

# Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP) en el Laboratorio de Terapia Celular para uso como herramienta terapéutica en medicina regenerativa

Claudio Pérez N.<sup>(1)</sup>, Gisselle Escobar A.<sup>(2)</sup>, Pablo Soto B.<sup>(1)</sup>, Camila Ibarra C.<sup>(1)</sup>, Milton Larrondo L.<sup>(3)</sup>, Jorge Alfaro L.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Unidad de Terapia Celular, Banco de Sangre, HCUCH

<sup>(2)</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

<sup>(3)</sup>Banco de Sangre, HCUCH

## SUMMARY

Platelet rich plasma (PRP) is used to speed up tissue repair. Despite its widespread use, the therapeutic application of PRP generates controversies in clinical results due to the variability in methods of obtaining the different preparations and differences between the components of different types of PRP, so it's recommended to mention the type of platelet preparation used. In this article, we describe technical and biological characteristics of our platelet product, and we compare them to different commercial preparations described in order to validate their clinical use. Our results determine that the preparation can be considered a platelet rich plasma with biological activity in vivo and in vitro, which supports its use as a valid therapeutic tool, alternative to products currently available in Regenerative Medicine.

**Fecha recepción: mayo 2020 | Fecha aceptación: septiembre 2020**

## INTRODUCCIÓN

El plasma rico en plaquetas (PRP) es utilizado para facilitar la reparación tisular<sup>(1)</sup>. Funciona como un reservorio de factores de crecimiento y citoquinas que son liberados al momento de activar las plaquetas. En general, un preparado es considerado un PRP cuando la concentración de plaquetas aumenta entre 4 a 10 veces en relación

a sangre periférica (150.000 - 400.000 plaquetas / $\mu$ L)<sup>(2)</sup>.

Existen diferentes protocolos de obtención de PRP que difieren en los procesos de toma de muestra, centrifugación, métodos de activación, concentración de plaquetas, concentración de leucocitos, contenido de fibrina o fibrinógeno, presencia o ausencia de glóbulos rojos y volumen final obteni-

do<sup>(3-5)</sup>. Esto ha generado una gran variabilidad en los resultados clínicos<sup>(6,7)</sup>, por lo que se recomienda mencionar el tipo de preparado plaquetario utilizado. En general, la clasificación del PRP se ha enfocado en la concentración de plaquetas y leucocitos presentes en el preparado (Tabla 1); sin embargo, de acuerdo a la clasificación DEPA propuesta por Magalon<sup>(8)</sup>, debe ampliarse esa descripción y considerar: (D) dosis de plaquetas inyectadas, (E) eficiencia en la producción del PRP, (P) pureza del producto y (A) método de activación.

Nuestro Laboratorio prepara PRP para uso autólogo en problemas de reparación osteomuscular, estético y para el tratamiento del dolor, a diferencia de métodos automatizados como GPS III®, BIOMET®, Plateltext®, Magellan®, Artherx ACP® o BTI<sup>(9,10)</sup>, la preparación es manual. El objetivo de este artículo es describir las características de nuestra preparación plaquetaria, considerando la clasi-

ficación DEPA y compararla a PRPs obtenidos por métodos automatizados utilizados en medicina regenerativa.

## INDIVIDUOS, MATERIALES, MÉTODOS Y PROCEDIMIENTO

### Individuos y muestra

Los individuos reclutados firmaron consentimiento informado aprobado por Comité de Ética y certificado por la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica del Hospital Clínico Universidad de Chile (HCUCH). A los individuos se les extrajo en dos ocasiones 30 mL de sangre periférica espaciadas por 10 días en condición de ayuno y sin haber tomado anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios en las últimas 72 horas. Las muestras se depositaron en tubos de 10 mL previamente condicionados con 1 mL del anticoagulante ACD-A.

**Tabla 1. Clasificación de los preparados plaquetarios y componentes de acuerdo a su estado de activación y los componentes presentes.**

Componente	PRP no activado			PRP activado			
	P-PRP	LP-PRP	L-PRP	Gel		Líquido	
				P-PRF	L-PRF	PRGF	SRGF
Plaquetas	+++	+++	+++	+	+	-	-
Plaquetas activadas	No	No	NO	Sí	Sí	Sí	Sí
Leucocitos	< 100/μL	300 - 1500/μL	>1500/μL	< 100/μL	>1500/μL	-	-
Factores de crecimiento y citoquinas en sobrenadante	+	+	+	+(atrapadas en malla de fibrina)	+(atrapadas en malla de fibrina)	+++	+++
Adición de activadores de la coagulación CaCl <sub>2</sub> o trombina	-	-	-	-	-	+	+
Fibrina / Fibrinógeno	Fibrinógeno	Fibrinógeno	Fibrinógeno	Fibrina	Fibrina	Fibrina	-
Factores de la coagulación	+	+	+	-	-	-	-

P-PRP: plasma pobre en leucocitos y rico en plaquetas

LP-PRP: plasma bajo en leucocitos y rico en plaquetas

L-PRP: plasma rico en plaquetas y leucocitos

P-PRF: fibrina pobre en leucocitos y rico en plaquetas

L-PRF: fibrina rica en plaquetas y leucocitos

PRGF: plasma rico en factores de crecimiento

SRGF: serum rico en factores de crecimiento

### **Preparación de plasma rico en plaquetas**

Las muestras fueron sometidas a dos centrifugaciones (centrífuga marca Thermo modelo BR4i multifunction, ángulo fijo): la primera, a 400 x g durante 5 min a temperatura ambiente (TA) para separar las plaquetas de los otros tipos celulares y la segunda, a 2000 x g durante 10 min a TA para reducir volumen plasmático y concentrar las plaquetas. Posteriormente, el preparado se dejó en reposo durante 20 minutos a TA para desagregar las plaquetas. Finalmente se incubó a 22°C en agitación continua hasta su uso.

