

USOS DEL PRP

EN MEDICINA REGENERATIVA Y ESTÉTICA

INTRODUCCIÓN:

Las plaquetas cumplen un rol fundamental en la hemostasia y la trombosis, pero por sus propiedades moduladoras y estimulantes de las células madre de origen mesenquimal (con capacidad de diferenciarse hacia diferentes líneas celulares: fibroblasto, osteoblasto, condrocito, células endoteliales, epiteliales, miocitos y adipositos principalmente), es utilizado como una gran herramienta para mejorar la regeneración tisular. Basándonos en este fundamento es que la medicina regenerativa toma al plasma rico en plaquetas como una herramienta de uso cotidiano en los tratamientos tendientes a la reparación y regeneración tisular.

En este curso se describirán los fundamentos biológicos subyacentes al uso del PRP, formas de preparación y características de los principales hemoderivados en las patologías más frecuentes en traumatología.

La Reparación Tisular

El proceso de reparación tisular es un conjunto de eventos celulares y moleculares que se producen por etapas hasta la reconstitución de los tejidos dañados.

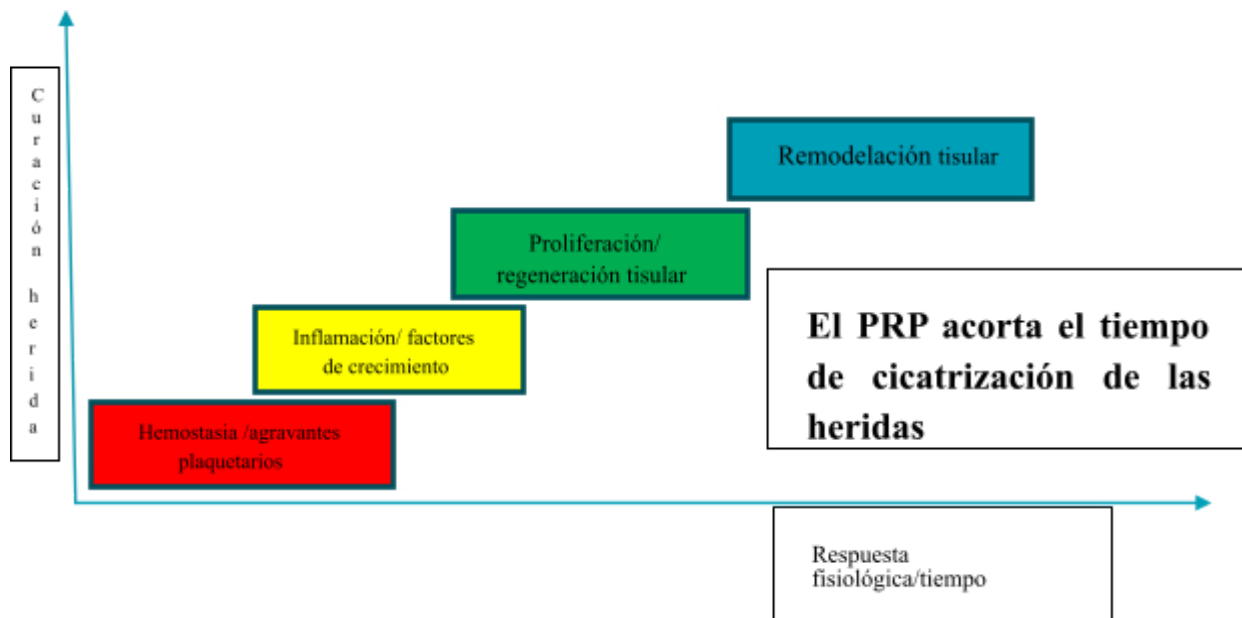
Estas etapas ocurren en forma secuencial y solapada:

1 Etapa de inflamación: Esta etapa dura de 4 a 6 días de iniciada la lesión, el objetivo principal de esta etapa es formar el tapón hemostático. Una vez producida la lesión las plaquetas entran en contacto con elementos del subendotelio al cual se adhieren y agregan consolidando el tapón hemostático, a la vez que liberan sus gránulos intracelulares que contienen factores de crecimiento y citoquinas que funcionan como reclutadores de otras células como neutrófilos y monocitos capaces de fagocitar los tejidos dañados y las bacterias que pudieran haber entrado a través de la lesión. Además, los factores de crecimiento estimulan a las células madre mesenquimales para la producción de matriz extracelular y su diferenciación celular.

2 Etapa Proliferativa: Con una duración de 4 a 21 días, esta etapa se caracteriza por la aparición de nuevos vasos sanguíneos a partir de la migración y proliferación de células endoteliales adyacentes al tejido dañado o reclutadas de la circulación. En esta etapa se forma la cicatriz provisoria o tejido de granulación producto de la matriz extracelular producida por los fibroblastos que han migrado a la zona y se han activado a través de los factores de crecimiento liberados en la etapa previa

3 Etapa de Remodelación: Esta etapa dura de 21 días a 2 años y en ella se produce la retracción de la cicatriz y remodelado del colágeno que conforma la matriz extracelular. Es en esta etapa donde ocurre la reparación y regeneración tisular, que dependerá de la capacidad intrínseca de cada tejido. Por ejemplo, si la lesión se produce en una mucosa o epitelio tejidos de reparación continua) se logrará una completa regeneración de los tejidos ad integrum, por el contrario, si la lesión se produce en un tejido con baja tasa regenerativa (por ejemplo, en SNC) se producirá una reparación, pero con poca capacidad regenerativa dejando una cicatriz en la lesión.

Diversos factores tanto locales (isquemia, tejido necrótico, infección) como sistémicos (diabetes, medicamentos, edad, desnutrición, etc.) influyen en esta secuencia de cicatrización/reparación tisular, produciendo cicatrices anómalas.



