

Artículo original

Plasma rico en plaquetas: estudio comparativo de cuatro protocolos para su obtención

Gibrán Pérez-Montesinos,* Armando Medina-Bojórquez,* Heidi Hernández-Ramírez,* Martha Alejandra Morales-Sánchez,* María Luisa Peralta-Pedrero,* Fermín Jurado-Santa Cruz*

RESUMEN

En la búsqueda de la regeneración tisular, la ingeniería de tejidos ha iniciado el empleo de factores de crecimiento para su inducción, por lo cual en épocas recientes se ha disseminado el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) con el objetivo de aprovechar los factores estimulantes contenidos en sus gránulos; sin embargo, para su obtención se han utilizado diversos sistemas no estandarizados. El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia de cuatro protocolos de centrifugación para la obtención de PRP. En una primera fase se probaron ocho protocolos descritos en la literatura en un sistema de centrifugación estándar de laboratorio, de los que se seleccionaron los cuatro con mayor conteo plaquetario, siendo probados nuevamente en 30 pacientes mediante un hemograma basal. El mayor número de plaquetas se consiguió con el protocolo de una sola centrifugación a 100 g durante ocho minutos ($p < 0.001$, IC 95%), el menor conteo leucocitario correspondió al protocolo de dos centrifugaciones a 400 g por 10 minutos cada una, disminuyendo dicha pureza al bajar el valor de la fuerza centrífuga relativa. El menor conteo celular fue resultado del protocolo con centrifugación de menor duración. Los resultados contrastan visiblemente con las cifras reportadas con protocolos similares y sistemas de obtención comerciales, lo que es un reflejo de la necesidad de estudios con mayor nivel de evidencia que logren estandarizar esta técnica.

Palabras clave: Plasma rico en plaquetas, centrifugación, protocolo de obtención.

ABSTRACT

In the search for tissue regeneration, tissue engineering has introduced the use of growth factors. In recent times the use of platelet rich plasma (PRP) has started to take advantage of the factors contained in their granules. However, there are various systems to obtain them non-standardized. The aim of the present study was to compare the efficacy of 4 centrifugation protocols to obtain PRP. In a first phase 8 protocols described previously in the literature were tested in a standard laboratory centrifuge system. The 4 protocols with the highest platelet count were selected, being tested again in 30 patients with a baseline blood count. The highest number of platelets were obtained with the protocol of 1 single centrifugation at 100 g for 8 minutes ($p < 0.001$, 95% CI), the lowest leucocyte count corresponded to the protocol of 2 centrifugations at 400 g for 10 minutes each. The purity decreased by lowering the value of the relative centrifugal force. The lowest cell count was obtained with the protocol with shorter centrifugation. The results obtained differ significantly with the figures reported with similar protocols and commercial procurement systems. Studies with a higher level of evidence are needed to standardize this technique.

Key words: Platelet rich plasma, centrifugation, protocol of obtaining.

www.medigraphic.org.mx

INTRODUCCIÓN

La búsqueda actual de la regeneración tisular por medio de la ingeniería de tejidos ha conducido al uso de factores de crecimiento para su inducción mediante el estímulo de migración, diferenciación y división celular. Si bien, desde mediados del siglo XX se galardonó con el premio Nobel a los doctores Levi y Cohen por el descubrimiento de los primeros factores de crecimiento en 1948 y 1952,

* Centro Dermatológico «Dr. Ladislao de la Pascua», Secretaría de Salud de la Ciudad de México.

respectivamente; fue hasta finales de los años 80 cuando se emplearon como adhesivo de fibrina en plastias y una década después en la regeneración tisular.¹

La función principal de las plaquetas es la hemostasia primaria mediante el proceso de agregación, durante el cual secretan las proteínas contenidas en sus gránulos (trifosfato de adenosina, factor plaquetario 4, calcio, serotonina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, tromboxano A2, factor V, fibrinógeno). El calcio es un cofactor necesario para su activación, pues regula la reparación tisular.²