#### **Medición de la concentración de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y de citoquina TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en PRPs.**

Se midió en un hemocitómetro (marca Advia, Laboratorio Central, HCUCH) la concentración de plaquetas, leucocitos y eritrocitos en el PRP y en sangre periférica (basal). Para la determinación de las citoquinas, el PRP y el plasma basal fueron activados con 50  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 10% /mL de solución. Se esperó la formación del coágulo y luego de 40 min se recolectó el exudado plasmático y se realizó la medición con el test Quantikine ELISA Human TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 (R&D, Minneapolis, Minnesota, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **Medición de la actividad biológica del PRP sobre células que participan en el proceso de reparación tisular.**

Para evaluar la actividad biológica del PRP *in vitro*, se desarrollaron tres ensayos.

a. Inducción de fenotipo reparador de macrófagos (M2). Las células se generaron en condiciones establecidas anteriormente<sup>(11)</sup> y se incubaron con PRP autólogo activado con trombina a una

concentración de 50% v/v durante 48 horas (n=3). Posteriormente, las células fueron analizadas por criometría de flujo con los anticuerpos anti-CD14 FITC y anti-CD206-PE-Cy5.

- b. Proliferación de fibroblastos. 2 x 10<sup>4</sup> fibroblastos periodontales (cedidos gentilmente por Dr. Patricio Smith, Pontificia Universidad Católica de Chile) fueron incubados a 37°C con 20% v/v de PRP activado con trombina /DMEN (n=9), 10% SFB /DMEN (n=6) o medio DMEN durante 48 h. Posteriormente, se lavó dos veces con suero fisiológico y se agregó DMEN y 20  $\mu$ L de CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagen, incubando por 2 horas a 37°C. Al final del periodo, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Synergy HT (Biotek) y se calculó el índice de proliferación, dividiendo los valores de Abs de PRP o SFB con respecto a medio DMEN solo.
- c. Crecimiento de células madres mesenquimales (CMM) derivadas de médula ósea. La médula ósea fue obtenida de pacientes (n=2) con patología hematológica de leucemia mieloide crónica (LMC) y que tenían indicación de punción medular para control de su enfermedad. El excedente de muestra se utilizó, previo consentimiento del individuo, para la obtención de CMM. En breve, se disgregó la médula ósea y se agregó 10 mL ACK 1X (Gibco, USA) para eliminar los eritrocitos. Se lavaron las células con PBS y se sembraron 20 x 10<sup>6</sup> células nucleadas en medio SFB o PRP activado con trombina. A las 48 horas, se eliminó el sobrenadante de cultivo y se agregó medio fresco de RPMI /10% SFB o RPMI /10% PRP. El medio se cambió cada 3 días, contando las células presentes a los 10, 15 y 21 días. Adicionalmente, en el día +21, las células fueron evaluadas por citometría de flujo y se analizó la morfología mediante tinción de hematoxilina/eosina.

## **Inyección de PRP en paciente con fractura ósea**

Se realizó tratamiento con PRP en un paciente hombre de 51 años, quien presentó una fractura de la base del quinto metatarsiano izquierdo de 12 días de evolución. Además, presentó inflamación y dolor al caminar, por lo que cojeaba visiblemente. Para realizar tratamiento se extrajo 27 mL de sangre periférica (concentración plaquetaria basal de  $251 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ) y luego se preparó el PRP de acuerdo al protocolo descrito. Se obtuvo 2 mL de PRP conteniendo  $1842 \times 10^3$  plaquetas /  $\mu\text{L}$  (total  $3,6 \times 10^9$  PLT),  $1,7 \times 10^3$  leucocitos /  $\mu\text{L}$  y  $0,06 \times 10^6$  eritrocitos /  $\mu\text{L}$ , la que fue inyectada sin activar al día siguiente. Doce días después se preparó una segunda dosis, también a partir de 27 mL de sangre periférica (concentración plaquetaria basal  $330 \times 10^3 / \mu\text{L}$ ), obteniendo 2 mL de producto y conteniendo  $2445 \times 10^3$  plaquetas /  $\mu\text{L}$  (total  $4,89 \times 10^9$  PLT),  $2,4 \times 10^3 / \mu\text{L}$  y  $0,09 \times 10^6$  eritrocitos /  $\mu\text{L}$ , la que fue inyectada sin activar en el lugar de la lesión. Se realizó cultivo microbiológico en ambos preparados para descartar contaminación.

### **Comparación del PRP obtenido en Laboratorio de Terapia Celular con preparados plaquetarios utilizados en medicina regenerativa**

Se comparó el PRP obtenido en nuestro Laboratorio con otras preparaciones descritas para uso clínico. Se compararon los productos según la clasificación DEPA propuesta por Magalon<sup>(8)</sup> (Tabla 2). Además, se incluyó el anticoagulante utilizado, el estado de activación del producto y el tipo de PRP obtenido de acuerdo a la clasificación establecida por Ehrenfest<sup>(4)</sup>.

## **RESULTADOS**

### **Aumento de la concentración de plaquetas y de citoquina TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en PRPs obtenidos en el Laboratorio de Terapia Celular**

El análisis de datos reveló que el procedimiento aumenta  $6,4 \pm 1,1$  veces la concentración plaquetaria comparado a la concentración en sangre periférica, con un promedio de  $1,35 \pm 0,33 \times 10^3$  PLT /  $\mu\text{L}$  (Figuras 1A y 1B). Además, el método es reproducible e independiente del operador que realice la preparación del PRP (Figura 1C).

Con la técnica empleada se obtuvo un volumen aproximado de 2,5 mL de PRP con una concentración sobre  $1 \times 10^6$  plaquetas /  $\mu\text{L}$  en 17 de 20 preparaciones (85%). Además, el preparado contiene leucocitos (sobre 70% corresponde a linfocitos) en una concentración promedio de  $2,76 \pm 1,23$  células  $\times 10^3 / \mu\text{L}$ , pudiendo considerarse como un plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP). La contaminación por eritrocitos en el PRP mostró una concentración de  $0,102 \pm 0,033 \times 10^6 / \mu\text{L}$ , una reducción de 50 veces la cantidad encontrada en sangre periférica. La pureza del preparado, es decir, el porcentaje de plaquetas con respecto a otros tipos celulares, alcanzó un 92,9%.

