

# Bases biológicas para la utilización del Plasma Rico en Plaquetas, PRP

Isabel Andia, Dra en Ciencias Químicas

1

## INDICE

1. Introducción
2. Medicina Regenerativa
3. Una fotografía de los mecanismos de reparación tisular
  - a. Respuesta inflamatoria inicial
  - b. Fase trófica
    - i. Proliferación celular y migración
    - ii. Angiogénesis
    - iii. Síntesis de Matriz Extracelular
  - c. Remodelación tisular y tejido cicatricial
4. Plaquetas: contribución molecular a la Reparación Tisular
  - a. Biología de las plaquetas
  - b. Función plaquetaria
5. Biotecnología PRP: nuevas herramientas para la reparación tisular
  - a. La historia: una perspectiva de tres décadas
  - b. Terminología
  - c. Preparación del PRP
  - d. Clasificación de los distintos tipos de PRP
6. Marco Regulatorio

## 1. Introducción

Las terapias de **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)** son un tema susceptible a las críticas y muy controvertido en varias áreas de la medicina, particularmente en Traumatología y Medicina del Deporte y también en dermoestética. Desde las primeras aplicaciones de PRP en heridas crónicas, la utilización del PRP se ha extendido con el fin de solucionar problemas médicos para los que solo existen tratamientos sub-óptimos. La expansión de los PRPs ha sido posible porque son autólogos, se preparan mediante manipulación mínima, y son seguros para el paciente.

Para comprender los principios básicos que sustentan la aplicación clínica del PRP son necesarias unas nociones básicas de los mecanismos de Reparación Tisular. En este curso se exponen los principales conceptos de la **Reparación Tisular**, la **biología básica de los PRPs** y como estos PRPs pueden manipular los mecanismos biológicos de reparación y así mejorar la cicatrización y la calidad de la piel.

La utilización de los PRPs se inició en la clínica, no en el laboratorio. La rápida evolución y la expansión de las investigaciones hacen que actualmente se cuestionen muchos aspectos que se daban por ciertos, desde la definición de PRP hasta el protagonismo absoluto de los factores de crecimiento en estas preparaciones. Los últimos estudios de proteómica del secretoma plaquetario revelan que las plaquetas liberan cientos de proteínas, y que los factores de crecimiento solo representan un subgrupo de estas proteínas, que además incluyen citoquinas y quimioquinas, proteínas adhesivas y enzimas entre otros. La importancia relativa de unas proteínas con respecto a otras no se ha establecido en ninguna aplicación clínica. Por tanto, de momento parece imposible “dosificar” las terapias de plasma.

La ciencia de los PRPs se ha vuelto tan compleja que el diseño de las formulaciones óptimas para cada situación clínica requiere un análisis cuidadoso del tejido receptor. Para ser sincera, las terapias PRP no son siempre eficaces. Por qué algunos pacientes son grandes “respondedores” a estas terapias, y sin embargo otros pacientes no reciben ningún beneficio terapéutico no está claro. Por qué un mismo atleta puede ser respondedor en unas ocasiones, mientras que en otras ocasiones no experimenta variaciones en la respuesta a su mismo PRP sigue siendo un enigma; pero este hecho apunta a la **importancia del tejido receptor**. Extrapolando a la dermoestética, la eficacia del tratamiento PRP dependerá de la calidad del PRP, de un procedimiento correcto de aplicación y de las características del tejido receptor.

Es posible que ciertas formulaciones de PRP sean adecuadas en unas ocasiones pero no en otras. Y no se trata solo de la composición del PRP: el volumen y el protocolo de aplicación pueden ser más importantes que la formulación en si misma.

Diferencias interindividuales en la calidad del PRP, las condiciones en las que se encuentra el tejido receptor podrían ser la respuesta a estas variaciones. Estas diferencias sugieren que se deberían identificar los subgrupos de pacientes/patologías en las que la aplicación de PRP es eficaz. Este es uno de los retos en investigación que permitiría que las terapias fueran personalizadas y aumentaría en gran medida su eficacia.

Han empezado a surgir estudios clínicos en las distintas aplicaciones en el campo de la dermoestética y proporcionan datos acerca de la eficacia de las distintas formulaciones y protocolos. Un meta-análisis reciente sobre la eficacia del PRP en alopecia androgenética (se adjunta meta-análisis realizado por Giordano *et al.*, 2017) apunta que el PRP aumenta el número de pelo por unidad de área y el espesor. Sin embargo, el bajo número de estudios, que además son de calidad limitada, recomienda que estos resultados sean interpretados con precaución.

