiótico forman alrededor del cemento un xeroma en el cual se encuentran altas concentraciones de antibiótico; el pico de concentración se alcanza durante el primer día y el antibiótico continúa liberándose durante 28 días más a concentraciones terapéuticas. La gentamicina se encuentra en altas concentraciones 2 o 3 centímetros alrededor del implante, mientras que en la circulación sistémica su concentración es muy baja o casi indetectable, razón por la cual el sistema local disminuye la toxicidad sistémica de este antibiótico (4). El PMMA mezclado con antibióticos se usa en el tratamiento de artroplastias infectadas y como profilaxis en procedimientos de revisión protésica posinfección. En el caso de infecciones en prótesis de cadera con pérdida amplia de la parte proximal del fémur se utilizan prótesis de cemento cargado con antibiótico (4), con las cuales se preserva la movilidad y se facilita la inserción de una nueva prótesis en un segundo tiempo quirúrgico, se mantiene la

longitud de la extremidad, se disminuye la contractura de los tejidos blandos y, además, se provee un medio de transporte para el antibiótico a nivel local (6).

Los materiales alternativos para los sistemas de entrega local de antibióticos, que actualmente están en investigación de laboratorio y en ensayos clínicos, se pueden dividir en 3 grupos: 1) los compuestos a base de proteínas, 2) los sustitutos óseos y 3) los polímeros sintéticos, que bien pueden ser biodegradables o con capacidad de ser incorporados dentro de un proceso de regeneración ósea.

Sin embargo, actualmente no hay ninguno disponible y debidamente certificado por la FDA debido a la falta de unificación acerca de sus criterios de rendimiento o tasas de liberación del antibiótico. Además, hay una serie de interrogantes acerca de su uso, entre los cuales se plantean: ¿qué tanta concentración de liberación se alcanza con dichos sistemas?, ¿por cuánto tiempo se mantienen las dosis terapéuticas? y ¿cuáles son las complicaciones locales con respecto al proceso de reparación ósea?

Actualmente no hay un consenso en cuanto a la duración de la liberación del antibiótico y la posibilidad de eliminar el crecimiento bacteriano, no porque no se haya comprobado su efectividad, sino porque la variabilidad en la medición de las concentraciones locales alcanzadas por los antibióticos difieren entre estudios, y por lo tanto sus resultados también.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se obtiene a partir de la sangre del propio paciente, por lo tanto es autólogo. En la práctica clínica, el PRP se utiliza para concentrar factores de crecimiento plaquetarios, hasta un 388 % por encima de los valores encontrados en el plasma normal, para ser posteriormente aplicado en los tejidos, buscando potenciar la cascada biológica de la osteoinducción. La “forma farmacéutica” en que se utiliza clínicamente el PRP se obtiene mediante su gelificación al adicionarle trombina y cloruro de calcio. El gel de PRP es un compuesto de fibrinógeno y plaquetas activadas (por la adición de la trombina), lo cual determina la liberación de una cascada de factores de crecimiento de los gránulos de las plaquetas dentro de una malla de fibrina.

En presencia de procesos infecciosos, la estabilidad de la malla de fibrina se compromete rápidamente por la producción de enzimas líticas por parte del germen causante de la infección. Por lo tanto, la lisis progresiva de la malla de

fibrina libera las plaquetas contenidas en ella, perdiéndose así la capacidad osteoinductora deseada con la gelificación del PRP. Sin embargo, dicha lisis de fibrina podría producir una liberación antibiótica a demanda por parte del germen de acuerdo con su tasa de replicación.

El propósito del presente estudio es determinar si el gel de plasma rico en plaquetas (PRP) cargado con antibióticos sirve como sistema de transporte y liberación local de los antibióticos inhibiendo el crecimiento in vitro de una cepa conocida de *Staphylococcus aureus*.

## Materiales y métodos

Para determinar si el gel de PRP suplementado con un antibiótico (oxacilina, ciprofloxacina, gentamicina o vancomicina) sirve como sistema de transporte y liberación local de antibióticos, inhibiendo el crecimiento in vitro de una cepa conocida de *Staphylococcus aureus*, se diseñó un estudio in vitro, estandarizado, controlado, con el método de difusión en agar, siguiendo los parámetros establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007 (7).

### Estandarización del método de obtención del plasma rico en plaquetas

Se tomaron 30 ml de sangre total de un donante voluntario para cada una de las pruebas, los cuales se recolectaron en tubos de ensayo con citrato para prevenir su coagulación; inmediatamente después, la sangre total se centrifugó a distintas revoluciones y tiempos y a cada una de las muestras se le hizo recuento de plaquetas por método automatizado ADIVA-60 (Bayer®).