La activación del PRP con  $\text{CaCl}_2$  provoca la liberación de factores de crecimiento y citoquinas desde las plaquetas hacia el medio. En nuestros preparados, la medición en sobrenadantes plasmáticos luego de 40 minutos postactivación detectó  $20,6 \pm 6,2$  ng / mL de TGF- $\beta$ 1 y de  $0,55 \pm 0,31$  ng/mL de TGF- $\beta$ 2, lo que significa un aumento de 6,5 y 4,2 veces la cantidad encontrada en el suero, respectivamente (Figuras 2A y 2B). Adicionalmente, y al igual que en otros estudios realizados<sup>(11-13)</sup>, confirmamos que existe una relación directamente proporcional entre la concentración plaquetaria y el TGF- $\beta$  (Figura 2C).

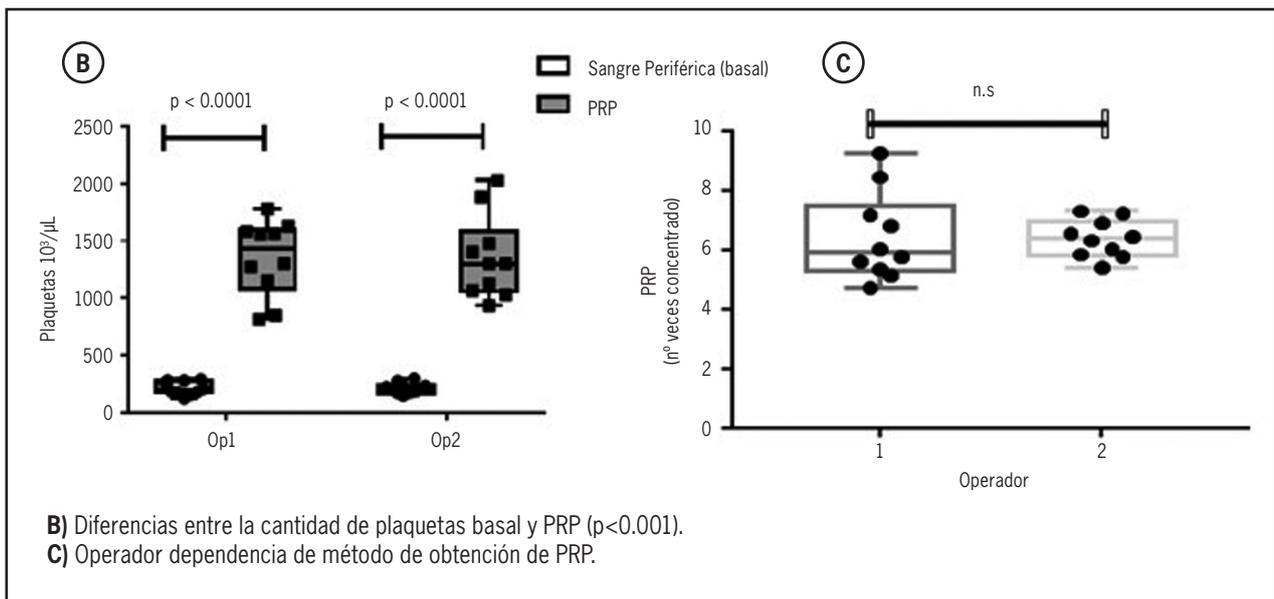
**Tabla 2. Comparación de diferentes formulaciones de PRP**

Parámetros									
Sistema	mL sangre (anti coagulante)	Dosis a inyectar x 10 <sup>9</sup> plt	Eficiencia recuperación plaquetaria (%)	Pureza del preparado	Clasificación DEPA	Volumen de PRP (mL)	Tiempo preparación (min)	Activación	Tipo PRP
Terapia celular	27 (ACD-A)	3,37 (B)	59,49 (C)	92,9 (A)	BCA	2,5	60	CaCl <sub>2</sub> (opcional)	L-PRP
Curasan	8,5 (CPD-A)	0,55 (D)	32,4 (C)	97,7 (A)	DCA	1	30		LP-PRP
Plateltex	6 (ACD-A)	0,23 (D)	19,4 (D)	87,5 (B)	DDB	0,34	25	CA**, batroxobin	L-PRP
GPS II *	50 (ACD-A)	2,28 (D)	92 (A)	6 (D)	CAD	6,01	20	Trombina autóloga	L-PRP
RegenLab	6 (ACD-A)	0,95 (D)	79,3 (B)	97,5 (A)	DBA	3,068	7	Trombina autóloga	P-PRP
Cascade MTF Sports	18 (citrad de sodio 3,8%)	2,43 (C)	67,5 (C)	81,5 (B)	CCB	7,5	8	CaCl <sub>2</sub>	LP-PRP
GPS III (BIOMET)	55 (ACD-A)	2,48 (C)	96 (A)	27 (D)	CAD	6	20	Trombina autóloga	L-PRP
Magellan	26 (ACD-A)	3,41 (B)	65,8 (C)	60,4 (C)	BCC	6	20		L-PRP
Selphyl	8 (citrato de sodio 3,8%)	0,95 (D)	59,5 (C)	73,9 (B)	DCB	4,1	8	CaCl <sub>2</sub>	L-PRP
RegenPRP	8 (citrato de sodio 3,8%)	0,99 (D)	61,7 (C)	46 (C)	DCC	3,1	10	Trombina autóloga	L-PRP
MiniGPS III	27 (ACD-A)	2,56 (C)	34,9 (C)	51,8 (C)	CCC	3,21	20	Trombina autóloga	L-PRP
ACP Arthrex	11 (ACD-A)	1,04 (C)	48 (C)	81 (B)	CCB	4,03	7	no	LP-PRP
Megalon et al (z)	30 (ACD-A)	1,81 (C)	30,2 (C)	80,7 (C)	CCB	3,41	40		L-PRP
JP200	20	1,04 (C)	26 (C)	19,6 (D)	CCD	1	20	CaCl <sub>2</sub>	L-PRP
GLO	8,5	0,64 (D)	37,4 (C)	38,2 (C)	DCC	0,6	10	CaCl o CaCl <sub>2</sub> (opcional)	L-PRP
Magellan Isto Biologics / Asteriocyte	60 (ACD-A)	5,43 (A)	45,3 (C)	32,9 (C)	ACC	3	17	CaCl <sub>2</sub>	L-PRP
Kyocera	20	3,12 (B)	78,1 (B)	29,4 (D)	BBD	2	20	CaCl <sub>2</sub>	L-PRP
Selphyl **	8 (citrato de sodio 3,8%)	0,21 (D)	13,1 (D)	99,7 (A)	DDA	2	20		LP-PRP
MyCells	10	0,98 (D)	48,8 (C)	87,3 (B)	DCB	1	8	Sin activar	L-PRP
Dr. Shin	8,5	0,78 (D)	45,9 (C)	18,8 (D)	DCD	1	10		L-PRP
Smartprep2 harvest (y)	54 (ACD-A)	8,5 (A)	58 (C)	< 95% (A)	ACA	7	15	Trombina humana	L-PRP