Las plaquetas

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos citoplasmáticos pequeños, irregulares y carentes de núcleo, de 2-3 μm de diámetro, derivados de la fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos; la vida media de una plaqueta oscila entre 8 y 12 días.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno. Además, las plaquetas contienen diferentes tipos de gránulos (fundamentalmente gránulos densos, gránulos α y lisosomas) los que al ser activadas liberan diferentes factores almacenados en ellos y que a su vez estimulan la actividad de la propia plaqueta. Estos factores tienen también efectos biológicos sobre otras células del entorno plaquetario. Un estudio proteómico ha descrito que las plaquetas activadas por trombina liberan más de 300 proteínas diferentes, muchas de ellas relacionadas con reacciones inflamatorias. Además, las plaquetas pueden interactuar con patógenos bacterianos e incluso expresar receptores del complemento, lo que las convierte también en células involucradas en la inmunogenicidad del organismo. De hecho, las plaquetas expresan y almacenan proteínas antibacterianas llamadas trombocidinas.

Como hemos señalado, las plaquetas contienen fundamentalmente tres tipos de gránulos: los gránulos densos, los gránulos α y los lisosomas. La liberación de los gránulos densos en las plaquetas ocurre por exocitosis, y desde ellos se liberan difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP), fosfato inorgánico, polifosfatos, serotonina y calcio, entre otros.

La liberación de ADP es esencial como cofactor de la agregación plaquetaria y actúa mediante su interacción con receptores específicos localizados en la superficie plaquetaria. Se conocen dos receptores para el ADP en la plaqueta, uno acoplado a la proteína Gq (el P2Y1) y otro acoplado a Gi (el P2Y12), que es esencial para la hemostasia primaria. Ambos receptores actúan de modo sinérgico en la activación de las plaquetas. El P2Y1 probablemente sea lo que origina la activación inicial reversible, mientras que el P2Y12 es necesario para la activación prolongada y la agregación plaquetaria. El ADP y el ATP no sólo pueden actuar como coactivadores plaquetarios, sino también influir en el tono vascular.

El calcio liberado por la plaqueta es necesario para la formación de fibrina, mientras que los polifosfatos actúan como elementos reguladores en la coagulación y en el sistema fibrinolítico reaccionando con el factor XII, entre otros. Finalmente, la serotonina no sólo tiene efecto vasoconstrictor, sino que también interviene en la activación de las propias plaquetas.

Los lisosomas plaquetarios contienen elastasas y otras proteasas que facilitan la degradación de la matriz extracelular, además de crear un ambiente ácido que favorecerá la acción de estas enzimas.

Los gránulos α son reservorios de proteínas que van desde factores de crecimiento hasta moléculas de adhesión o receptores que utiliza la plaqueta para interactuar con otras células. Entre estos receptores se incluyen las glucoproteínas (GP) Ib y α IIbB3. Otra de las moléculas de adhesión contenidas en estos gránulos es la P-selectina, que permite la interacción de las plaquetas con las células endoteliales, los leucocitos y otras células inmunitarias. En los gránulos α hay también moléculas asociadas a la respuesta inflamatoria, como las citocinas.

Activación Plaquetaria

El mecanismo de formación del trombo plaquetario puede dividirse en cuatro etapas:

1. Frenado de las plaquetas circulantes sobre la pared vascular contra la corriente del flujo sanguíneo que las empuja.
2. Activación y adhesión firme de la plaqueta a la pared del vaso.
3. Unión de más plaquetas a las ya adheridas, que sería la fase de crecimiento del trombo.
4. Estabilización del trombo, la última fase.

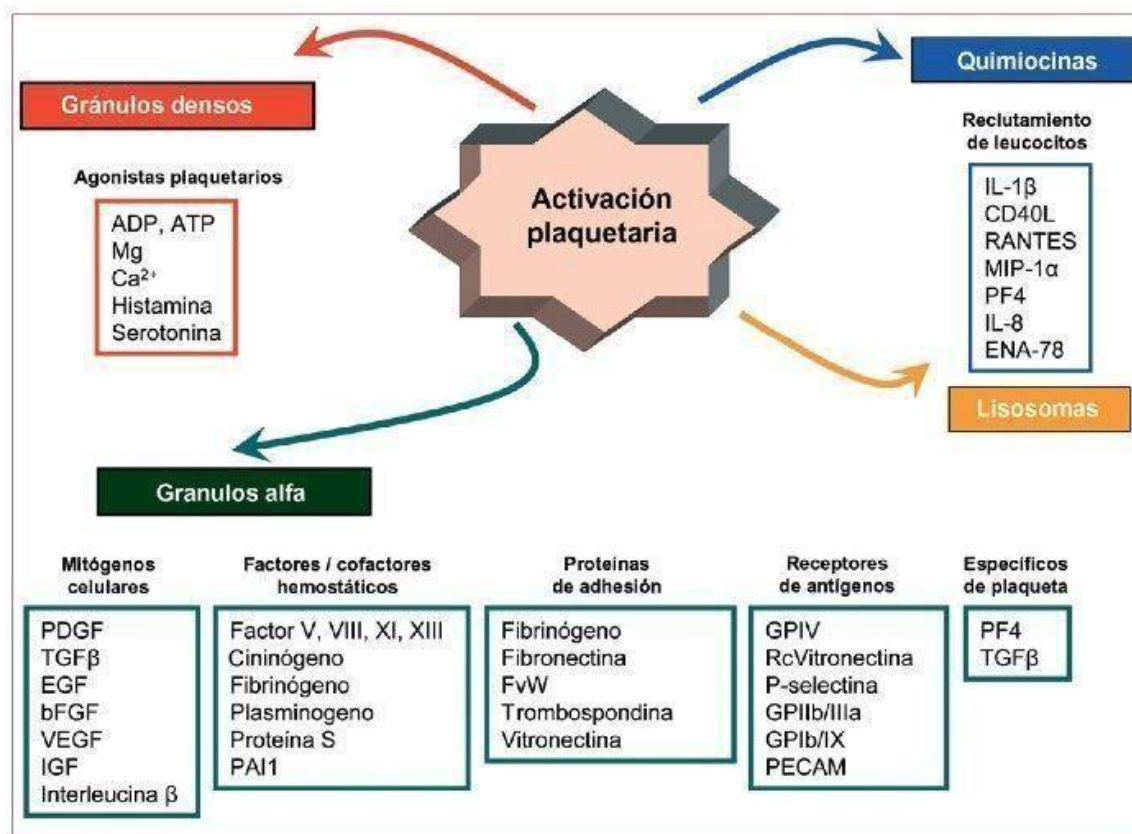
En cada fase actúa una serie de mecanismos no completamente conocidos.