### Estandarización del volumen de PRP y de la activación del plasma rico en plaquetas

Para lograr obtener un gel de PRP que se pudiera manipular y sembrar en los medios de cultivo se realizó una prueba con 6 muestras de 500 µl de PRP; a cada una se le agregó un volumen distinto de CaCl<sub>2</sub> al 10 % (1 µl, 2 µl, 3 µl, 5 µl, 7 µl, 15 µl) y se estableció el tiempo y las características del coágulo que se formaba.

## Diluciones de los antibióticos

Para determinar el volumen de antibiótico necesario para lograr las diferentes concentraciones se tuvo en cuenta el volumen de cada muestra de PRP más el volumen del activador (520 µl) y 10 diluciones seriadas en base dos (de la dilución de 32 µg/ml hasta la dilución de 0,06 µg/ml) preparadas a partir de una solución *stock* de 10 000 µg/ml.

### Mezcla del PRP con el activador y el antibiótico para la obtención del gel

En una placa de 24 pozos se mezclaron 492 µl de PRP con 15 µl de activador y 13 µl de cada una de las diluciones del antibiótico. Como control negativo se tomaron 492 µl de PRP con 15 µl de activador sin antibiótico. Con cada antibiótico la prueba se realizó por triplicado, obteniendo 80 muestras y 24 controles negativos (figura 1). Las muestras se dejaron en incubación a temperatura ambiente por 25 minutos formando coágulos que posteriormente se sembraron en los medios de cultivo.

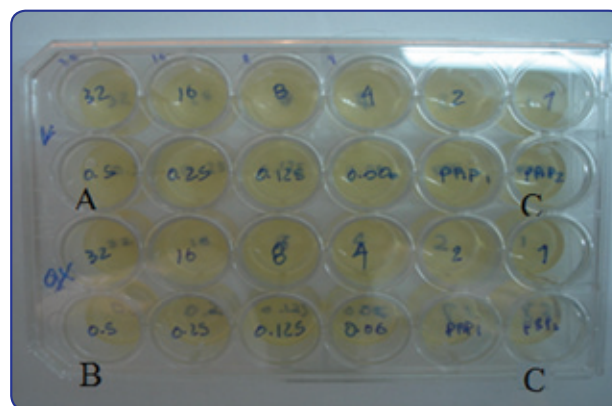


Figura 1. Mezcla de las muestras en una placa de 24 pozos. Se observa el PRP activado y mezclado con vancomicina (A), el PRP activado y mezclado con oxacilina (B) y el PRP sin antibiótico (control negativo) (C).

### Siembra de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en medio de cultivo Mueller-Hinton

Se tomó una muestra de cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y se diluyó en solución salina al 0,9 % mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 625 nm, y se obtuvo absorbancia equivalente al estándar 0,5 en la escala de Mcfarland. Se impregnó un escobillón de algodón estéril con la suspensión, contra la pared interna del tubo se eliminó el exceso de líquido, se sembró uniformemente sobre los cuatro cuadrantes de la superficie del medio de cultivo y sobre el perímetro de la caja (7).

### Siembra de las muestras y los sensidiscos en los medios de cultivo

Con puntas plásticas se tomaron los coágulos de cada uno de los pozos y se sembraron en el medio de cultivo distribuyéndolos en forma progresiva según la dilución del antibiótico que contenían y a una distancia que evitara la interferencia de cada uno de los halos de inhibición produ-

cidos. Se moldeó el coágulo para darle una forma esférica que generara halos de inhibición de forma circular que se pudieran medir, puesto que en algunas pruebas preliminares al sembrar coágulos de forma irregular los halos de inhibición no eran circulares y no se podían medir. En cada caja se sembró un sensidisco del antibiótico estudiado como control positivo y una muestra de PRP con activador sin antibiótico como control negativo (figura 2). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas para realizar la medición de los halos de inhibición.

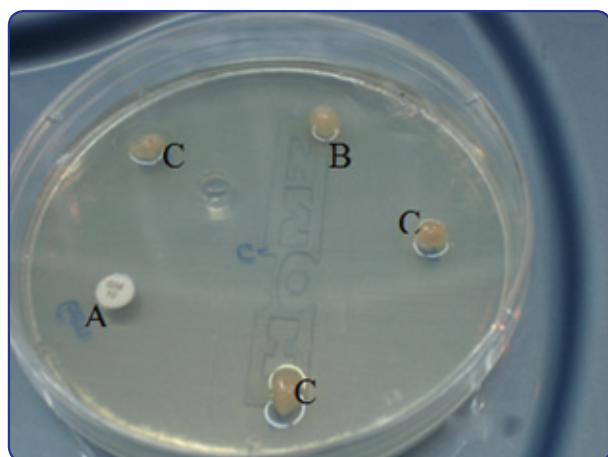


Figura 2. Siembra de las muestras. Se observa el sensidisco de gentamicina como control positivo (A), el PRP sin antibiótico como control negativo (B) y el PRP con diluciones distintas de antibiótico (C).