Circunstancias similares se dan en rejuvenecimiento facial. Existen pocos estudios científicos, pero se ha confirmado mediante histología que las microinyecciones de PRP aumentan la síntesis de colágeno (Abuaf *et al.* 2016), algo que ya se había demostrado en la investigación *in vitro* en cultivos celulares. Asimismo, se ha demostrado que la eficacia de las microinyecciones de PRP es superior a la mesoterapia con vitaminas y factores de crecimiento recombinantes (Gaudat *et al.* 2017)

La ciencia de los PRPs está en sus inicios; de momento el PRP se utiliza con un conocimiento de su mecanismo de acción muy precario, desde la perspectiva molecular y celular. Sin conocimientos precisos en cuanto a su mecanismo de acción, las preguntas en cuanto a la dosis de plaquetas/leucocitos más eficaz, el momento más apropiado para administrar el tratamiento (“timing”) y el número de inyecciones/ciclos de administración permanecen sin respuesta.

Asimismo, es importante estudiar la asociación del PRP con los tratamientos farmacológicos (minoxidil, finasteride) en el caso de la alopecia, con el láser ó la mesoterapia en el caso del rejuvenecimiento facial,

El reto de los próximos años se basa en sacar el máximo partido a la tecnología de los PRPs para conseguir buenos resultados clínicos.

## 2. Medicina Regenerativa y Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

La Medicina Regenerativa es un área multidisciplinar, dentro de la Medicina, que busca aumentar ó sustituir células ó tejidos enfermos ó dañados mediante las siguientes estrategias: 1) mejorar la capacidad de las células endógenas para modificar el tejido dañado (por ejemplo, mediante terapia génica); 2) utilizar células exógenas para reformar el tejido dañado. Los avances en Medicina Regenerativa dependerán esencialmente de nuestros conocimientos de biología celular y señalización molecular.

La comunicación de las células entre sí, se realiza mediante moléculas, pero tiene muchos niveles de complejidad que no se conocen con detalle. Parte de la complejidad se atribuye a la existencia de numerosas interacciones entre las distintas vías de señalización molecular, y a la intercomunicación entre los distintos componentes de múltiples vías de señalización.

**El cuerpo humano tiene unos 100 trillones de células**, que en condiciones de salud coordinan sus acciones mediante el intercambio de señales químicas y mantienen la homeostasia del organismo. Cada uno de los fenotipos celulares secreta proteínas de señalización que influyen en su propio comportamiento (señalización autocrina), ó en el comportamiento de otras células próximas (señalización paracrina), mediante interacciones con receptores específicos situados en la membrana celular. Actualmente, los grandes recursos de investigación están dirigidos a mejorar nuestros conocimientos de las señales intercelulares y la transducción intracelular de estas señales. **En el campo de la Medicina Regenerativa estos conocimientos ayudarán a desentrañar los misterios de la reparación tisular, y ayudarán a mejorar las estrategias terapéuticas para conseguir reparar y regenerar los tejidos.**

Para conseguir este fin debemos integrar toda la información y conocimiento derivado de la investigación básica en las nuevas terapias que permitirán una regeneración tisular más rápida y más eficaz.

En las últimas décadas han surgido las terapias del **Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**. El impacto de los hallazgos en cuanto al potencial reparador terapéutico del PRP ha estimulado el optimismo acerca del potencial de la **Medicina Regenerativa autóloga**. El surgimiento de esta tecnología PRP, ha revolucionado el campo de la Medicina Regenerativa en parte como consecuencia de las capacidades reparadoras de los factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las plaquetas.

La facilidad de implementar los protocolos de preparación y aplicación, la bioseguridad y versatilidad de esta tecnología ha estimulado la **Investigación Traslacional** y el interés tanto por parte de la comunidad médica como científica. Las terapias PRP representan uno de los mayores avances en el tratamiento de muchos problemas médicos, y actualmente es uno de los temas más candentes en Medicina Regenerativa por sus implicaciones en el futuro de nuestra salud.

Los descubrimientos y contribuciones en el área no solo han mejorado los tratamientos que han beneficiado muchos pacientes, pero también desde una perspectiva multi-molecular han abierto el campo de la ciencia PRP a explorar los mecanismos de reparación desde la perspectiva celular y molecular. Esta tecnología proporciona la oportunidad de mover el conocimiento molecular desde los libros a la práctica clínica haciendo que estos conocimientos moleculares sean relevantes en el contexto clínico, y consigue una simbiosis entre lo que hemos aprendido a través de la investigación y las aplicaciones clínicas.

En este curso proporcionaremos una visión general del **potencial del PRP en reparación tisular, aplicable a la dermoestética**. Expondremos los principios biológicos básicos de la reparación tisular y el papel de las plaquetas como reservóreaos de citoquinas y factores de crecimiento.

Es evidente que la clave de los avances futuros en la ciencia PRP y sus aplicaciones en el tratamiento de lesiones y enfermedades depende de un **mayor conocimiento de los procesos de reparación tisular**.

## Una fotografía de los mecanismos de Reparación Tisular

La forma más eficaz de mejorar la reparación tisular es entender los mecanismos normales de reparación y como están alterados en las condiciones patológicas, lo que se convierte en la **base de la intervención terapéutica**. Los mecanismos de reparación son comunes en gran parte a los distintos tejidos del organismo, y se pueden describir mediante fases temporales sucesivas, pero que se superponen. Estas fases se caracterizan en gran parte por la señalización celular de los distintos sistemas involucrados.