La GPIb α actúa en la fase inicial de frenado de las plaquetas sobre la pared vascular. La GPIb α se expresa de forma constitutiva en la superficie de la plaqueta e inicia el proceso de adhesión plaquetario uniéndose al colágeno y al factor von Willebrand (FvW). El FvW estará embebido en las fibras de colágeno, particularmente del colágeno de tipos I, III y VI. En los vasos con alto estrés de rozamiento, como ocurre en las arterias, el FvW es esencial para reducir el flujo rápido de las plaquetas mediante la interacción del dominio A1 del FvW con GPIb α . Sin embargo, la GPIb α es también el receptor más conocido de la proteína Mac-1, localizada en la superficie de los leucocitos activados. Mediante la interacción entre GPIb α y Mac-1 ocurre la unión entre plaqueta y leucocito, importante en la respuesta inflamatoria mediada por las plaquetas.

La interacción transitoria entre el FvW y la GPIb α permite la «rodadura» de las plaquetas en la zona dañada del vaso. Como resultado, las proteínas contenidas en la pared vascular, fundamentalmente el colágeno, inducen la activación de las plaquetas y su adhesión firme a la pared, de tal manera que el colágeno y el FvW forman una especie de unidad funcional para la formación inicial del trombo, en el que el FvW contribuye a la captura inicial de las plaquetas en la superficie del vaso y el colágeno permite que se establezca una unión más estable con las plaquetas. En el proceso de interacción entre plaqueta y colágeno participan dos receptores plaquetarios, la GPVI y la integrina α 2 β 1.

La activación de las plaquetas mediada por GPVI permite una firme adhesión de las plaquetas y la secreción de las sustancias procoagulantes y proinflamatorias contenidas en ellas, lo que hace que el trombo crezca y se consolide su formación. Además, a la unión de las plaquetas al colágeno sigue la expresión de fosfatidilserina sobre la membrana plaquetaria. La fosfatidilserina proporciona actividad protrombinasa, que aumenta la formación de trombina. Las plaquetas adheridas permanecerán vivas durante horas o días en el sitio de la lesión vascular y liberarán microvesículas con actividad proinflamatoria y protrombótica, de las cuales se hablará más adelante.

Después de la deposición de las plaquetas sobre el FvW y el colágeno, se requiere el reclutamiento de nuevas plaquetas desde la circulación, en un proceso conocido como agregación plaquetaria. Esto es posible por la acumulación local de agonistas de la activación de las plaquetas debida a su secreción desde las plaquetas ya adheridas a la pared del vaso. Entre estos agonistas se incluyen el ADP, el TxA₂, la epinefrina y la trombina. La etapa final es la activación de los receptores α IIb β 3, que posibilitan la unión del fibrinógeno y también del FvW, lo que permite el establecimiento de puentes estables entre las plaquetas. En el proceso de estabilización participan también otras moléculas, quizá una de las de mayor interés sea el ligando de CD40 (CD40L).

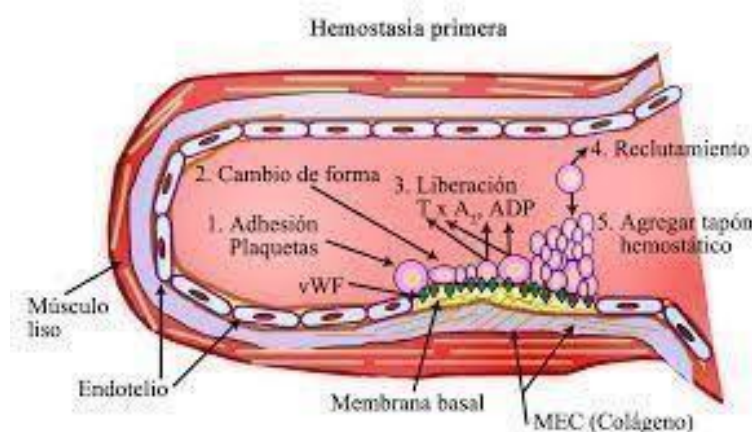


El CD40L es una GP almacenada en los gránulos plaquetarios que, tras la desgranulación plaquetaria, pasa a expresarse en la superficie de la plaqueta. Desde allí puede liberarse desde la plaqueta al plasma mediante la actividad de la metaloproteasa-2. Tanto el CD40L unido a la plaqueta como el CD40L soluble interaccionan con el CD40, expresado en los linfocitos B, los neutrófilos, los monocitos, otras plaquetas, las células endoteliales, las células dendríticas, los fibroblastos y las células de músculo liso vascular, entre otras. No se conoce bien el papel de esta interacción CD40L-CD40, pero sí se sabe que la interacción del CD40L de la plaqueta con el CD40 de las células endoteliales estimula la expresión y la liberación de moléculas asociadas al proceso inflamatorio. Además, la interacción del CD40L expresado en las plaquetas con las células endoteliales de origen coronario reduce la capacidad de estas de liberar óxido nítrico (NO) y aumenta el estrés oxidativo.