### Recolección de datos

Se midieron los halos de inhibición formados por cada muestra y se consignaron en el instrumento de recolección (tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de plaquetas obtenidas con diferentes tiempos y velocidades de centrifugación.

Muestra	Tiempo de centrifugado (minutos)	Velocidad (rpm)	Concentración de plaquetas (#/mm <sup>3</sup> )
1	5	3000	700 000
2	10	3000	650 000
3	10	1000	525 000

## Resultados

### Estandarización de la obtención de PRP

La mayor concentración de plaquetas se logró con una centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos obteniendo un recuento de plaquetas de 700 000 por mm<sup>3</sup> (tabla 1).

### Estandarización del volumen y de la activación del PRP

El volumen de PRP con el que se pudo obtener un coágulo de tamaño adecuado fue de 500 µl. Con 15 µl de activador se logró una consistencia adecuada del coágulo. El tiempo para obtener el coágulo fue de 25-30 minutos.

### Inhibición del crecimiento bacteriano obtenido con PRP y vancomicina

Se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano utilizando concentraciones de vancomicina de 8 µg/ml, 16 µg/ml y 32 µg/ml. El promedio de los halos de cada concentración fue de 8,1 mm, 9,3 mm y 11,6 mm, respectivamente. Con la concentración más alta la inhibición fue de 73 % con respecto al control positivo. Los 6 controles negativos no generaron inhibición del crecimiento bacteriano (tabla 2) (figuras 3 y 4).

Tabla 2. Resultados obtenidos con vancomicina.

Dilución (µg/ml)	Inhibición (mm)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
32	11	13	11	11,6
16	9	10	9	9,3
8	8	8	8	8,1
4	0	0	0	0
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
D1*	16	16	16	16
D2*	16	16	16	16
PRP1†	0	0	0	0
PRP2†	0	0	0	0

\*D1 y D2 son sensidiscos de 30 µg de vancomicina (OXOID®); se considera sensible un halo mayor de 15 mm.

† PRP1 y PRP2 son discos de plasma rico en plaquetas sin antibiótico (control negativo).

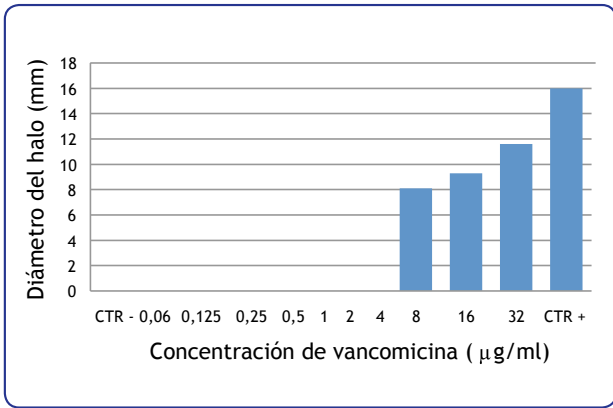


Figura 3. Diámetros del halo de inhibición para diferentes concentraciones de vancomicina.

Nota: CTR-: control negativo (PRP sin antibiótico); CTR+: control positivo (sensidisco)

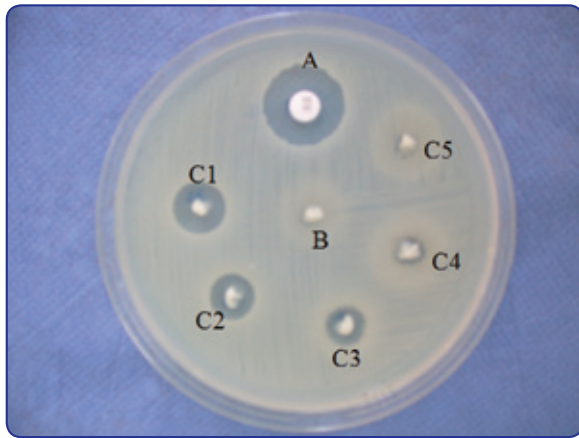


Figura 4. Halos de inhibición producidos por vancomicina. Se observa el sensidisco de vancomicina (control positivo) (A), el PRP sin antibiótico (control negativo) (B) y el PRP con diferentes concentraciones de antibiótico (C1, C2, C3, C4 y C5, para las diluciones 32, 16, 8, 4 y 2, respectivamente).