**La naturaleza dinámica, espacial y temporal de los mecanismos de reparación** representa un reto a la hora de identificar cuales son los mecanismos críticos en cada patología. Primero, la **hemostasia** se consigue a través de un entramado de reacciones que constituyen la cascada de la coagulación e incluyen a las plaquetas; dichos procesos impiden el sangrado y ponen en marcha una respuesta inflamatoria temprana.

### a. Respuesta inflamatoria inicial

La inflamación y los mecanismos de coagulación están íntimamente relacionados. La inflamación aguda, es un sistema complejo de defensa del organismo ante la agresión, es la primera reacción del sistema inmune innato (plaquetas, leucocitos y macrófagos) a la agresión/lesión. La exposición directa de las células al trauma físico, mecánico ó químico tiene consecuencias inmunológicas proporcionales al grado de la lesión, es decir, situación apoptótica ó necrótica de los fibroblastos locales. Consecuentemente, los mecanismos de regulación locales ajustan la magnitud de la respuesta de forma que las reacciones inflamatorias se localizan en el área de la lesión, y la cantidad, y duración de la respuesta inmune así como la infiltración de células inmunes son proporcionales al número de células apoptóticas/necróticas.

Asimismo, las células endoteliales que están implicadas activamente en los mecanismos de reparación, limitan la formación del coágulo a las áreas dañadas, y la extravasación de proteínas del torrente circulatorio. Las plaquetas y los leucocitos que se encuentran activados

en el interior de este coágulo de sangre liberan citoquinas y factores de crecimiento, y establecen la respuesta inflamatoria inicial.

Eventualmente, hay cambios temporales y espaciales en cuanto a la migración de los distintos tipos de leucocitos que atraviesan el endotelio. Los neutrófilos circulantes son capturados por selectinas que se presentan en la membrana de las células endoteliales; se produce un aumento en la permeabilidad vascular, y una extravasación de células inflamatorias que invaden la zona lesionada en respuesta a ciertas señales químicas. La vida media de los neutrófilos en la zona lesionada es de unas 48h durante las cuales detectan señales del entorno, y responden fabricando y secretando citoquinas. Además los neutrófilos liberan enzimas y sustancias almacenadas en sus gránulos que incluyen radicales libres, péptidos catiónicos ó proteasas. El papel clave de los neutrófilos es limpiar de bacterias contaminantes el área; se cree que en una lesión estéril como una incisión quirúrgica la ausencia de neutrófilos no perturbaría los mecanismos de reparación.

El reclutamiento de monocitos y la infiltración en el área de la lesión ocurre días más tarde, y está regulada por moléculas de adhesión que se presentan en la superficie de las células endoteliales, y por quimioquinas y otras sustancias liberadas por las plaquetas, neutrófilos y células apoptóticas/necróticas.

Dirigidos por señales moleculares presentes en el microentorno, los monocitos se transforman en macrófagos; se producen cambios en expresión génica y función celular en respuesta el entorno molecular. Dicho entorno varía dependiendo de la gravedad. De esta forma la severidad de la lesión determina los distintos estadios de la activación macrofágica. La llamada "*activación clásica*" tiene lugar cuando hay polisacáridos ó interferon gamma en el microentorno, y está asociada con un estado pro-inflamatorio que se manifiesta en la síntesis del IL-6, IL1beta y TNF-alfa. La llamada "*activación alternativa*" se produce en presencia de IL-4 e IL-23, y está asociada con la síntesis factores de reparación tisular que incluyen TGF-beta, bFGF, PDGF y VEGF.

Investigaciones recientes sugieren que estas diferencias en la inflamación van a **determinar la diferencia entre reparación eficaz y fracaso de la reparación**. Por ejemplo, en experimentos animales la neutropenia se asocia con un cierre acelerado de las lesiones. Sin embargo la depleción de macrófagos aborta la reparación de las heridas, reduciendo la deposición de colágeno y la angiogénesis. Estudios recientes sugieren que las terapias dirigidas a manipular la activación de los macrófagos pueden proteger los tejidos de la isquemia y promover la reparación.

Sin embargo, todavía existen grandes lagunas en nuestro conocimiento sobre como dirigir la activación de neutrófilos y macrófagos para favorecer la reparación tisular. Las dificultades en entender la respuesta inflamatoria surgen en parte de la redundancia biológica: una misma molécula puede tener varias funciones y al mismo tiempo distintas moléculas pueden tener funciones similares.

## b. Fase trófica

La formación de tejido nuevo tiene lugar 2-10 días tras la lesión y se caracteriza por proliferación celular, y migración de los distintos tipos celulares. Se forman nuevos vasos por un proceso conocido como angiogénesis, y mas tarde brotes de capilares junto con fibroblastos y macrófagos sustituyen la matriz de fibrina con tejido de granulación que constituye el nuevo sustrato para la migración celular.