Txa2, Amplificador De La Activación Plaquetaria

Después de la activación inicial de las plaquetas, diferentes mecanismos cooperan para que esta activación se transmita al mayor número de plaquetas, y se produce lo que se conoce como fenómeno de reclutamiento plaquetario. Uno de estos factores cooperadores principales es el TxA2, que se sintetiza en la plaqueta como consecuencia de la liberación de ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A2. El ácido araquidónico es el sustrato de la ciclooxigenasa-1 (COX-1). La COX-1 producirá endoperóxidos cíclicos de las prostaglandinas, PGG2 y PGH2 como productos iniciales, que se transformarán en TxA2 por la actividad de la TxA2 sintasa. El TxA2, además de activar más plaquetas, contraerá las células del músculo liso vascular.

Es conocido que la inhibición de la COX-1 plaquetaria es el mecanismo principal de acción antiplaquetaria del ácido acetilsalicílico. El ácido acetilsalicílico acetila de forma irreversible la molécula de hidróxido (OH) de la serina en posición 529 de la COX-1, con lo que se inhibe la actividad de esta enzima. El resultado de que se reponga la actividad de COX-1 en las plaquetas depende de la producción de más plaquetas debido al carácter anucleado de estas, lo que las hace incapaces de generar nueva COX-1. Se calcula que se genera nuevo cada día aproximadamente un 10% del total de las plaquetas circulantes y que casi el 30% de las plaquetas tendrán activa la COX-1 y una producción normal de TxA2 en las 48h tras la última dosis de ácido acetilsalicílico.



Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento o GF (growth factors) son un conjunto de sustancias de naturaleza peptídica cuya misión es la comunicación intercelular a nivel molecular.

Son capaces de modificar las respuestas biológicas celulares, ya que regulan la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular, e incluso la apoptosis. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular, mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada de la célula en la fase G1.

Los factores de crecimiento estimulan el aumento de tamaño celular al incrementar la síntesis proteica de la célula sobre las actúan. En cuanto a su clasificación, los factores de crecimiento se pueden clasificar según sea su especificidad: amplia o reducida.

Los de especificidad amplia como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) actúan sobre muchas de las células, entre las cuales tenemos: fibroblastos, fibras musculares lisas, células neurogliales y el EGF, además sobre células epiteliales y no epiteliales. Como ejemplo de factor de crecimiento de especificidad reducida tenemos a la eritropoyetina, que solo induce la proliferación de los precursores de los hematíes.

Los factores de crecimiento actúan de manera local, La estimulación celular se realiza bien por un sistema autocrino en el que las células producen y responden al mediador biológico, o por un sistema paracrino en el que la célula que produce el factor se encuentra en las proximidades de las células a las que afectan. En general, los factores de crecimiento son sintetizados en forma de precursores, siendo necesario para la liberación del factor en forma activa un proceso específico de proteólisis. Su mecanismo de acción siempre comienza al unirse a receptores específicos de membrana, para cada tipo de factor de crecimiento existe un receptor o conjunto de receptores específicos. Las células responden a un FC solo si disponen de la proteína receptora apropiada. El proceso está mediado por un sistema de segundos mensajeros que activan la cascada de señales que acaba en la activación de uno o varios genes (transducción de señales).

Debido a este mecanismo, las acciones de los factores a nivel local continúan, aunque hayan desaparecido los mismos del medio, ya que han activado el sistema de segundos mensajeros.

Entre los tipos celulares productores de los factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, leucocitos, monocitos y macrófagos. Además, existen lugares de almacenamiento, como son las plaquetas (en los gránulos alfa) y en el hueso (adheridos a la matriz ósea)

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

- Tipos: A, BB, AB
- Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos, por un mecanismo de quimiotaxis:
- Activador de macrófagos.
- Mitógeno de células mesenquimales

- Facilita la formación de colágeno tipo I
- Promueve la proliferación de las células adiposas y de los fibroblastos dérmicos.

Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)

- Quimiotaxis;
- Proliferación y diferenciación de las células mesenquimales.
- Síntesis de colágeno por los osteoblastos
- Promueve la proliferación de adipositos y fibroblastos dérmicos
- Pro-angiogénesis;
- Inhibe la formación de osteoclastos
- Inhibe la proliferación de células epiteliales en presencia de otros factores.

Factor crecimiento epidérmico (EGF)

- Efectos mitogénicos y quimiotácticos en fibroblastos y células epiteliales
- Induce la migración celular
- Los fibroblastos, los proosteoblastos y precondrocitos expresan un alto número de receptores para EGF;
- Estimula la formación de tejido de granulación.

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

- Estimulación y coordinación de la mitogénesis de las células mesenquimales como los fibroblastos, los osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas y mioblastos
- Inhibe los osteoclastos;
- Promueve la proliferación de los fibroblastos e induce la secreción de fibronectina por estos;
- Pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.

Factor de crecimiento insulina-like (IGF)

- Promueve la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de revestimiento
- Estimula la síntesis de osteocalcina, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I por los osteoblastos
- Actúa como agente quimiotáctico para las células vasculares endoteliales.