### Inhibición del crecimiento bacteriano obtenido con PRP y oxacilina

Con oxacilina se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano a partir de la dilución de 2 µg/ml. El promedio del diámetro del halo de inhibición obtenido con la dilución más alta (32 µg/ml) fue superior al halo de inhibición del sensidisco (20,3 mm contra 20 mm) (102 %). Los 6 controles de PRP no produjeron inhibición del crecimiento bacteriano (tabla 3) (figura 5).

Tabla 3. Resultados obtenidos con oxacilina.

Dilución (µg/ml)	Inhibición (mm)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
32	16	22	23	20,3
16	15	20	16	17
8	18	18	16	17,3
4	11	13	10	11,3
2	9	7	7	7,6
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
D1*	20	20	20	20
D2*	20	20	20	20
PRP1†	0	0	0	0
PRP2†	0	0	0	0

\* D1 y D2 son sensidiscos de 1 µg de oxacilina (OXOID®); se considera sensible un halo mayor de 13 mm.

† PRP1 y PRP2 son discos de plasma rico en plaquetas sin antibiótico (control negativo).

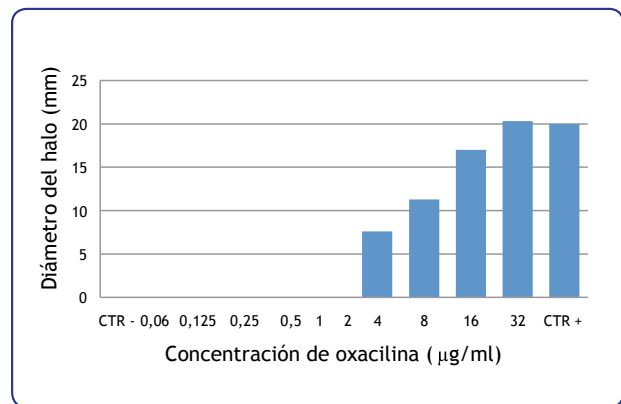


Figura 5. Diámetros del halo de inhibición para diferentes concentraciones de oxacilina.

Nota: CTR-: control negativo (PRP sin antibiótico); CTR+: control positivo (sensidisco)

### Inhibición del crecimiento bacteriano obtenido con PRP y gentamicina

Al evaluar el PRP con gentamicina se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano desde la dilución de 2 µg/ml; diluciones menores no produjeron inhibición. La inhibición producida por la concentración más alta fue de 16,6 mm; se alcanzó el 83 % del diámetro de inhibición del sensidisco empleado (20 mm). Los controles de PRP no generaron inhibición del crecimiento bacteriano (tabla 4) (figura 6).

Tabla 4. Resultados obtenidos con gentamicina.

Dilución (µg/ml)	Inhibición (mm)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
32	19	15	16	16,6
16	18	14	12	14,6
8	16	10	9	11,6
4	15	9	9	11
2	11	7	7	8,3
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
D1*	20	20	20	20
D2*	20	20	20	20
PRP1†	0	0	0	0
PRP2†	0	0	0	0

\*D1 y D2 son sensidiscos de 10 µg de gentamicina (OXOID®); se considera sensible un halo mayor de 12 mm.

† PRP1 y PRP2 son discos de plasma rico en plaquetas sin antibiótico (control negativo).

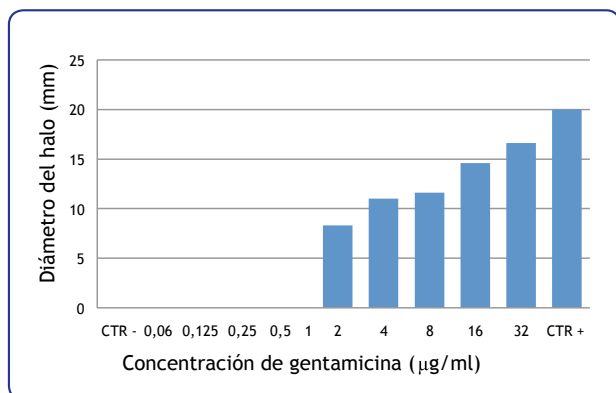


Figura 6. Diámetros del halo de inhibición para diferentes concentraciones de gentamicina.

Nota: CTR-: control negativo (PRP sin antibiótico); CTR+: control positivo (sensidisco)

### Inhibición del crecimiento bacteriano obtenido con PRP y ciprofloxacina

Con ciprofloxacina se produjo inhibición con las concentraciones de 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml y 32 µg/ml; el promedio de la medida del halo formado por la dilución de 32 µg/ml fue de 18,6 mm, correspondiente al 69 % del halo generado por el sensidisco, el cual fue de 27 mm. Ninguno de los controles negativos produjo inhibición (tabla 5) (figura 7).