### i. Proliferación celular y migración

La fase proliferativa comienza con la formación de fibrina, fibronectina y glicosaminoglucanos, y matriz de ácido hialurónico que inicialmente contiene plaquetas y macrófagos. Las citoquinas secretadas por estas células estimulan la migración celular al lugar de la lesión, y la matriz de fibrina actúa como una estructura provisional que soporta la formación de tejido nuevo.

Las células precursoras de hueso, cartílago, músculo, y tejidos conectivos forman parte de las células en fase de proliferación. Alternativamente, células “stem” de los nichos tisulares migran, se dividen y se diferencian en células específicas tisulares. Los fibroblastos se desplazan por la matriz extracelular uniéndose a fibronectina vitronectina y fiibrina mediante secuencias

específicas (RGD) que son reconocidas por las integrinas de membrana. Los fibroblastos proliferan en respuesta a factores de crecimiento y citoquinas, y son la célula predominante el tercero-quinto día tras la lesión. Los fibroblastos también secretan metaloproteinasas que facilitan su movimiento a través de la matriz y ayudan a eliminar elementos dañados de la matriz. Una vez en el lugar de la lesión los fibroblastos producen colágeno, proteoglicanos y otros componentes. Las actividades de los fibroblastos están reguladas predominantemente por factores de crecimiento como PDGF y TGF. PDGF secretado por plaquetas y macrófagos estimula la proliferación de los fibroblastos la quimiotaxis y la síntesis de colágeno. TGF-beta tiene funciones pleiotrópicas que dependen del contexto molecular y celular.

### ii. Angiogénesis

La angiogénesis tiene lugar con la formación de una red capilar nueva y mediante migración y división de las células endoteliales. Las células endoteliales se activan para iniciar la angiogénesis, nuevos vasos proporcionan el flujo sanguíneo y soporte metabólico para la actividad celular y la formación de tejido nuevo. La angiogénesis esta regulada por una combinación de factores estimulantes como VEGF, en equilibrio con factores inhibidores de la angiogénesis como angiostatina, endostatina y trombospondina. Factores locales que



estimulan la angiogénesis incluyen la baja tensión de oxígeno, bajo pH y niveles altos de lactato. Mediadores solubles como bFGF, HGF, TGF y VEGF también estimulan a las células endoteliales a formar vasos sanguíneos. Los niveles de oxígeno regulan la angiogénesis a través de factores como HIF (factor inducible de hipoxia) que se une al oxígeno. Cuando hay una disminución de los niveles de oxígeno hay un aumento de HIF, y un estímulo para producir VEGF, e inducir la angiogénesis. Los estudios en animales han proporcionado información acerca de los factores de crecimiento que están presentes en cada una de las fases. Por ejemplo VEGF-A señala a través de receptores endoteliales VEGFR1 y VEGFR2 presentes en el lugar de la reparación justo tras la lesión. Otros factores son importantes, un poco más adelante, cuando tiene lugar la estabilización de estos vasos, incluyen TGF- $\beta$ , PGF-BB y angiopoietina 1.

La nueva vasculatura permite aprovisionamiento de nutrientes y eliminación de productos de deshecho. El tejido de granulación consiste en una red con alta densidad de vasos, elevada densidad celular -fibroblastos y macrófagos-, y fibras de colágeno desorganizadas. El metabolismo de este tejido es muy alto y refleja la actividad necesaria para la migración celular, división y síntesis de proteínas que enfatiza la importancia de una nutrición adecuada y niveles de oxígeno apropiados para reparar. El tejido de granulación es especialmente importante en la reparación por segunda intención.

### ▲ iii. Síntesis de matriz extracelular

La alta concentración de factores de crecimiento y citoquinas inicialmente liberadas por plaquetas y leucocitos, son más tarde amplificadas por los macrófagos que inducen un crecimiento rápido de determinadas poblaciones celulares incluyendo fibroblastos migratorios, y células locales. El número de células estromales aumenta en paralelo con la angiogénesis que es patente en el entorno hipóxico producido por la lesión. De esta forma la producción de matriz extracelular aumenta en proporción al número de células.

Factores de crecimiento que incluyen TGF- $\beta$ , PDGF, BDNF, bFGF y IGF-1 funcionan en distintos estadios del proceso de reparación, y producen distintas evoluciones dependiendo de las condiciones particulares. Por ejemplo, PDGF un factor quimiotáctico y mitótico para los fibroblastos; también induce la síntesis de colágeno tipo 1. TGF- $\beta$ 1, que alcanza su máxima expresión en el inicio de la reparación, es esencial para el reclutamiento y mantenimiento de progenitores durante la formación de tejido nuevo. Asimismo las interacciones entre las distintas isoformas de TGF- $\beta$  condicionan el tipo de colágeno que se sintetiza. La actividad anti apoptótica y anabólica de IGF-1 esta regulada por las proteínas de unión a IGF, “IGF binding proteins” que están presentes en las primeras fases de la reparación. Tanto en humanos como animales la síntesis de IGF-1 y TGF- $\beta$ 1 precede a la síntesis de colágeno una fase fundamental en la reparación tisular. La bioactividad de estos factores esta regulada no solo a través de la síntesis sino también a través de la activación de los complejos que forman con otras proteínas que los inactivan.