Factor de crecimiento vasculo endotelial (VEGF)

- Induce la quimiotaxis y la proliferación de las células endoteliales

- Provoca una hiperpermeabilidad de los vasos sanguíneos
- Mitógeno, proapoptótico, promotor de la quimiotaxis y la diferenciación de las células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos

Factor	Fuente	Blanco	Acción
TGF β	Todas las células	Todas las células	Fibrosis Fibrosis
TGF α	Plaquetas Queratinocitos Macrófagos	Cel. epiteliales Fibroblastos Cel. endoteliales	Proliferación
PDGF	Plaqueta Macrófagos Fibroblastos Endoteliales Músculo liso	Neutrófilo Macrófagos Fibroblastos Músculo liso	Quimiotaxis Proliferación Síntesis de colagenasa
FGF	Macrófagos Fibroblastos Endoteliales	Endoteliales Epiteliales Fibroblastos Condroblastos	Proliferación Quimiotaxis Angiogénesis
EGF	Plaquetas Macrófagos Queratinocitos	Epiteliales Endoteliales Fibroblastos	Proliferación Quimiotaxis
IGF-I/Sm-c	Fibroblastos	Fibroblastos Endoteliales	Mitosis Síntesis de colágeno
IL-1 Quimiotaxis	Macrófagos	Fibroblastos Neutrófilos	Proliferación Síntesis de colagenasa
Abreviaturas: TGF β , factor de crecimiento transformador β ; TGF α , factor de crecimiento transformador- α ; PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; FGF, factor de crecimiento epidérmico; IGF-I/Smc, factor de crecimiento similar a la insulina-I/Somatomedina-C; IL-1, interleukina-1.			

El Plasma Rico en Plaquetas

El plasma rico en plaquetas (PRP) se podría definir como volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/ μ L), es decir, corresponde a una fracción del plasma centrifugado con concentraciones de plaquetas hasta 5 veces superiores a las normales.

El PRP debe su interés terapéutico al papel instrumental decisivo de las plaquetas en el proceso de curación y reparación de una herida tisular. Se distinguen 3 fases: inflamación, proliferación y remodelado, en las que intervienen todos los Factores de Crecimiento (FC) contenidos en el PRP. Las plaquetas juegan un papel importante al funcionar como vehículo portador de FC y de otras proteínas contenidas en sus gránulos alfa. Estas sustancias, serán concentradas y depositadas en el lugar de la herida, exponiendo y orientando un concentrado fisiológico de proteínas que va a intervenir acelerando y favoreciendo el proceso de reparación y regeneración.

Técnica de obtención

El PRP se puede obtener mediante kits desechables con “técnica cerrada” o de forma manual mediante “técnica semiabierta” al vacío.

Anticoagulantes:

Los tubos deben estar aditivados con un anticoagulante inocuo y reversible. Se utilizan anticoagulantes citratados, que actúan como quelantes de calcio impidiendo la iniciación de la cascada de coagulación y cuyo efecto es revertido por el agregado de calcio exógeno. El anticoagulante recomendado para estos protocolos es el ácido-citrato-dextrosa (ACD), aprobado para fines transfusionales y disponible en la mayoría de los equipos comerciales diseñados para este fin. También está aceptado el uso de citrato trisódico o citrato-fosfato- dextrosa. Por el contrario, el EDTA está contraindicado ya que su efecto no es reversible por el agregado de calcio, altera la membrana plaquetaria y puede generar daño en los tejidos. Existe una excepción al empleo de anticoagulante. Como se explica más adelante, la sangre es extraída sin anticoagulante en el protocolo de preparación de L-PRF, un tipo de PRP enriquecido en fibrina y en componentes leucocitarios.

Básicamente y aunque con pequeñas variaciones, los pasos serían los siguientes: extraer la sangre del paciente y disponerla en tubos aditivados y aptos para introducir en una centrifugadora concreta; la sangre debe centrifugarse inmediatamente tras la extracción y sin haber sido refrigerada; equilibrar la centrífuga y hacer girar la sangre estableciendo los parámetros (velocidad y tiempo) según lo propuesto por el fabricante; extraer las fracciones adecuadas según lo indicado y, por último, extracción de PRP. Toda la manipulación de los dispositivos hay que realizarla asépticamente, siguiendo los protocolos de operación aséptica de cada centro de trabajo, para minimizar las posibilidades de contaminar las fracciones de plasma obtenidas. Es necesaria la utilidad de una cabina de flujo laminar adecuada en los procesos de fraccionamiento y activación, que disminuye el riesgo de contaminación microbiológica. Con respecto a los residuos, éstos deben desecharse siguiendo las directivas generales sobre higiene y la normativa legal que regula la eliminación apropiada de material infeccioso.

Centrifugación

PRP se puede fabricar en 2 formatos básicos: preparaciones solo de plasma y plasma con buffy-coat. Ambos comienzan con sangre entera, pero difieren en el proceso de centrifugación, que aísla y concentra diferentes componentes de células sanguíneas. Los métodos basados en plasma trabajan para aislar sólo las plaquetas y eliminar los glóbulos blancos. Los protocolos para estas preparaciones dejan algunas plaquetas y se centran en la exclusión intencional de los leucocitos, que se cree que son perjudiciales para el proceso de cicatrización. El objetivo principal de este método es capturar sólo plaquetas durante la centrifugación; Por lo que se utiliza un régimen de centrifugación más lento y más corto. Esto produce concentraciones de plaquetas típicamente alrededor de 2 a 3 veces los niveles basales de sangre entera (300.000 a 500.000 plaquetas), Los métodos basados en la Buffy coat aíslan una capa de plasma pobre en plaquetas y una capa de capa blanca, que contiene tanto leucocitos como eritrocitos. Los protocolos para los sistemas de capa blanca buscan capturar todas las plaquetas disponibles durante la centrifugación y una concentración bastante alta de glóbulos blancos; Con lo que se utilizan tasas de giro altas y regímenes de giro largos. Los leucocitos y los RBC se consiguen en un

esfuerzo para obtener los niveles de concentración plaquetaria más altos posibles. Los rendimientos típicos de concentración de plaquetas están entre 3 Y 8 veces los de los niveles basales (500.000 a 1.500.000 plaquetas)