**Figura 1. Medición de la concentración plaquetaria en PRP.**

Muestras	Ensayo 1			Ensayo 2		
	PLT basal (x10 <sup>3</sup> /μL)	PRP (x10 <sup>3</sup> /μL)	Concentración (n° veces)	PLT basal (x10 <sup>3</sup> /μL)	PRP (x10 <sup>3</sup> /μL)	Concentración (n° veces)
SL	184	1557	8,46	204	1477	7,24
CI	281	1629	5,80	184	1066	5,79
CP	158	816	5,16	201	1298	6,46
PS	210	1271	6,05	222	1300	5,86
JL	260	1778	6,84	172	934	5,43
MS	281	1583	5,63	172	1127	6,55
AA	124	1151	9,28	149	1029	6,91
FU	291	1564	5,37	232	1403	6,05
RH	181	1302	7,19	277	2029	7,32
OQ	178	848	4,76	297	1883	6,34
Promedio	214,8	1349,9	6,46	211	1355	6,39

A) Cuadro resumen con valores en n=10 individuos.

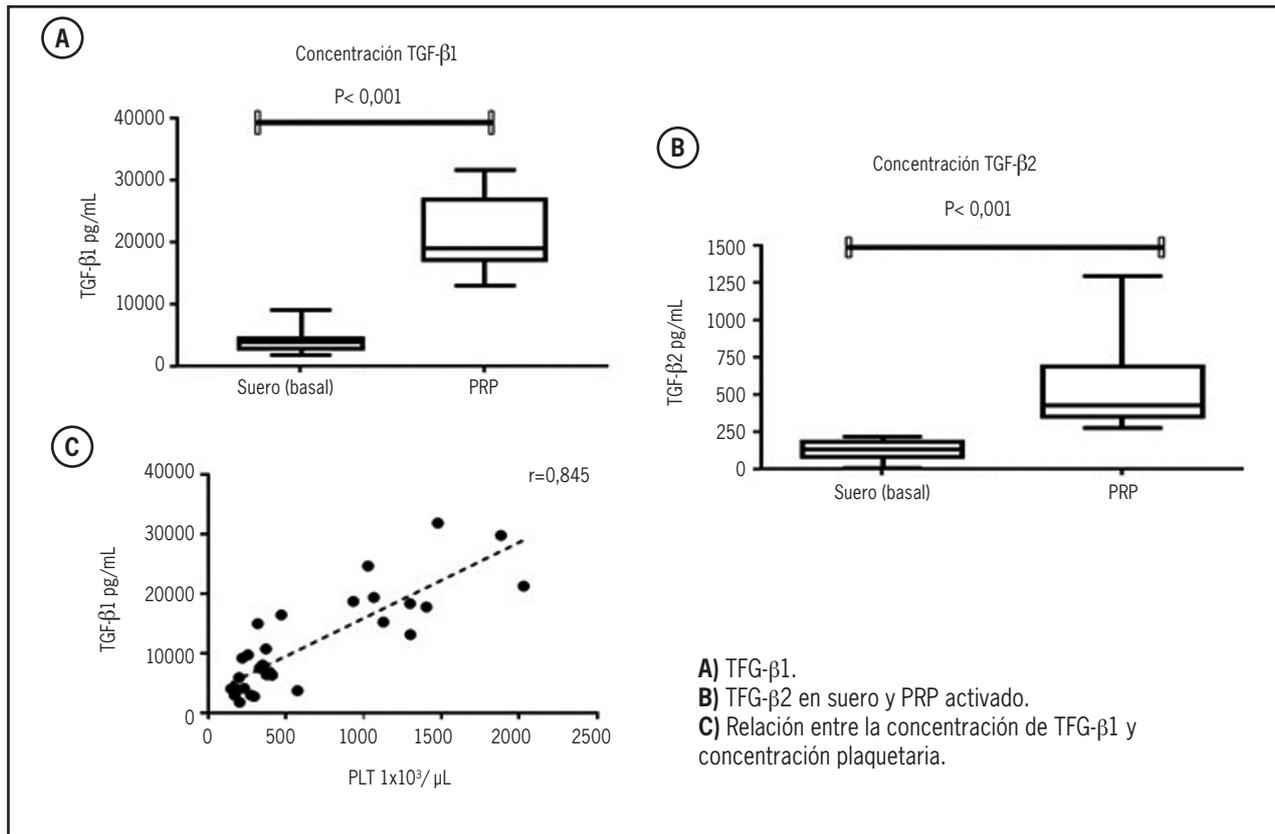


**El PRP estimula la polarización de macrófagos y la proliferación de células madres mesenquimales (CMM) y fibroblastos *in vitro*.**