### c. Remodelación tisular y tejido cicatricial

Por último, el tejido entra en la última fase de la reparación que consiste en una etapa larga de remodelación tisular. La acumulación de colágeno alcanza un máximo a las 2-3 semanas tras la lesión y la transición hacia la remodelación comienza. Existe un equilibrio entre síntesis, deposición y degradación durante esta fase. Los capilares pequeños se agregan en vasos más importantes y disminuye el contenido acuoso del tejido. Asimismo la densidad celular y la actividad metabólica del tejido disminuyen. El cambio más dramático ocurre en el tipo celular predominante la cantidad y organización de las moléculas de colágeno resultando en un aumento de la fuerza tensora del tejido. Inicialmente se deposita colágeno tipo 3 también llamado colágeno reticular y es gradualmente sustituido por colágeno tipo 1. Las fibras de colágeno se entrecruzan por la acción de la lisil oxidasa secretada por los fibroblastos de la matriz extracelular. La proporción (colágeno1:colágeno3), (4:1) es restaurada durante la remodelación. El equilibrio se alcanza mediante la neosíntesis de colágeno 1 y degradación de colágeno 3. Las metaloproteasas -colagenasas, gelatinasas y estromelinasas- controlan la degradación de la matriz extracelular, y facilitan la migración celular y la remodelación.

**En cada una de las fases descritas, una señalización específica se activa, ó se silencia, o se equilibra por otras señales endógenas que sirven para limitar la duración de cada etapa, y hacer que el tejido evolucione a la etapa siguiente de la reparación.** Durante estas etapas las células locales e infiltradas sintetizan distintas proporciones y distintos tipos de factores en un intento por atender las demandas del tejido en fase de reparación.

Consecuentemente las estrategias terapéuticas para manipular la reparación tisular necesitan integrar múltiples fenotipos celulares y grandes circuitos de señalización molecular necesarios para que haya una comunicación dinámica entre los distintos tipos celulares. La necesidad de modificar distintas vías moleculares simultáneamente demanda el suministro de una combinación de mediadores en vez de la administración de una sola proteína purificada, que no podría abastecer las demandas múltiples del tejido lesionado. Por tanto, la capacidad de proporcionar señales celulares apropiadas en el momento adecuado para suplir las necesidades del tejido es uno de los retos en medicina.

## 4. Plaquetas: contribución molecular a la reparación tisular

La solución última para mejorar los mecanismos de reparación tisular es la administración de una mezcla multimolecular con capacidad de implementar la complejidad de la señalización celular proporcionando todas las señales moleculares ambientales que son necesarias para regular los mecanismos biológicos que se han descrito anteriormente.

Las plaquetas son una fuente natural de factores de crecimiento y citoquinas involucradas en la reparación tisular. Hasta ahora no ha sido posible proporcionar un “pool” de señales

multimoleculares y una estructura temporal necesaria para iniciar la reparación, todo en el mismo agente terapéutico. Progresos considerables en el conocimiento de la biología de las

plaquetas ha revelado mucho acerca de la complejidad de las terapias PRP. Información adicional proviene de la combinación con el proteoma plasmático.

#### 4.1 Biología de las plaquetas

Nuestro conocimiento de aspectos fundamentales de la biología de las plaquetas y de su función proviene de estas últimas décadas. Las plaquetas son elementos discoideos de tamaño heterogéneo y tienen la menor densidad y menor tamaño que el resto de las células sanguíneas, unas 2 micras de diámetro frente a los leucocitos que tiene unas 20 micras, siendo los más pequeños los linfocitos con unas 9 micras de diámetro. Son anucleadas y se originan en la médula ósea, a partir del megacariocito. Las llamadas pro-plaquetas se fragmentan en plaquetas individuales y son liberadas en el torrente sanguíneo donde viajan entre 7-10 días antes de ser eliminadas de la circulación por senescencia y ser sustituidas por plaquetas más jóvenes que poseen mayores capacidades funcionales. Las plaquetas están llenas de gránulos de secreción que son críticas para la función plaquetaria. Entre los distintos tipos de gránulos-gránulos densos, gránulos alfa y lisosomas – los gránulos alfa son los más abundantes. Existen aproximadamente 50-80 gránulos alfa por plaqueta, aunque se cree que son heterogéneos en cuanto a su contenido. Por ejemplo, las proteínas antiangiogénicas están empaquetadas en distintas subpoblaciones de gránulos alfa que las proteínas pro-angiogénicas. Además existen algunas evidencias de que la secreción de unos gránulos u otros es selectiva dependiendo del agonista. Las proteínas plaquetarias incluyen no solo las proteínas solubles que se liberan al espacio extracelular, también las proteínas unidas a la membrana que se expresan en la superficie de la plaqueta. Muchas de las proteínas que están presentes en los gránulos alfa también están presentes en el plasma. En un análisis proteómico reciente se identificaron 629 proteínas unidas a la membrana plaquetaria. En conjunto los estudios proteómicos sugieren que más de 1048 proteínas solubles están presentes en el sobrenadante plaquetario.