ABLE 1. Plasma-Based and Buffy Coat–Based PRP Systems

Device Name	Centrifuge Time (min)	Initial Blood Volume (mL)	Final PRP Volume (mL)	Platelet Concentration From Baseline	WBC Content
Plasma-based PRP systems					
Arthrex (Naples, FL)/ ACP	5	16	4-7	2x-3x	Minimal to none
Cascade/MTF Fibrinet	6 (plasma)	9	4.5 (plasma)	1.3x-1.7x (plasma)	Minimal to none
BTI (Vitoria-Gasteiz, Spain)					
PRGF	8	9	2-3	2x-3x	Minimal to none
Buffy coat–based PRP systems					
Biomet (Warsaw, IN)	12-15	30 or 60	3 or 6	2x-8x	Increased over baseline
GPS II/ 2					
Harvest (Plymouth, MA)					
SmartPRP 2/DePuy	12-15	20 or 60	3 or 7-10	3x-7x	Increased over baseline
(Warsaw, IN) Symphony II					
Arteriocyte Medtronic	14-20	30 or 60	3-10	3x-7x	Increased over baseline
(Minneapolis, MN)/Magellan					
Emcyte (Fort Myers, FL)/					
Genesis CS/Exactech	12	30 or 60	3 or 10	7x-10x	Increased over
baseline (Gainesville, FL) Accelerate					

Cuando se centrifuga la sangre anticoagulada se forman 3 capas en función de la densidad: la capa inferior (densidad 1,09), compuesta por glóbulos rojos; la capa media (densidad 1,06), compuesta por glóbulos blancos y plaquetas y una capa superior (densidad 1,03), compuesta por plasma. La fase plasmática, a su vez puede subdividirse en 3 fracciones en función de la cantidad de plaquetas presentes, que de superior a inferior son: una fracción pobre en plaquetas, la fracción intermedia con una concentración media de plaquetas y la fracción rica plaquetaria.

La centrifugación es el procedimiento básico para obtener PRP, con un rendimiento apropiado del 10% sobre la sangre extraída. Debe evitarse la fragmentación de las plaquetas durante el proceso, ya que a consecuencia de ella se produciría su activación precoz, y con ello algunas proteínas secretoras adquirirán su estructura terciaria definitiva bioactiva. La liberación indebida por fragmentación de altos niveles de proteínas podría comprometer la bioactividad de las mismas. Puede mantenerse la integridad de las membranas usando como anticoagulante citrato ácido dextrosa (el citrato secuestra el calcio y bloquea la cascada de la coagulación y la dextrosa proporciona nutrientes que hacen viables a las plaquetas), y velocidades de centrifugación lentas (son parámetros estándar de centrifugado: 1.400 RPM durante 7 minutos).

Clasificación del PRP

A partir del año 2009 se ha clasificado a los derivados de PRP en cuatro grupos en función de su contenido: P-PRP (puro en plaquetas y pobre en leucocitos), L-PRP (rico en plaquetas y leucocitos), P-PRF (rico en plaquetas y fibrina) y L-PRF (rico en plaquetas, leucocitos y fibrina). En el año 2012 se agregó el término “gel” para subclasificar al P-PRP y L-PRP como activado o no activado con CaCl₂ y/o trombina.

	P-PRP (puro en plaquetas)	L-PRP	P-PRF	L-PRF
PLAQUETAS	RICO	RICO	RICO	RICO
LEUCOCITOS	POBRE	RICO	POBRE	RICO
FIBRINA	POBRE	POBRE	RICO	RICO
MANIPULACIÓN DE SANGRE	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP + Buffy coat.	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP	1) Extracción de sangre sin anticoagulante.
ACTIVACIÓN	Activación con CaCl ₂ y/o trombina. Se denomina "gel" una vez activad	Activación con CaCl ₂ y/o trombina. Se denomina "gel" una vez activad	1) Activación con CaCl ₂ y/o trombina durante centrifugación. 2) Compresión de malla de fibrina.	Se activa por ausencia de anticoagulante. Se centrifuga inmediatamente luego de la extracción de sangre. 2) Compresión de malla de fibrina
CONSISTENCIA	Gelifica luego de activación. Se utiliza el gel o el exudado líquido	Gelifica luego de activación. Se utiliza el gel o el exudado líquido	Sólido	Sólido
APLICACIÓN	Muy versátil debido a su consistencia. Aplicación superficial y/o inyectable.	Muy versátil debido a su consistencia. Aplicación superficial y/o inyectable	Poco versátil debido a su consistencia sólida. Se utiliza para rellenar luego de cirugías (oral, maxilofacial, plástica	Poco versátil debido a su consistencia sólida. Se utiliza para rellenar luego de cirugías (oral, maxilofacial, plástica

El efecto de los glóbulos blancos altamente concentrados contenidos en los preparados de PRP ha sido muy debatido. Los sistemas de PRP que usan una capa blanda contienen una concentración aumentada de glóbulos blancos por encima de los niveles basales, mientras que los métodos plasmáticos no. Aunque los niveles normales de glóbulos blancos tienen un efecto inmunomodulador positivo, los niveles elevados en algunas preparaciones de PRP pueden tener un impacto deletéreo. La literatura sugiere que los leucocitos excesivos, específicamente los neutrófilos, pueden estar contribuyendo a estos resultados no deseados. Sin embargo, la eficacia de los glóbulos blancos en los tratamientos PRP sigue siendo poco clara y puede depender de la indicación. El PRP utilizado para tratar las heridas abiertas y prevenir la infección puede requerir niveles supranormales de glóbulos blancos, mientras que el PRP utilizado para minimizar la formación de cicatrices no debe contener glóbulos blancos.