Por lo anterior, en los últimos años ha proliferado el uso de plasma rico en plaquetas (PRP), es decir plasma con una concentración mayor que la encontrada en la sangre periférica (aceptado como aumento mínimo de 200 a 300% con reportes hasta de 1 millón). Se han utilizado diversos sistemas para su obtención, los cuales varían en tiempo y número de revoluciones, pocos de ellos sustentados en estudios de investigación y sin un protocolo establecido de elección para este proceso.^{3,4}

Debido a la falta de estandarización metodológica para la obtención de PRP, continúan las interrogantes sobre cuál método brinda el plasma rico en plaquetas con mayor cantidad de éstas, así como cuál de ellos da mejor resultado en cuanto a efecto clínico.⁵⁻⁷

Los autores que publicaron los primeros estudios respecto al método de preparación del PRP describieron una técnica basada en dos pasos, el primero llamado giro fuerte o de separación que consiste en altas velocidades de centrifugación para separar los hematíes del resto de la sangre, el segundo denominado giro suave o de concentración se lleva a cabo con la mitad de la velocidad previa, este paso sería el responsable de separar las plaquetas del resto del plasma.⁸⁻¹⁰

Dichos estudios indican que una sola centrifugación produciría un plasma con poca cantidad de plaquetas y que su realización en una centrifugadora de laboratorio convencional no produciría un rendimiento suficiente y podría lesionar la estructura plaquetaria debido a su diseño original con fines diagnósticos.⁸⁻¹²

Objetivo

Comparar la eficacia de cuatro protocolos de centrifugación para la obtención de plasma rico en plaquetas, en términos de la cantidad de plaquetas obtenidas por mililitro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura en Medline vía PubMed con los siguientes términos MeSH: *platelet-rich plasma* y *centrifugation*. De esta búsqueda

sistemática se seleccionaron y analizaron los ocho protocolos de centrifugación más utilizados para la obtención de plasma rico en plaquetas y su aplicación en piel. El protocolo fue aprobado por los comités de investigación y de ética en investigación institucional con el consentimiento informado de cada uno de los participantes.

En la primera fase del estudio, se obtuvieron cinco muestras de sangre de cuatro voluntarios sanos, una de las cuales se analizó sin centrifugar. El resto de las muestras se sometió a ocho protocolos diferentes de obtención de PRP, mismos que se describen en el **cuadro I**, utilizando una centrifugadora marca Sigma Chemicals 3-16 PK.

Se seleccionaron los cuatro protocolos de los que se obtuvo mayor número porcentual de plaquetas, según la cifra de la muestra basal, y que se utilizaron para realizar la segunda fase del estudio; en ésta se tomaron cinco muestras de 30 pacientes sanos, 15 hombres y 15 mujeres, entre 18 y 35 años de edad, sometiéndose cuatro de ellas a los cuatro protocolos de centrifugado seleccionados en la fase inicial del estudio y la última muestra se procesó como hemograma (**Cuadro II**).

CUADRO I. PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

Núm.	Primera centrifugación	Segunda Centrifugación
1	200 g por 8 min	200 g por 8 min
2	1,750 g por 12 min	NA
3	100 g por 8 min	NA
4	620 g por 5 min	NA
5	1,730 g por 3 min	NA
6	100 g por 12 min	NA
7	200 g por 10 min	400 g por 10 min
8	400 g por 10 min	400 g por 10 min

g = fuerza centrífuga relativa.

CUADRO II. PROTOCOLOS SELECCIONADOS PARA SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO.

Protocolo	Primera centrifugación	Segunda centrifugación
1	100 g por 8 min	
2	400 g por 10 min	400 g por 10 min
3	620 g por 5 min	
4	1,730 g por 3 min	

g = fuerza centrífuga relativa.