#### 4.2 Función plaquetaria

No hace demasiado las plaquetas eran consideradas exclusivamente por su función como agentes hemostáticos, impedían el sangrado. In embargo a medida que han avanzado las investigaciones y nuestros conocimientos sobre la biología plaquetaria, se han identificado muchas más facetas. En los años 80 se les reconoció a las plaquetas su función en la reparación tisular. Más de una década después se reconocieron las implicaciones de las plaquetas en la angiogénesis. A continuación, Folkman demostró que proteínas reguladoras de la angiogénesis eran bombeadas en la pro-plaqueta desde el citoplasma de los megacariocitos, y que PF-4 era capturada por las plaquetas en los animales portadores de tumores. Investigaciones recientes en el área de los PRPs como biotecnología terapéutica, han permitido observar el comportamiento de las plaquetas fuera del torrente sanguíneo en contacto con distintos tejidos musculo esqueléticos y órganos lesionados.

En el proceso fisiológico de reparación tisular, las plaquetas inmersas en el coágulo de sangre sirven como fuente primaria de factores con actividad biológica. Por tanto el **concepto de aplicación de los PRPs** es sencillo y evidente. Como las plaquetas representan una fuente de factores de crecimiento y sustancias cicatrizantes, la idea de concentrar las plaquetas en los tejidos lesionados puede acelerar y optimizar los procesos de cicatrización, y abre la puerta para el desarrollo de las terapias de PRP. Por ejemplo, el hematoma que se origina tras una lesión muscular como consecuencia de la rotura de vasos contiene un 94% de eritrocitos, una pequeña cantidad de plaquetas (4%) y menos de 1% de leucocitos.

**El concepto de utilización del PRP implica sustituir el coágulo sanguíneo con PRP, por tanto minimizar la presencia de glóbulos rojos (95% en volumen) al tiempo que aumentamos la concentración de plaquetas en el lugar mismo de la lesión.** De esta forma concentraciones supra fisiológicas de proteínas plasmáticas y de plaquetas que acelerarán los procesos de reparación tisular mediante mecanismos directos e indirectos, por ejemplo atrayendo células inmunes mediante quimiotaxis, ó induciendo la síntesis de más proteínas por parte de las células locales. Además, es importante la capacidad del PRP de liberar las proteínas, desde la matriz de fibrina, de forma controlada a lo largo del tiempo satisfaciendo las necesidades del tejido en fase de reparación.

Sin embargo, el conocimiento actual tanto de las terapias PRP como de los mecanismos de reparación debe ser explorado con más intensidad para trasladar dicho conocimiento y mejorar estas terapias biológicas.

## 5. Biotecnología PRP: Nuevas herramientas para la reparación tisular

### 5.1 La historia: una perspectiva de tres décadas

Desde un punto de vista histórico, las primeras preparaciones de plasma rico en plaquetas se iniciaron en los bancos de sangre en los años 60s y se convirtieron en una rutina en los 70s.

En los años 80, la llegada de la medicina regenerativa con deseos de traducir rápidamente la ciencia en los cuidados del paciente utilizando los propios recursos del paciente abrió las puertas a la utilización de las plaquetas como vehículos para la liberación de un “pool” equilibrado de factores. En aquellos años se vio que las plaquetas liberaban factores de cicatrización capaces de iniciar la reparación de la úlceras vasculares.

Más tarde en los 90s las plaquetas se introdujeron en la cirugía maxilofacial como una modificación autóloga de los adhesivos de fibrina. La utilización de plaquetas fue un hecho fortuito ya que el objetivo principal era utilizar las propiedades hemostáticas y adhesivas de la fibrina durante la cirugía de hueso en el área oral. La realización del potencial terapéutico de las plaquetas fue consecuencia de observaciones clínicas como efectos antiinflamatorios y

mejoría de formación ósea durante las aplicaciones en implantología oral y cirugía maxilofacial. Al principio del milenio, el PRP se utilizó por primera vez para tratar lesiones articulares en cirugía artroscópica de rodilla y más tarde su utilización se extendió a tendones, lesiones musculares, artrosis de rodilla y cadera y condropatías.