Activación:

La adición de factores externos de coagulación al PRP puede no afectar activamente a las plaquetas. No sólo el colágeno tisular causará la activación de las plaquetas, sino que la simple agitación de las plaquetas, tal como la centrifugación, así como el sangrado inducido por la aguja durante la inyección de PRP, pueden proporcionar los factores de coagulación endógenos apropiados necesarios para la activación. La activación endógena tiene el potencial de una agregación más lenta de plaquetas y liberación de factores de crecimiento permitiendo que el colágeno dentro del tejido funcione como el activador proporcionando un patrón de liberación natural. La formación de coágulos que se produce después de la inyección proporciona el beneficio de administración a través de una aguja y permite un suministro más preciso al tejido objetivo y dentro del mismo.

Activadores de plaquetas

Trombina: La trombina provoca una rápida agregación de plaquetas. La activación rápida puede conducir a una excesiva condensación de la matriz de la fibrina y retracción significativa de los coágulos, que pueden ser inferiores con respecto a la migración celular y el enriquecimiento del factor de crecimiento cuando se compara con una activación fisiológica menos condensada. Una activación rápida también puede conducir a una disminución en la cantidad total de factores de crecimiento disponibles en el sitio del tejido a lo largo del tiempo. Algunos factores de crecimiento tienen una vida útil corta (minutos a horas) y se degradarán antes de que otros receptores de tejido estén disponibles si no se usan inmediatamente después de la liberación de la plaqueta.

Cloruro de calcio: El cloruro de calcio se ha añadido exógenamente a la preparación de PRP en lugar de la trombina bovina puede resultar en la formación de una matriz de fibrina menos condensada. La matriz de fibrina puede proporcionar un mecanismo de trampa para las plaquetas, resultando en una menor formación de trombina de forma endógena, lo que permite una liberación más lenta de factores de crecimiento durante un período de 7 días, lo que puede mejorar la migración celular y la cicatrización. Las inyecciones que contienen Cloruro de calcio tienen un pH bajo y causan dolor significativo y una sensación de ardor al paciente.

Colágeno Tipo I: Se ha encontrado que el colágeno endógeno de tipo I es igualmente eficaz como la trombina en la activación de plaquetas y estimula la liberación de factores de crecimiento. En un estudio in vitro de PRP de donantes humanos, se realizó coagulación con colágeno tipo I o trombina bovina. El colágeno tipo I resultó en una liberación similar de PDGF y VEGF, pero una liberación más extensa y globalmente mayor de TGF que la trombina. Los coágulos formados por el uso de colágeno tipo I también mostraron retracción mucho menor que los formados con trombina bovina.

Además, tanto el colágeno tipo I como la trombina bovina estimularon una liberación similar de PDGF y VEGF entre los días 1 y 10, Mientras que la trombina daba lugar a una liberación agresiva de TGF durante los días 1 a 5.

Activación del PRP

Una vez obtenido el plasma debe ser activado. El método más habitual de activación es a través de la adición de cloruro de calcio o gluconato de calcio al 10% restituyendo los niveles del catión plasmático que fueron quelados por el anticoagulante y permitiendo la generación de trombina.

Cuando el PRP se destina a tratar lesiones de partes blandas, no se considera necesaria la activación previa, debido a que esta se produce in situ al contacto con el colágeno de la matriz o con el propio coágulo de la rotura fibrilar. Cuando el PRP se utiliza para facilitar osteointegración de implantes o cuando se usa para el tratamiento de la osteoartritis suele preferirse cierta activación (con trombina o cloruro cálcico) que, además, le confiere una consistencia gelatinosa que facilita su uso quirúrgico.

Algunos protocolos han considerado el agregado de trombina de manera individual o combinada con las soluciones de CaCl_2 . La administración de trombina bovina se ha asociado al desarrollo de autoanticuerpos contra factores de la coagulación (factores V y XII), motivo por el cual se recomienda utilizar únicamente trombina de origen autólogo.

Durante muchos años los médicos han estado utilizando la foto activación de productos sanguíneos, in vitro e in vivo, con varias frecuencias de luz para la inmunomodulación en pacientes. Cuando los glóbulos blancos (WBC) de la sangre periférica son foto activados bajo AdiLight-2 durante 10 minutos, se inhiben las citoquinas pro-inflamatorias (IL1, IL2, IL6 y TNF α) y se inducen citoquinas anti-inflamatorias (IL1RA e IL10) como la liberación de beta endorfinas. Esta es una respuesta altamente deseada cuando se consideran las condiciones fisiopatológicas que resultan de estados inflamatorios crónicos e irritación. Una exposición de 10 minutos de glóbulos blancos y plaquetas, a AdiLight-2 antes de la inyección, disminuye significativamente el dolor, así como potencia y acelera los potenciales de curación del PRP.

Table IV. Growth Factor and Cytokine levels in PRP and Treated PRP samples

Sample	Donor	PDGF ng/mL	TGF- β 1 ng/mL	SDF-1 α pg/mL	VEGF pg/mL	IL-1 β pg/mL	IL-1ra pg/mL	sIL- 2Ra pg/mL	IL-8 pg/mL	IL-10 pg/mL	TNF- α pg/mL
Non-Treated Clarified Supernatant	KP27775	41			343	1	39.1	10.4	12.1	5.1	0.8
Treated Clarified Supernatant	KP27775	83			447	0.6	72.4	72.4	13.9	7.3	2.0

Obtención de fibrina enriquecida con factores de crecimiento



Figura 1. Coágulo de FRP obtenido después de la centrifugación (7).