En este trabajo se evaluó el efecto del PRP sobre células que participan en el proceso de reparación tisular, como macrófagos, CMM y fibroblastos. En nuestros resultados observamos un aumento significativo en la expresión de CD206, un marcador de macrófagos de tipo reparador, en células estimula-

das con 50% v/v de PRP activado (Figuras 3A y 3B) o una concentración de 25% v/v (no mostrado). Las concentraciones menores a un 20% v/v de PRP no tienen un efecto sobre la expresión del marcador CD206 en macrófagos; sin embargo, permiten la proliferación de células mesenquimales derivadas de médula ósea (Figura 3D), las que mantienen una morfología alargada (*spindle-shaped*), filiformes, granulares, con digitaciones de tipo fibroblasto característica de una CMM (Figura 3C) y un fenotipo

**Figura 2. Comparación entre concentración.**



CD90+ CD105+ CD45- propias de células madres mesenquimales (Figura 3E). El mismo efecto se observó en el cultivo de fibroblastos periodontales, que al ser estimulados con PRP al 20% durante 48 horas, mantienen su morfología típica (Figura 3F) y aumentan significativamente su capacidad ( $p < 0.01$ ) de proliferación comparado a cultivos con 10% SFB (Figura 3G).

#### **La aplicación de PRP en paciente con refractura ósea favorece la reparación del tejido óseo**

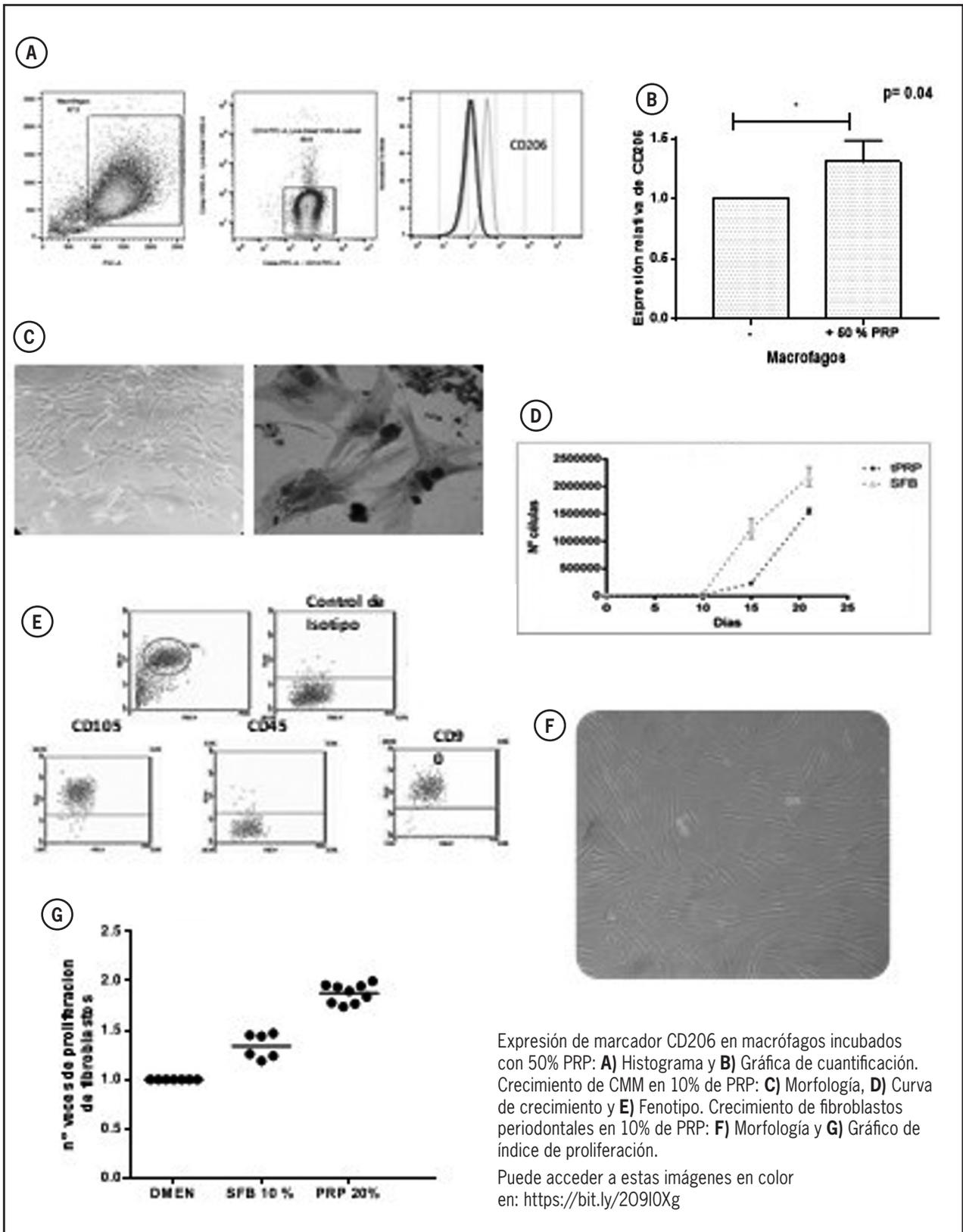
Luego de la infiltración de la primera dosis de  $3,6 \times 10^9$  PLT, el paciente indica que el dolor disminuyó considerablemente, caminando normalmente sin bota ortopédica; sin embargo, la radiografía muestra un leve crecimiento de tejido blando en el lugar de la fractura (Figuras 4A y 4B). Treinta días después de la segunda dosis de  $4,89 \times 10^9$  PLT, se

realiza una segunda radiografía, la que muestra un aumento de la densidad ósea en la zona de fractura (Figura 4C), indicando un proceso de reparación del hueso. En relación a su calidad de vida, el paciente mencionó que mejoró y que volvió a realizar sus actividades normales previas a la fractura ósea. Cabe consignar que en la administración del PRP no hubo complicaciones durante o después de su aplicación en el paciente.