RESULTADOS

El mayor número de plaquetas obtenido equivalente a 212% respecto al conteo basal de plaquetas por citometría se consiguió a través del protocolo número 1 (**Cuadros II y III**), seguido de 196% obtenido con el protocolo número 3, detectando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos de $p < 0.001$ con el análisis de la prueba t de Student para medias relacionadas con nivel de confianza de 95% (**Cuadro III**). Asimismo, se observa que el protocolo 2 con menor conteo leucocitario fue el único con doble centrifugación, seguido del protocolo 4 con centrifugación simple a mayor velocidad que el resto de los protocolos.

El menor conteo celular alcanzado fue de 158,000 plaquetas correspondiente a 73% del basal con el protocolo número 4, seguido del número 2, con el cual se obtuvo en un paciente el mayor recuento plaquetario de todos los protocolos con 1,639,000 plaquetas que correspondió a 496% de su conteo inicial.

DISCUSIÓN

Algunos investigadores han sugerido que el PRP debería alcanzar una concentración en plaquetas de tres a

CUADRO III. CONTEO CELULAR OBTENIDO CON LOS PROTOCOLOS DE CENTRIFUGACIÓN.

Protocolo	Media plaquetaria según valor basal %	Media volumen μL	Leucocitos %
1	212.39	510.80	21.4
2	160.68	550	11.84
3	196.27	572.41	18.92
4	158.27	655.16	14.7

CUADRO IV. CLASIFICACIÓN DEPA DE PREPARADOS DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS.

Característica	N. de plaquetas en billones	Eficiencia de producción %	Pureza %
A - Muy alto	> 5	> 90	> 90
B - Alto	3-5	70-90	70-90
C - Medio	1-3	30-70	30-70
D - Bajo	< 1	< 30	< 30

cinco veces superior al nivel normal, aunque la relación entre este número y el beneficio clínico obtenido es uno de los parámetros que permanecen pendientes de determinar con exactitud. Se han publicado conteos celulares que van desde menos de dos hasta 8.5 veces el nivel normal e incluso, que cada individuo necesita una concentración diferente de plaquetas para lograr un mismo beneficio clínico. Según estudios previos, los niveles más altos de recolección plaquetaria se han logrado con dispositivos especiales de preparación de PRP para su uso comercial, valores que no se han alcanzado con las centrifugadoras utilizadas en laboratorio, según confirman los resultados de este estudio.^{1,3,13-15}

Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que se ha medido la cantidad de factores de crecimiento y citocinas contenidos en el PRP con diversas concentraciones celulares cuyo número no es directamente proporcional a su cantidad, por el contrario ante su bajo y alto conteo se ven disminuidas. Asimismo, se ha mencionado que altas velocidades de centrifugación producen daños en la membrana celular plaquetaria, por lo que se recomendarían niveles bajos, en un artículo se propone el estándar de 1,400 rpm por siete minutos, lo que se contrapone con lo sugerido por otros autores que afirman que las velocidades lentes y la centrifugación simple producirían PRP con baja pureza, como en nuestro estudio, por lo que se sugiere debe tomarse en consideración, ya que podría ocasionar efectos dañinos en los tejidos debido a la mayor cantidad de radicales libres que podrían ser liberados por los glóbulos rojos, así como por una posible respuesta inmunológica secundaria a mayor cantidad de leucocitos.⁸⁻¹²

No obstante, hasta la fecha, debido a la falta de estudios de investigación en este campo, se desconoce si las diferencias significativas de composición del PRP observadas entre los diferentes sistemas de preparación modifican el efecto clínico de su aplicación.

Respecto a la propuesta de clasificación DEPA para la estandarización del PRP que toma en cuenta tres aspectos: conteo plaquetario, eficiencia de producción (porcentaje de plaquetas obtenido respecto al basal) y pureza (porcentaje de plaquetas respecto a otros tipos celulares recolectados) (**Cuadro IV**) y según la cual a la mayoría de los estudios publicados se les han asignado calificaciones D y C en casi todos los aspectos. Nuestros protocolos con base en los resultados se calificaron como DDA, lo que se correlaciona con lo publicado en la literatura hasta el momento, aunque dos aspectos de la clasificación se basan en el número plaquetario obtenido, del que,

como se ha mencionado, aún no se cuenta con un consenso sobre los parámetros ideales necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado.¹⁰