Figura 2. La caja de FRP que se utiliza para crear membranas. A: El coágulo se coloca en la parrilla. B: Se cubre con la tapa y en un minuto se obtiene una membrana de FRP, el exudado de suero se acumula en la parte inferior de la caja, debajo de la rejilla (1).

Para obtener una membrana o coágulo de FRP, la sangre se introduce en tubos de ensayo de 10 ml sin anticoagulante y se centrifuga inmediatamente, durante 16 minutos a 280 G (fuerza gravitacional del centrifugado). Es por ello que se requiere una centrifugadora adecuada.

A los pocos minutos, la ausencia de anticoagulante permite la activación de la mayoría de plaquetas contenidas en la muestra para desencadenar la cascada de coagulación. El fibrinógeno se concentra al principio en la parte superior del tubo, hasta que el efecto de la circulación de la trombina se transforma en una red de fibrina. El resultado es un coágulo de fibrina que contiene plaquetas situadas en la mitad del tubo, justo entre la capa de glóbulos rojos en la parte inferior y el plasma acelular en la parte superior. Este coágulo se retira del tubo y las células rojas de la sangre se desechan. El coágulo se coloca en la caja de FRP y se cubre con el compresor y la tapa. Esto produce una membrana de fibrina autóloga de bajo costo en aproximadamente un minuto. El

exudado recogido en la parte inferior de la caja puede ser utilizado para hidratar materiales de injerto. El coágulo de fibrina tiene una consistencia tal, que casi permite ser suturado. Para la obtención de fibrina podemos, obviamente, utilizar el PRGF, resultando una malla de gran volumen, pero también podemos utilizar las fracciones menos concentradas, con las que se obtienen, sí, volúmenes menores. Por ello, se deben conservar todas las fracciones de plasma obtenidas.

Fibrina Rica en factores de Crecimiento inyectable

La sangre se introduce en tubos de ensayo de 10 ml sin anticoagulante y se centrifuga inmediatamente, durante 10 minutos a 280 G (fuerza gravitacional del centrifugado). Se toma todo el suero sobrenadante sin leucocitos y se inyecta o se utiliza para embeber otros materiales.

Seguridad de la aplicación de plasma rico en plaquetas

Dada su naturaleza autóloga el PRP es un producto seguro, que carece por definición del riesgo potencial de transmisión de enfermedades implícito en el uso de material sanguíneo de donantes. Los sistemas que emplean trombina bovina como activador están desapareciendo para evitar el desarrollo de coagulopatías o hipersensibilidad secundarias. Con respecto al potencial oncogénico del PRP que han sugerido algunos autores, no hay evidencia disponible que lo apoye. Los factores de crecimiento, tras su unión a receptores de membrana, activan cascadas de señalización intracelular que promueven una expresión génica normal, regulada por diferentes mecanismos de control. Además, hasta el momento actual no se ha demostrado un efecto sistémico de los factores de crecimiento liberados tras la aplicación local de PRP.

Métodos de Obtención de los distintos PRP

Método de obtención del P-PRP

1. Extraer 4 a 6 tubos de 3,5 citratados de sangre periférica
2. Colocar en la centrífuga 7 minutos a 1.1 G
3. Extraer los dos tercios superiores de plasma y desecharlo
4. Aspirar el tercio inferior sin el Buffycoat
5. Colocar en fotoestimulador durante 10 minutos. Opcional

Método de obtención del L-PRP

1. Extraer 4 a 6 tubos de 3,5 citratados de sangre periférica
2. Colocar en la centrífuga 7 minutos a 1.1 G
3. Extraer los dos tercios superiores de plasma y desecharlo
4. Aspirar el tercio inferior junto con el Buffy coat
5. Opcional la activación con Ca de acuerdo al sitio de infiltración (0.05 de cloruro de calcio por cada 1 ml de plasma obtenido)
6. Colocar en fotoestimulador durante 10 minutos. Opcional
7. Infiltrar articulaciones, tendón, ligamento o músculo según técnica convencional.

Protocolo para PPP gel viscosuplementación

1. Extraer 4 a 6 tubos de 3,5 citratados de sangre periférica
2. Colocar en la centrífuga 7 minutos a 1.1 G
3. Extraer los dos tercios superiores en jeringas de 3Cc
4. Colocar en el matriz gel filler a 87 ° por 10 minutos. enfriar

A FRFC (Fibrina Rica en Plaquetas)

1. Extraer sangre NO anticoagulada
2. Colocar en tubo seco
3. Inmediatamente centrifugar a 2.8 G por 16 minutos
4. Extraer coágulo de fibrina
5. Prensar 4 minutos
6. La membrana puede ser utilizada así o fraccionarla con tijera y partes muy pequeñas embeberlas en fibrina inyectable y realizar una pasta para rellenar.

I FRFC (Fibrina Inyectable)

1. Extraer sangre NO anticoagulada
2. Colocar en tubo seco
3. Inmediatamente centrifugar a 2.8 G por 10 minutos
4. Extraer todo el plasma
5. Inyectar

Plasma rico en factores de Crecimiento

1. Extraer 60 cc de sangre anticoagulada (citrato de sodio)
2. Centrifugar a 1.1 G por 7 minutos
3. Aspirar el 1/3 inferior de cada tubo
4. Colocar 0,05 cc de cloruro de calcio por cada 1 ml de plasma
5. Fotoactivador por 10 minutos
6. Esperar la retracción total del coágulo
7. Infundir por vía ev mediante guía de suero con filtro para transfusión, previa infusión de 200 mg de hidrocortisona. Infiltración local.

Contraindicaciones

- Coagulopatías,
- Infecciones locales o sistémicas,
- Embarazo,
- Pacientes que están tomando en ese momento anticoagulantes o antiinflamatorios no esteroideos,
- Déficit inmunológico,
- Enfermedades crónicas descompensadas como la diabetes mellitus.