#### **El PRP obtenido en Laboratorio de Terapia Celular corresponde a tipo BCA de acuerdo a la clasificación DEPA.**

Como mencionamos anteriormente, existen diversos métodos de obtención de PRPs, los cuales originan productos que difieren en su composición plaquetaria, la eficiencia de obtención, pureza, volumen, método de activación, entre otros (Tabla 2). De acuerdo a la clasificación DEPA, nuestro

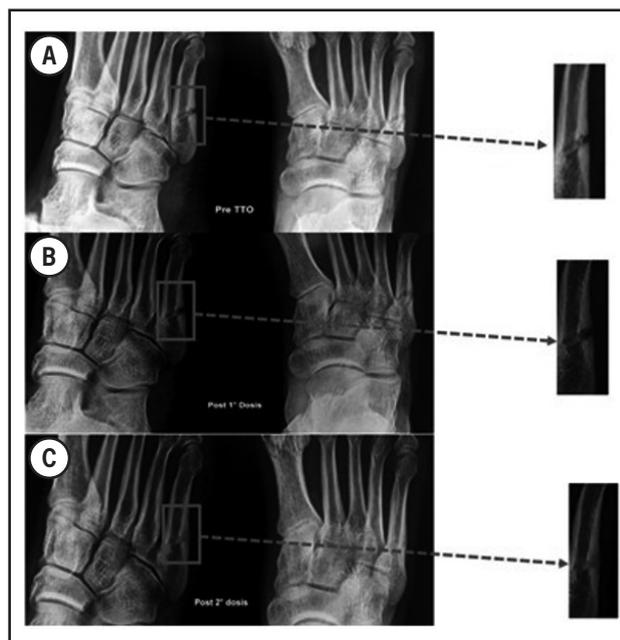
Figura 3. Efecto de PRP sobre células que participan en la reparación de tejidos.



Expresión de marcador CD206 en macrófagos incubados con 50% PRP: **A)** Histograma y **B)** Gráfica de cuantificación. Crecimiento de CMM en 10% de PRP: **C)** Morfología, **D)** Curva de crecimiento y **E)** Fenotipo. Crecimiento de fibroblastos periodontales en 10% de PRP: **F)** Morfología y **G)** Gráfico de índice de proliferación.

Puede acceder a estas imágenes en color en: <https://bit.ly/2O910Xg>

**Figura 4. Radiografía de pie izquierdo (fotografía invertida).**



**A)** Antes de terapia con PRP. **B)** 10 días post primera dosis de PRP. **C)** 30 días post segunda dosis de PRP.

preparado se considera un tipo BCA, es decir, la dosis de PRP inyectada fueron  $3,6$  y  $4,89 \times 10^9$  PLT (B), con una eficiencia de recuperación plaquetaria de  $53$  y  $54$  % (C) y la pureza fue de  $95$ % (A) en ambas preparaciones. En los productos evaluados no encontramos un PRP con la misma clasificación que el nuestro e incluso notamos que existe una gran diversidad entre las distintas formulaciones.

La mayoría de protocolos de obtención utilizan ACD-A como anticoagulante en una proporción  $1:9$  con la sangre extraída del paciente, y a diferencia de EDTA o heparina, mantiene la función plaquetaria. En general, el volumen plasmático obtenido en los preparados plaquetarios ricos en leucocitos (L-PRP), incluido el nuestro, corresponde a un  $10$ % del volumen de la muestra extraída, mientras que en productos plaquetarios pobres en leucocitos (P-PRP) el volumen plasmático está sobre un  $30$ % del volumen inicial. En relación al tiempo de preparación, nuestro procedimiento de-

mora  $60$  minutos, a diferencia de los PRP automatizados que se obtienen antes de  $25$  min. Esta diferencia se debe a que nuestro protocolo realiza dos centrifugaciones, sumado al tiempo de incubación empleado para desagregar las plaquetas. En relación al estado de activación del producto, nuestro producto puede ser o no ser activado con  $\text{CaCl}_2$  antes de ser aplicado, factor que depende exclusivamente del médico a cargo de la administración del producto.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo un PRP en base a protocolo desarrollado en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Clínico Universidad de Chile. La evaluación de sus características de producción y aplicación muestran que la formulación concentra las plaquetas sobre  $6$  veces con respecto a sangre periférica (Figuras 1A y 1B) y contiene una cantidad de leucocitos residuales que permite identificarlo como un plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP). Además, presenta una actividad biológica *in vitro* sobre células que participan en el proceso de reparación tisular (Figura 3), así como también, muestra un efecto en el crecimiento óseo en paciente con refractura ósea (Figura 4). De acuerdo a la clasificación DEPA, nuestro preparado corresponde al tipo BCA y al comparar las características de producción del PRP con otros productos plaquetarios (Tabla 2), se observan diferencias en su composición que podrían generar efectos clínicos distintos.