## 5.2 Terminología

Antes de que se pudieran concebir las aplicaciones terapéuticas que existen ahora, el término PRP fue acuñado por los hematólogos para describir un plasma con una concentración de plaquetas superior a la sangre periférica, y que era transfundido en pacientes con plaquetopenia. En el año 2007, la nueva connotación del PRP se introduce en PubMed como término MeSH "Medical Subject Heading": *"PRP refers to a product consisting of PLATELETS concentrated in a limited volume of PLASMA used in various surgical tissue regeneration procedures where the GROWTH FACTORS in the platelets enhance wound healing and regeneration"*.

Sin embargo esta definición está desfasada, ya que en la actualidad el área se está volviendo más complejo, y se ha visto que no solo los factores de crecimiento sino también otras citoquinas liberadas por las plaquetas son responsables de los efectos terapéuticos de los PRPs. Por tanto, el protagonismo de los factores de crecimiento esta ahora dividido con las nuevas clases de biomoléculas como quimioquinas responsables de la migración celular etc.

La nomenclatura de los productos PRP alcanzó su zenit de confusión al principio del milenio. De hecho, aparecieron en el Mercado mas nombres que productos y el número de términos comerciales es interminable. Entre otros, concentrados de plaquetas (PC), platelet concentrates (PC), autologous growth factors (AGF), plasma rich in growth factors (PRGF), platelet gel (PG), platelet rich fibrin matrix (PRFM), Skin.pras® (Proteal).

En el año 2009 Dohan inspire la nomenclatura que utilizamos actualmente y propuso una clasificación para los PRPs. En términos generales se categorizaron como PRP puro y plasma rico en plaquetas y leucocitos. Considerando la arquitectura de la fibrina y el número de plaquetas se diferenciaron más subtipos de PRP. Los distintos protocolos comerciales de obtención producen PRPs con distintas características en cuanto a contenido de plaquetas y leucocitos y características de la fibrina, y ese ha sido el punto de partida de las clasificaciones PRP

## 5.3 Preparación del PRP

La sangre periférica es la principal fuente de preparación de PRPs; la media de plaquetas circulantes es de unas 200.000 plt/ul.

Para preparar PRP se extrae sangre de una vena periférica del paciente en condiciones estériles, con ó sin anticoagulantes, y el plasma se prepara mediante centrifugación o filtración. El volumen de sangre extraída se puede adaptar a las necesidades clínicas y varía entre 10 y 100 mL. Básicamente el método de preparación determinará la composición del PRP y concentración de eritrocitos, leucocitos y plaquetas en un determinado volumen de sangre. Hay tres métodos principales: 1) **doble centrifugado** utilizando máquinas automáticas y kits comerciales, 2) el método de **centrifugación simple** utilizando centrifugas convencionales de laboratorio seguidas de un preparación manual del PRP y 3) **filtración selectiva** de la sangre utilizando tecnología disponible para este fin.

La centrifugación sencilla produce un PRP con una concentración 1-3 veces el numero de plaquetas en sangre periférica, y el doble centrifugado produce un PRP con una concentración de plaquetas 4-8 veces superior a la sangre periférica. El doble centrifugado frecuentemente concentra leucocitos además de plaquetas. De acuerdo con esto, los concentrados de plaquetas se han categorizado en PRP puros y L-PRP que son PRPs leuco-enriquecidos.

Como alternativa a los sistemas comerciales automáticos, PRP se puede preparar en bancos de sangre utilizando procedimientos estandarizados. En este contexto, PRP se prepara a partir de un volumen de sangre mayor, se mide su calidad y se congela en alícuotas para ser utilizado en procedimientos posteriores.

Durante la extracción de sangre la mayoría de los protocolos utilizan anticoagulantes para evitar la coagulación de la sangre. La mayoría de los kits usan ACDA ó citrato sódico para quelar los iones calcio y de esta forma evitar la transformación de protrombina en trombina y su acción sobre el fibrinógeno plasmático. Anticoagulantes como heparina y EDTA se suelen evitar porque modifican la membrana plaquetaria. Sin embargo hay que tener en cuenta que el ACDA y el citrato modifican el pH de la sangre y la vuelven un poco ácida, es por esto que algunos protocolos comerciales (GPS) estabilizan el pH mediante la adición de un buffer.

Como alternativa hay sistemas que extraen la sangre sin anticoagulante, la fibrina se forma durante el centrifugado. Evidentemente estos productos tienen un pH fisiológico pero no son inyectables.

Muy importante, para inducir la secreción de proteínas de los granuloma alfa hay que inducir la activación plaquetaria. Esto ocurre espontáneamente en la sangre anti coagulada.

La coagulación se puede inducir de varias formas: mediante la adición de  $Ca^{2+}$  (en general cloruro de calcio) ó  $Ca^{2+}$ /trombina. El objetivo es romper fibrinógenos e inducir la proliferación de los monómeros de fibrina. Como alternativa, la coagulación se induce de manera fisiológica cuando el PRP es inyectado y entra en contacto con los factores tisulares.

El protocolo de inyección y la fisioterapia u otro tratamiento también influirán en la eficacia del tratamiento.