Tabla 5. Resultados obtenidos con ciprofloxacina.

Dilución (µg/ml)	Inhibición (mm)			
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
32	14	20	22	18,6
16	18	19	19	18,6
8	18	16	19	17,6
4	10	11	15	12
2	0	0	0	0
1	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0
D1*	25	27	27	26,3
D2*	26	28	27	27
PRP1†	0	0	0	0
PRP2†	0	0	0	0

\*D1 y D2 son sensidiscos de 5 µg de ciprofloxacina (OXOID®); se considera sensible un halo mayor de 21 mm.

† PRP1 y PRP2 son discos de plasma rico en plaquetas sin antibiótico (control negativo).

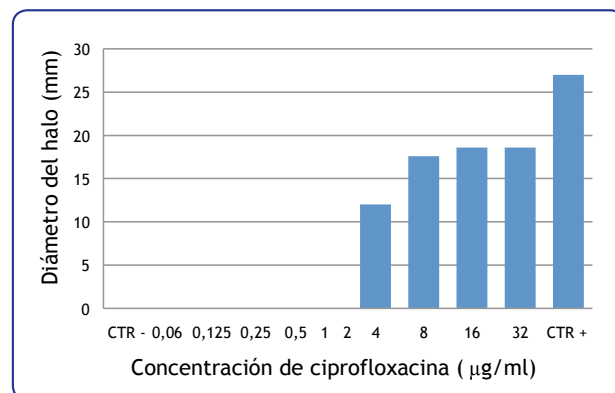


Figura 7. Diámetros del halo de inhibición para diferentes concentraciones de ciprofloxacina.

Nota: CTR-: control negativo (PRP sin antibiótico); CTR+: control positivo (sensidisco)

## Discusión

Aunque el sistema ideal de entrega local de antibióticos ha sido perseguido durante los últimos 50 años, aún no se ha desarrollado alguno que cumpla con las características teóricas requeridas. El sistema ideal de entrega local de antibióticos debería ser de fácil inserción, fácil recambio o retiro, bien tolerado por el paciente, económico y, finalmente, debería ser capaz de mantener una concentración de antibiótico constante para evitar el riesgo de resistencia antibiótica con el paso del tiempo.

Ante la ausencia de un sistema ideal de entrega local de antibióticos, actualmente se utilizan cementos óseos precargados con antibiótico, en los cuales el antibiótico no necesariamente se asocia a la sensibilidad del germen aislado en los cultivos ni a los antibiogramas que se obtienen a partir de las muestras tomadas en cirugía. Actualmente los sistemas de cemento óseo precargado aprobados por la FDA son solo 5 y utilizan solo 2 moléculas de antibióticos, las cuales son aminoglucósidos (tobramicina y gentamicina) y vancomicina, por lo cual el espectro terapéutico es bastante limitado. Adicionalmente, se ha descrito en varios estudios que el PMMA se convierte en un cuerpo extraño con el paso del tiempo, liberando antibióticos de forma subterapéutica (8). Por su parte, Neut y cols. han descrito que con el paso del tiempo el PMMA se convierte además en una superficie amigable para la formación de un *biofilm* por parte de las bacterias (9), aumentando así el riesgo de una nueva infección y facilitando de esta forma la aparición de una resistencia bacteriana al antibiótico.

El uso de sistemas de entrega local de antibiótico ha sido ampliamente aceptado y continúa evolucionando debido a que se consiguen grandes concentraciones locales de antibióticos y se evita el riesgo de toxicidad sistémica a esas concentraciones. Actualmente no hay ningún material biodegradable aprobado por la FDA como sistema de entrega local de antibiótico para el uso en infecciones en dispositivos ortopédicos. Sin embargo, hay una serie de materiales que se encuentran en estudio entre los que se describen injertos óseos, sustitutos óseos, compuestos a base de proteínas y polímeros sintéticos.

Entre los materiales a base de proteínas se encuentran las esponjas de colágeno-gentamicina que se encuentran disponibles comercialmente y su uso es tan popular en algunos sitios como el PMMA en el tratamiento de infecciones óseas crónicas, ya que en este grupo son las que han sido más ampliamente estudiadas (10). Se producen a partir de tendón bovino esterilizado en el cual se introduce gentamicina. La

esterilización del tendón se realiza con óxido de etileno o con radiación gamma; las esterilizadas con óxido de etileno alcanzan mayor concentración local de antibiótico que las esterilizadas con radiación gamma, pero en estas últimas, la degradación de la esponja es mayor. La gentamicina es liberada a mayores concentraciones que las alcanzadas con el PMMA. El antibiótico se difunde desde la esponja a partir de su implantación pero principalmente desde la degradación del colágeno causada por las colagenasas producidas por los macrófagos. La degradación se completa en 8 semanas, pero estudios *in vitro* demuestran que la liberación del antibiótico puede completarse en solo 48 horas (11), motivo por el cual todavía no se puede recomendar como un sistema de entrega local de antibiótico para el tratamiento de infecciones ortopédicas.