En la mayoría de nuestros PRP se obtiene una concentración plaquetaria sobre  $1 \times 10^6$  plaquetas  $/\mu\text{L}$ , valor estándar que se considera un criterio de calidad en la preparación del producto<sup>(14)</sup>. Este parámetro; sin embargo, no garantiza la actividad biológica deseada, por lo que evaluamos el efecto del PRP sobre diferentes tipos celulares involucrados en la reparación del tejido. Los resultados

mostraron que al estimular con 50% v/v de PRP activado con trombina, existe una polarización de macrófagos hacia un fenotipo reparador, un efecto equivalente al conseguido en un estudio anterior<sup>(11)</sup> al estimular macrófagos con PRP no activado en proporción 1:1000 (dosis de plaquetas  $0,3 \times 10^9$ ). Las concentraciones de 20 y 10% de PRP son suficientes para lograr la proliferación de fibroblastos y el crecimiento de CMM, respectivamente, aunque no podemos asegurar que sea la cantidad óptima, ya que no realizamos una curva de dosis-respuesta. En estudios similares, se observa un aumento en la proliferación en fibroblastos periodontales en cultivos, conteniendo un 20% v/v de PRPs obtenido mediante el método de GLO<sup>(15)</sup> e incluso en concentraciones bajas como al 1% de PRP activados con  $\text{CaCl}_2$ <sup>(16)</sup>. Del mismo modo, se ha descrito que las concentraciones de PRPs, conteniendo entre  $200-1500 \times 10^3$  PLT / $\mu\text{L}$  y luego diluidas en soluciones a 10% PRP /medio de cultivo, promueven la proliferación de CMM<sup>(17)</sup>. De lo anterior se desprende que los efectos biológicos inducidos por el PRPs dependen de su dosis y también del tipo celular a estimular, variables que se suman a las diferencias en el tipo de PRP utilizado y que pueden contribuir a la diversidad de resultados terapéuticos observados<sup>(18-20)</sup>.

Como hemos mencionado, los componentes varían entre los diferentes tipos de PRPs y actualmente no existe un consenso del contenido ideal de un preparado plaquetario para reparar el tejido. Por ejemplo, a diferencia de preparados considerados puros, nuestro producto contiene leucocitos y puede considerarse un L-PRP. Algunos autores señalan que la presencia de leucocitos genera una actividad antimicrobiana<sup>(21)</sup> y permite una óptima liberación de factores de crecimiento desde las plaquetas<sup>(22)</sup>, mientras que otros autores sugieren que la inclusión de estas células podría generar efectos negativos, como un aumento de

la inflamación o del proceso de fibrosis del tejido<sup>(23-24)</sup>. Tampoco existen datos concretos acerca de la cantidad de factores de crecimiento como BMP-2, FGF, VEGF, EGF o de citoquinas como IL-1 y TGF- $\beta$ , liberadas desde las plaquetas para la reparación normal sin provocar una fibrosis del tejido. En el caso de TGF- $\beta$ 1, un reconocido agente profibrótico que participa en la regeneración de los tejidos y regulación inmunológica, la concentración en nuestros preparados es menor a otros L-PRP obtenidos por procesos automatizados como GPS III Biomet, Magellan o SmartPrep 2<sup>(25)</sup>, condición que puede deberse al tipo de activador ( $\text{CaCl}_2$  vs trombina) o a la concentración de leucocitos presentes en el producto<sup>(13,25,26)</sup>. Para zanjar esta discusión, es necesario realizar estudios básico-clínicos que definan la composición y capacidad del PRP en la regeneración apropiada del tejido dañado. En relación a la administración de un preparado plaquetario con y sin activar, nuestro PRP queda supeditado a la decisión del médico tratante. Como antecedente, en un estudio de tratamiento realizado en pacientes con tendinopatía crónica del Aquiles realizado por Hanish<sup>(27)</sup>, se demostró efectos positivos, tanto al administrar un preparado activado (SmartPrep 2, L-PRP), como uno sin activar (Arthrex ACP\*, P-PRP).

Una de las dificultades que ha tenido la aplicación de PRP es que no se ha definido la dosis terapéutica ni la frecuencia necesaria que permita dar una recomendación clínica. En nuestro caso clínico, dos dosis consecutivas de PRP preparadas con nuestro protocolo y conteniendo  $3,4$  y  $4,89 \times 10^9$  PLT fueron aplicadas sin activar en un paciente con fractura ósea no consolidada. Se observa que el PRP provoca un aumento de la densidad ósea en el sitio de fractura a los 30 días post segunda dosis, el mismo efecto demostrado para los PRP activados con  $\text{CaCl}_2$  o trombina autóloga, obtenidos con el método de PRGF system y GPS III,

respectivamente<sup>(28,29)</sup> y aplicados en una sola dosis. De acuerdo a la clasificación DEPA, nuestro preparado corresponde al tipo BCA mientras que las formulaciones de PRGF system y GPS III se clasifican como DCA y CAD, por lo que concluimos que el ordenamiento DEPA sugerido por Magalon<sup>(8)</sup> permite uniformar y comparar características de preparación de distintos PRPs, pero no define su equivalencia terapéutica. En relación al mecanismo de acción del PRP en la formación ósea observada, ésta podría ser el resultado de la actividad de varios factores de crecimiento contenidos en las plaquetas, como el PDGF, TGF- $\beta$ , FGF o BMP-2<sup>(30,31)</sup> y la presencia de fibrina (fibrinógeno) que genera un soporte que favorece la migración y quimiotaxis de células reparadoras de tejido<sup>(31)</sup>.

Una mejor comprensión del mecanismo de acción de las plaquetas y el diseño de estudios clínicos con nuestro PRP nos permitirá definir su composición ideal para lograr los efectos terapéuticos deseados.

En definitiva, creemos que el PRP obtenido en nuestro laboratorio posee las propiedades necesarias para ser una herramienta terapéutica aplicable en nuestro Hospital.

## CONCLUSIONES

Desarrollamos un método de obtención de PRP, el cual permite alcanzar una adecuada concentración plaquetaria en los preparados.

Las plaquetas contenidas en el PRP liberan TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 luego de su activación, demostrando su funcionalidad.

El PRP presenta un efecto biológico *in vitro* sobre células que participan en la reparación del tejido y un efecto en el crecimiento óseo en paciente con fractura ósea.

Nuestro preparado es similar en componentes a preparados de tipo L-PRP y corresponde a clasificación BCA de acuerdo al sistema DEPA.