CONCLUSIONES

En el presente estudio hemos constatado que los protocolos de obtención de plasma rico en plaquetas por centrifugación simple con sistemas de centrifugación estándar de laboratorio, a bajas velocidades y por cortos períodos (100 g por ocho minutos) resultan en preparados con el mínimo de plaquetas requerido para considerarse PRP, con un alto nivel de pureza celular. Lo que contrasta de forma considerable con las cifras plaquetarias reportadas en la literatura con protocolos similares de obtención de PRP y fundamentalmente con los sistemas comerciales de su preparación.

Lo anterior es un reflejo de la falta de estandarización en la técnica de obtención de PRP y la ausencia de correlación entre los estudios reportados, lo que puede resultar en las variaciones observadas de la eficacia clínica del uso de PRP, confirmando la necesidad de realizar estudios más rigurosos, con mayor tamaño de muestra y medición cuantitativa del efecto clínico con períodos de seguimiento que hagan posible contar con un protocolo establecido.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fitzpatrick J, Bulsara MK, McCrory PR, Richardson MD, Zheng MH. Analysis of platelet-rich plasma extraction: variations in platelet and blood components between 4 common commercial kits. *Orthop J Sports Med.* 2017; 5: 2325967116675272. doi:10.1177/2325967116675272.
2. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. *In vitro* immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int J Implant Dent.* 2015; 1: 31. doi:10.1186/s40729-015-0032-0.
3. Nagata MJ, Messora MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent.* 2010; 4: 395-402.
4. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014; 7: 189-197. doi:10.4103/0974-2077.150734.
5. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H et al. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012; 18: 176-185. doi:10.1089/ten.tec.2011.0308.
6. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronagli M, Lubenow N, Knutson F et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 2017; 57: 1058-1065. doi: 10.1111/trf.13998
7. Amable PR, Carias RB, Teixeira MV, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJ, Granjeiro JM et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4: 67. doi: 10.1186/scrt218
8. Kieb M, Sander F, Prinz C, Adam S, Mau-Möller A, Bader R et al. Platelet-rich plasma powder: a new preparation method for the standardization of growth factor concentrations. *Am J Sports Med.* 2016; 45: 954-960.
9. Degen RM, Bernard JA, Oliver KS, Dines JS. Commercial separation systems designed for preparation of platelet-rich plasma yield differences in cellular composition. *HSS J.* 2016; 1-6.
10. Magalon J, Chateau AL, Bertrand B et al. DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2016; 2: 000060. doi:10.1136/bmjsem-2015-000060
11. Oh JH, Kim W, Park KU, Roh YH et al. Comparison of the cellular composition and cytokine-release kinetics of various platelet-rich plasma preparations. *Am J Sports Med.* 2015; 43: 3062-3070.
12. Kesy L, Kopczyński P, Baszczuk A, Kopczyński Z. *Pol Merkur Lekarski.* Methods of preparation of the platelet-rich plasma used in medicine as an accelerator of tissue regeneration. *Pol Merkur Lekarski.* 2014; 36: 283-286.
13. Lebiedziński R, Borowski A, Synder M, Grzegorzewski A, Marciniak M, Sibiński M. Comparison analysis of autologous conditioned plasma. *Ortop Traumatol Rehabil.* 2016; 18: 563-568.
14. Dohan DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang BS et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2017; 1: 1-14. doi: 10.1080/09537104.2017.1293812
15. Monteiro MR. Platelet-rich plasma in dermatology. *Surg Cosmet Dermatol.* 2013; 5: 155-159.

Correspondencia:
Gibrán Pérez-Montesinos
José María Vértiz Núm. 464,
Col. Buenos Aires,
Del. Cuauhtémoc, 06780, Ciudad de México.
Tel: 55387033, ext. 312
Correo electrónico: branpm1@gmail.com