El grupo de los polímeros sintéticos es un promisorio sistema de transporte de antibióticos en la práctica clínica. Sus principales ventajas son que es biodegradable y que los antibióticos que libera tienen una farmacocinética adecuada. Tiene dos formas de presentación: perlas compuestas de ácido poliláctico/poliglicólico y diláctico polimerizado de varios pesos moleculares. Los copolímeros de poliláctico y poliglicólico se producen con relaciones entre los dos compuestos que van de 90:10 a 50:50, respectivamente. Su degradación se produce por su descomposición al pH de los fluidos corporales. Los polímeros con relación 90:10 tienen mejor estabilidad, descomposición tardía y producen más altos niveles de concentración de clindamicina, vancomicina y tobramicina que los polímeros con otras relaciones entre sus componentes. En osteomielitis experimental en perros, los polímeros 50:50 con gentamicina muestran resultados similares a las perlas de PMMA-gentamicina y mejores resultados que los logrados con gentamicina endovenosa.

Los polímeros de ácido láctico de diferentes pesos moleculares han mostrado ventajas en cuanto al transporte y liberación de quinolonas sobre otros sistemas de transporte. Las quinolonas se consideran antibióticos de elección en la osteomielitis crónica debido a su buena penetración en tejidos con pobre vascularización y su efecto bactericida sobre todos los probables agentes patógenos causantes de osteomielitis crónica. Estudios *in vitro* han demostrado que con polímeros de bajo, medio y alto peso molecular (2 kD, 26 kD y 100 kD), a los cuales se les incorpora ciprofloxacina, pefloxacina y fleroxacina a concentraciones del 10 %, se obtiene liberación sostenida de dichos antibióticos por periodos más prolongados y a más altas concentraciones que utilizando todos los otros tipos de transportadores. Las quinolonas son liberadas a concentraciones que exceden 100



a 1000 veces la concentración inhibitoria mínima para los principales agentes patógenos implicados en la osteomielitis crónica; el pico de liberación se presenta en el primer día en los polímeros de bajo y mediano peso molecular (20 kD y 50 kD, respectivamente). En los polímeros de 100 kD se observa liberación sostenida de ciprofloxacina que alcanza los 350 días (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Sin embargo, una de las limitaciones ha sido el costo de fabricación de este tipo de sistemas, para poder ser reproducidos en el mercado. Actualmente no hay ninguno disponible en el mercado, y no existen para polímeros sintéticos que puedan ser mezclados con antibiótico en una sala de cirugía.

El último grupo, en el cual están los injertos óseos y los sustitutos óseos, ha sido estudiado porque estos son compatibles o promueven la regeneración ósea. En este grupo se encuentran: el sulfato cálcico, el trifosfato de calcio, los injertos de hueso esponjoso, los bloques de hidroxiapatita, entre otros; todos estos han sido utilizados en estudios clínicos, sin embargo, tampoco están aprobados por la FDA como sistema de entrega local de antibiótico porque sus resultados han sido igualmente variables.

Los bloques de apatita-wollastonita existen en dos formas: una con porosidad del 20 % al 30 %, otra con porosidad del 70 %. Se aplicaron en un estudio piloto en 5 pacientes con artroplastias infectadas, y se observaron excelentes resultados dos años después de iniciado el tratamiento; el material implantado indujo osteogénesis y radiológicamente se observó la reparación del defecto óseo. Resultados similares se obtuvieron con bloques de hidroxiapatita con arbekacin, en cuanto a reparación del defecto y erradicación de la infección causada por *Staphylococcus aureus* en osteomielitis crónica.

Solo existen datos in vitro para poliuretanos biomédicos como transportadores de flucloxacilina, fosfomicina, ciprofloxacina y gentamicina, que producen una liberación de antibióticos por periodos muy cortos de tiempo, eso sí, a concentraciones análogas a la cantidad de antibiótico incorporado en la mezcla en prueba.