## REFERENCIAS

1. Anitua E, Pino A, Orive G. Opening new horizons in regenerative dermatology using platelet-based autologous therapies. *Int J Dermatol* 2017;56:247-51.
2. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001;10:225-8.
3. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G *et al.* In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13:1131-7.
4. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014;4:3-9.
5. Wu PI, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-rich plasma. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2016;27:825-53.
6. Mautner K, Malanga GA, Smith J, Shiple B, Ibrahim V, Sampson S *et al.* A call for a standard classification system for future biologic research: the rationale for new PRP nomenclature. *PM R* 2015;7(4 Suppl):S53-9.

7. Cohn CS, Lockhart E. Autologous platelet-rich plasma: evidence for clinical use. *Curr Opin Hematol* 2015;22:527-32.
8. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B, Louis ML, Silvestre A, Giraudo L *et al.* DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med* 2016;2:e00006.
9. De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfusion Medicine Reviews* 2015;29:52-61.
10. Dhurat R, Sukesh MS. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *Journal Cutaneous and Aesthetic Surgery* 2014;7:189.
11. Escobar G, Escobar A, Ascui G, Tempio FI, Ortiz MC, Pérez CA *et al.* Pure platelet-rich plasma and supernatant of calcium-activated P-PRP induce different phenotypes of human macrophages. *Regenerative Medicine* 2018;13:427-41.
12. Camila Ibarra Castro. Efecto biológico del plasma rico en plaquetas sobre cultivos de fibroblastos in vitro y su correlación con parámetros de calidad establecidos por el Laboratorio de Terapia Celular. 2017, Tesis de Pregrado, Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
13. Lee JW, Kwon OH, Kim TK, Cho YK, Choi KY, Chung HY *et al.* Platelet-rich plasma: quantitative assessment of growth factor levels and comparative analysis of activated and inactivated groups. *Archives of Plastic Surgery* 2013;40:530-5.
14. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry* 2001;10:225-8.
15. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Chappuis V, Buser D, Schaller B *et al.* Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health* 2017;17:91.
16. Nguyen PA, Pham T. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 2018;26, e20180077.
17. Wang K, Li Z, Li J, Liao W, Qin Y, Zhang N *et al.* Optimization of the platelet-rich plasma concentration for mesenchymal stem cell applications. *Tissue Engineering. Part A* 2019;25:333-51.
18. Ulusoy AT, Turedi I, Cimen M, Cehreli ZC. Evaluation of blood clot, platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and platelet pellet as scaffolds in regenerative endodontic treatment: a prospective randomized trial. *J Endod* 2019;45:560-6.
19. Magalon J, Bausset O, Serratrice N, Giraudo L, Aboudou H, Veran J *et al.* Characterization and comparison of 5 platelet-rich plasma preparations in a single-donor model. *Arthroscopy* 2014;30:629-38.
20. Huber SC, Junior JLRC, Silva LQ, Montalvão SAL, Annichino-Bizzacchi JM. Freeze-dried versus fresh platelet-rich plasma in acute wound healing of an animal model. *Regen Med* 2019;14:525-34.
21. Moojen DJF, Everts PA, Schure RM, Overdevest EP, van Zundert A, Knape J T *et al.* Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Orthopaedic Research* 2008;26:404-10.
22. Parrish WR, Roides B, Hwang J, Mafilios M, Story B, Bhattacharyya S. Normal platelet function in platelet concentrates requires non-platelet cells: a comparative in vitro evaluation

- of leucocyte-rich (type 1a) and leucocyte-poor (type 3b) platelet concentrates. *BMJ Open Sport & Exercise Medicine* 2016;2.
23. Etulain J. PRP: Fundamento de su mecanismo de acción. In *Hematología: Volumen 20-Número Educativo-XII Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis* (Vol. 5, p. 91). Sociedad Argentina de Hematología.
  24. Klatte-Schulz F, Schmidt T, Uckert M, Schefler S, Kalus U, Rojewski *et al.* Comparative analysis of different platelet lysates and platelet rich preparations to stimulate tendon cell biology: an in vitro study. *Int J Molecular Sciences* 2018;19:212.
  25. Amable PR, Caria, RBV, Teixeira MVT, da Cruz Pacheco Í, do Amaral RJFC, Granjeiro JM, Borojevic R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Research & Therapy* 2013;4:67.
  26. Oh JH, Kim WOO, Park KU, Roh YH. Comparison of the cellular composition and cytokine-release kinetics of various platelet-rich plasma preparations. *Am J Sports Medicine* 2015;43:3062-70.
  27. Hanisch K, Wedderkopp N. Platelet-rich plasma (PRP) treatment of noninsertional Achilles tendinopathy in a two case series: no significant difference in effect between leukocyte-rich and leukocyte-poor PRP. *Orthop Res Rev* 2019;11:55-60.
  28. Ghaffarpasand F, Shahrezaei M, Dehghankhalili, M. Effects of platelet rich plasma on healing rate of long bone non-union fractures: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Bulletin of Emergency and Trauma* 2016;4:134-40.
  29. Castillo-Cardiel G, Medina-Quintana VM, Lomelí-Enríquez M, Medrano-Muñoz F, Guerrero-Velázquez C, Contreras-López CK *et al.* Plasma rico en plaquetas y su efecto en la regeneración ósea en fracturas mandibulares. Ensayo clínico controlado. *Gaceta Médica de México* 2017;53:461-7.
  30. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews. Rheumatology* 2015;11:45-54.
  31. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg* 2013;133:153-65.

#### **CORRESPONDENCIA**

BQ. Claudio Pérez Núñez  
Unidad de Terapia Celular, Banco de Sangre  
Hospital Clínico Universidad de Chile  
Dr. Carlos Lorca Tobar 999, Independencia  
Fono: 562 2978 8067  
E-mail: claperez@hcuch.cl