## 6. Marco Regulatorio

Según la Resolución publicada el 23 de Mayo por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas **en España el PRP se considera un medicamento.** [ANEXOS (1) y (2)]

Se adjunta

- **INFORME/V1/23052013** de la Agencia Española de medicamentos y Productos Sanitarios
- **“RESOLUCIÓN POR LA QUE SE ESTABLECE LA CLASIFICACIÓN DEL USO TERAPÉUTICO NO SUSTITUTIVO DEL PLASMA AUTÓLOGO Y SUS FRACCIONES, COMPONENTES O DERIVADOS, COMO MEDICAMENTO DE USO HUMANO PARA ATENDER NECESIDADES ESPECIALES”**, Fecha de publicación: 23 de mayo de 2013

15

En el entorno Europeo no hay una norma regulatoria armonizada y cada país utiliza su propia norma. Los aparatos deberán cumplir la directiva de dispositivo medico 2004/23/EC.

### ANEXO 1

Heba I Gawdat; Amira M Tawdy; Rehab A Hegazy; Mohga M Zakaria; Ryham S Allam. Autologous platelet-rich plasma versus readymade growth factors in skin rejuvenation: A split face study. Journal of Cosmetic Dermatology 2017

Lauren C. Strazzulla, Lorena Avila, Kristen Lo Sicco and Jerry Shapiro. An Overview of the Biology of Platelet-Rich Plasma and Microneedling as Potential Treatments for Alopecia Areata. J Investigative Dermatology

Qiang Hui, Peng Chang, Bingyu Guo, Yu Zhang, and Kai Tao. The Clinical Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma Combined with Ultra-Pulsed Fractional CO2 Laser Therapy for Facial Rejuvenation. Rejuvenation Research.

J.O. Cabrera-Ramírez, A.G. Puebla-Mora, A. González-Ojeda, D. García-Martínez, J.A. Cortés-Lares, A.R. Márquez-Valdés, G.I. Contreras-Hernández, J. BracamontesBlanco, J.A. Saucedo Ortiz y C. Fuentes-Orozco. Plasma rico en plaquetas en el tratamiento del fotodaño cutáneo en las manos. Actas Dermosifiliograf 2017

Ozlem Karabudak Abuaf, Hamza Yildiz, Hüseyin Baloglu, Memet Ersan Bilgili, Hasan Aktug Simsek, Bilal Dogan. Histologic Evidence of New Collagen Formulation Using Platelet Rich Plasma in Skin Rejuvenation: A Prospective Controlled Clinical Study. Ann Dermatol 2016

Krishnapriya Kalyam, M.D., Shaheen C. Kavoussi, M.D., Michael Ehrlich, M.D., Christopher C. Teng, M.D., Nisha Chadha, M.D., Sarah Khodadadeh, M.D., and Ji

Liu, M.D. Irreversible Blindness Following Periocular Autologous Platelet-Rich Plasma Skin Rejuvenation Treatment. Ophthal Plast Reconstr Surg 2016

Salvatore Giordano, Marco Rome, Petteri Lankinen. Platelet-rich plasma for androgenetic alopecia: Does it work? Evidence from meta-analysis. Journal of Cosmetic Dermatology 2017

## ANEXO 2 SEVERIDAD DEL FOTOENVEJECIMIENTO La clasificación de Fitzpatrick

Sobre arrugas y elastosis divide a los pacientes en los siguientes grupos:

- **Clase I:** Elastosis suave, con pequeños cambios de textura y aparición de líneas discretamente acentuadas sobre la piel.
- **Clase II:** Elastosis moderada, con pápulas de elastosis que se distinguen de la piel normal por su color amarillento y traslúcido bajo luz directa y discreta discromía.
- **Clase III:** Elastosis severa, elastosis multipapular y concluyente con piel pálida y amarilla, además de aparición de arrugas profundas romboidales.

16



Comparación de Clases I y III según la Clasificación de Fitzpatrick

### La clasificación de Glogau

#### 1. Fotoenvejecimiento temprano: Edad 20-30 años

- No arrugas.
- Fase inicial.
- Cambios pigmentarios moderados.
- No queratosis.
- Mínimas arrugas.

#### 2. Formación de arrugas: Edad 30-40 años

- Arrugas al mover
- Fotoenvejecimiento inicial o moderado
- Léntigos seniles iniciales
- Queratosis palpables pero no visibles
- Arrugas iniciales al reír



### 3. Arrugas en reposo: Edad 50 años de media (entre 40 y 60 años en función del daño solar)

- Arrugas abundantes
- Fotoenvejecimiento avanzado
- Discromías, telangiectasias
- Queratosis visibles
- Arrugas, incluso sin gesticular, 50 años de media

### 4. Arrugas: Edad 60-70 años

- Sólo arrugas
- Severo fotoenvejecimiento
- Piel color amarillo-grisáceo
- Premalignas
- Arrugas por toda la piel