Otro método que presenta resultados favorables es el uso de autoinjertos de hueso esponjoso mezclado con antibióticos; el objetivo es manejar la osteomielitis crónica con una sola intervención quirúrgica. Chan y cols. reportaron resultados de 36 fracturas infectadas luego de accidentes de tránsito, en las cuales luego de realizar desbridamiento quirúrgico se aplicó injerto de cresta iliaca en el sitio del defecto óseo mezclado con piperacilina y/o vancomicina, dependiendo de la susceptibilidad del microorganismo aislado. Las fractu-

ras se consolidaron en 4 meses y la única complicación fue erupción cutánea (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

El concepto de una sustancia que podía inducir una nueva formación de hueso fue reconocido por Urist en 1965 (14), quien llamó a este fenómeno el principio de inducción ósea. Posteriormente, identificó la proteína capaz de tales efectos que fue llamada proteína ósea morfogenética (POM o BMP); este hallazgo abrió el camino para una serie de investigaciones que arrojaron como resultado un mejor entendimiento del proceso de la reparación ósea y de los múltiples factores que intervienen en él (14).

Varios experimentos se han conducido para obtener esos factores de crecimiento de diversos tejidos animales. Una vez logrado esto se intentó aislarlos de una forma autóloga, eliminando así el riesgo de reacciones adversas. El paso siguiente fue purificar los factores de crecimiento con el fin de llevarlos en concentraciones elevadas al sitio de lesión para promover la reparación del tejido de una forma más eficiente y rápida.

Una de las alternativas encontradas es el gel de plasma rico en plaquetas (PRP) desarrollado a inicios de la década de los 90 como un producto paralelo de la plasmaféresis por Gible y Ness, quienes describieron inicialmente el pegante de fibrina (sellante de fibrina o gel de fibrina). Dicho pegante fue propuesto como un adhesivo biológico autólogo impermeable al agua que aseguraba una buena hemostasia local, fijaba tejidos y sellaba grandes espacios muertos, previniendo que se presentaran filtraciones cutáneas y disminuyendo la posibilidad de infección de la herida al actuar como barrera sellante (15, 16). Posteriormente se combinó un plasma concentrado de plaquetas con fibrina y calcio, capaz de formar rápidamente un gel viscoso rico en plaquetas al que se denominó gel de plasma rico en plaquetas (15).

Al alcanzarse una comprensión mayor de las propiedades regenerativas de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas, que actúan de manera sinérgica para acelerar la tasa y velocidad de curación de los tejidos, se presentaron varios reportes iniciales de carácter anecdótico acerca de su uso en varias aplicaciones curativas (15).

Como otros adhesivos derivados de la fibrina, el gel rico en plaquetas se utilizó extensivamente en tejidos blandos (rasgaduras de duramadre, quemaduras, injertos cutáneos, cirugía de *bypass* coronario, fistulas bronquiales, anastomosis esofágicas, tratamiento de úlceras de decúbito, úlceras del pie diabético, etc.). Sin embargo, sus mayores estudios y aplica-

ciones se han hecho en el campo de los implantes dentales y cirugía maxilofacial, cuya primera referencia data de 1982, publicada por Matras, en la que el gel rico en plaquetas se usó en aplicaciones junto con tejido óseo, ya que además de servir como transporte de factores de crecimiento, es un medio que permite mantener los injertos óseos en una determinada forma, facilitando la implantación de prótesis dentales y cirugías de reconstrucción maxilar y mandibular. El mismo autor en 1998 reportó resultados satisfactorios con el uso de PRP en injertos óseos “demostrando gran densidad ósea y calidad de los injertos” (17).

En cirugía ortopédica sus aplicaciones han sido varias, incluyendo las artroplastias totales de cadera y rodilla, fusiones espinales, correcciones de escoliosis, laminectomías, fracturas, no uniones y defectos óseos. Se cree que los factores de crecimiento inician la cascada de osteogénesis en el sitio de la intervención, y favorecen una mayor velocidad de mineralización del colágeno en las reparaciones óseas y en los sitios de injerto. Además, promueven una integración más rápida de los mismos (en aproximadamente 2 meses). También mejoran la densidad ósea de las trabéculas (15 % a 30 %), y tienen una acción como osteoinductores al crear una trama que facilita el desplazamiento de los osteoblastos.

Actualmente se ha establecido que las propiedades de los plasmas ricos en plaquetas están basadas en la producción y liberación de múltiples factores de crecimiento y diferenciación luego de la activación de las plaquetas. Estos factores son críticos en la regulación y estimulación del proceso de curación de las heridas y juegan un papel importante regulando procesos celulares tales como la mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y metabolismo (15).

El PRP obtenido de la sangre del propio paciente es utilizado para concentrar factores de crecimiento hasta un 33,8 % por encima de los valores encontrados en el plasma normal y es aplicado posteriormente en los tejidos buscando potenciar la cascada biológica de la osteoinducción.

El gel de PRP es formado con la mezcla de PRP obtenido con la centrifugación de la sangre autóloga, con trombina y cloruro de calcio; contiene un compuesto de fibrinógeno y plaquetas activadas (por la adición de la trombina), lo cual determina la liberación de una cascada de factores de crecimiento de los gránulos de las plaquetas.

El primer paso para realizar este estudio fue establecer la metodología para obtener PRP con concentraciones adecuadas de plaquetas y un volumen suficiente para realizar el total de las pruebas propuestas. La concentración de plaquetas

fue un factor determinante en la formación del gel de PRP. Al evaluar el plasma con concentraciones bajas de plaquetas se aumenta el tiempo para su formación, y disminuye su volumen, lo cual a su vez influye sobre la capacidad para transportar y liberar antibiótico. Probablemente, con preparados que tengan mayores concentraciones de plaquetas, el volumen y la calidad del coágulo aumenten y por ende también su capacidad de difundir antibiótico al medio.

El volumen de activador para preparar PRP ya está establecido; sin embargo, para el estudio fue necesario utilizar un volumen de activador que permitiera formar un coágulo adecuado para ser manipulado. Se evaluó el PRP activado sin antibiótico, y no se observó inhibición del crecimiento bacteriano. También se evaluó en el medio de cultivo el plasma restante de la separación del coágulo de cada antibiótico en las diluciones más altas, y tampoco se observó inhibición. De esta manera se evidencia que ni el plasma rico en plaquetas por sí solo, ni su activador tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. El PRP activado y mezclado con antibiótico forma redes de fibrina que absorben el antibiótico y lo liberan controladamente al medio.

Se encontró que los cuatro antibióticos evaluados fueron transportados y liberados por el gel de PRP produciendo inhibición del crecimiento bacteriano en las mayores concentraciones; ninguno produjo inhibición por debajo de la dilución de 1 µg/ml. Solamente la oxacilina, en dilución de 32 µg/ml, produjo un halo de inhibición mayor que el sensidisco; este resultado fue consistente en las tres pruebas que se realizaron. En contraste, la vancomicina generó los halos de inhibición de menor diámetro, y la ciprofloxacina obtuvo el porcentaje más bajo con respecto a la difusión del sensidisco; este comportamiento heterogéneo sugiere que cada antibiótico tiene una capacidad de difusión propia, la cual debe ser tenida en cuenta si se quiere emplear el gel de PRP como transportador y sistema de entrega local de antibióticos.

## Referencias bibliográficas

1. Buckwalter JA, Simon SR, Einhorn TA, editores. Orthopaedic basic science. Biology and biomechanics of the musculoskeletal system. 2.<sup>a</sup> ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000. p. 217-60.
2. Whalen JL, Fitzgerald RH, Morrissy RT. A histological study of acute hematogenous osteomyelitis following physal injuries in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1998; 70A: 1383-92.
3. Springer BD, Lee GC, Osmon D, Haidukewych GJ, Hanssen AD, Jacofsky DJ. Systemic safety of high dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop* 2004; 427: 47-51.
4. Kanellakopoulou K, Giamarellos E. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs* 2000; 59(6): 1223-32.

5. Buchholz HW, Elson RA, Engelbrecht E, Lodenkämper H, Röttger J, Siegel A. Management of deep infection of total hip replacement. *J Bone Joint Surg* 1981; 63B: 342-53.
6. Hanssen AD, Spangelh MJ. Treatment of the infected hip replacement. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 430: 125-31.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
8. Neut D, van de Belt H, Van Horn JR, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Residual gentamicin-release from antibiotic loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* 2003; 24: 1829-31.
9. Petty W, Spanier S, Shuster JJ, Silverthorne C. The influence of skeletal implants of incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone joint Surg* 1985; 67A: 1236-44.
10. Becker PL, Smith RA, Williams RS, Dutkowsky JP. Comparison of antibiotic release from polymethylmethacrylate beads and sponge collagen. *J Orthop Res* 1994; 12: 737-41.
11. Van De Belt H, Neut D, Schenk W, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ. Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and staphylococcus aureus biofilm formation. *Acta Orthop Scand* 2000; 71: 625-9.
12. Garvin KL, Miyano JN, Robinson D, Giger D, Novak J, Radio S. Polylactide/poliglycolide antibiotic implants in the treatment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg* 1994; 76A(10): 1500-6.
13. Kawanabe K, Okada Y, Matsusue Y, Iida H, Nakamura T. Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80(3): 527-30.
14. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn T. The role of growth factors in the repair of bone. *J Bone Joint Surg Am* 2002; 84: 1032-44.
15. Sánchez A, Sheridan P, Kupp L. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 93-103.
16. Medina A. Aplicación de adhesivo plaquetario autólogo: mejora cicatrización en pacientes quemados. *Boletín Científico Asociación Chilena de Seguridad* 2000; 26-30.
17. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorfometric study in minipigs. *Int Oral Maxillofac Implants* 2003; 18: 15-22.