

# Comparación *in vitro* del plasma autólogo condicionado (ACP) con un producto de plasma rico en plaquetas (PRP) basado en capa leucoplaquetaria

Investigación y desarrollo de Arthrex

## Introducción

El ACP se está usando actualmente para extraer concentrado de plaquetas de la sangre periférica y aplicar factores de crecimiento dentro del concentrado en un sitio quirúrgico ortopédico. Sin embargo, hay pocos estudios que se enfocan en una comparación conjunta con productos PRP de capa leucoplaquetaria. El propósito de este estudio fue una comparación *in vitro* de células tratadas con un sistema PRP basado en plasma, ACP, y un sistema PRP de capa leucoplaquetaria; sistema gravitacional de separación de plaquetas (GPS) de Biomet.

## Materiales y métodos

Se preparó PRP de ocho donantes con los equipos centrífugos y descartables propios de cada empresa. Después de que se prepararan muestras de PRP de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se realizaron conteos de plaquetas y de glóbulos blancos para la sangre entera y todas las muestras de PRP con un contador CBC.

Se colocaron tenocitos humanos, osteoblastos y miocitos en forma separada en una concentración de 5000 células/crisol (2800 células/cm<sup>2</sup>) en placas de cultivo de tejido. Se colocaron en placas células en concentración baja para asegurar que tuvieran espacio suficiente para expandirse. Se dieron cinco tratamientos diferentes a todas las células: (1) un grupo de control negativo de 2% o 5% de suero fetal bovino (FBS); (2) un grupo de control positivo, proliferativo de 10% o 15% FBS; (3) sangre entera; (4) ACP; y (5) Biomet. Después de un período de cultivo de 5 días, se trataron las células con timidina tritiada y se contaron con un contador de destellos. Se informaron los resultados como desviación promedio  $\pm$  estándar en desintegraciones por minuto (DPM). Esta medición es un indicador de la proliferación celular.

Se analizaron los datos para cada tipo de célula por separado con una ANOVA de una vía, y se halló significancia cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Puesto que ninguno de los experimentos pasó la prueba de normalidad, se realizó una ANOVA en rangos. Se halló una diferencia estadísticamente importante para todos los experimentos ( $p < 0,001$ ); se realizó luego el método Dunn de comparaciones múltiples en rangos para determinar diferencias entre grupos.

La proliferación de tenocitos después de cinco días indicó que el ACP se desempeñó mejor que los controles y la sangre entera (Figura 1,  $p < 0,05$ ). Biomet también se desempeñó mejor que los controles y la sangre entera ( $p < 0,05$ ). ACP tuvo una mediana más alta que Biomet, pero no se halló diferencia estadística entre las dos

( $p > 0,05$ ).

La proliferación de osteoblastos después de cinco días indicó que el ACP también se desempeñó mejor que los controles y la sangre entera (Figura 2,  $p < 0,05$ ), mientras que Biomet también se desempeñó mejor que los controles pero no que la sangre entera. Además, el ACP fue significativamente más alto que Biomet ( $p < 0,05$ ).

La proliferación de miocitos después de cinco días indicó que el ACP se desempeñó mejor que los controles y la sangre entera (Figura 3,  $p < 0,05$ ), mientras que Biomet se desempeñó en forma similar a los controles y la sangre entera. De nuevo, el ACP tuvo una proliferación significativamente más alta en comparación con Biomet ( $p < 0,05$ ).

Para todos los tipos de células, ACP fue estadísticamente mejor o con significancia aproximada al compararse con los controles, la sangre entera y Biomet. Aunque GPS generalmente tiene una concentración de plaquetas más alta que ACP, GPS tiene una proporción baja de plaquetas con respecto a los glóbulos blancos (Figura 4), cercana a la de la sangre entera, mientras que ACP tiene una proporción muy alta de plaquetas con respecto a los glóbulos blancos (GB) (12X mayor que la de Biomet). Además, los desgloses porcentuales de GB en la sangre entera, ACP, y Biomet (Figuras 5-7, respectivamente) muestran una diferencia en las cantidades de neutrófilos; considerados los más dañinos de los GB. ACP contiene 11% de neutrófilos, igual a 60 células/ $\mu$ L. Biomet, por otra parte, contiene 42% de neutrófilos, igual a 8170 células/ $\mu$ L. Esto demuestra que ACP no solo reduce la cantidad total de glóbulos blancos, sino que también reduce el porcentaje de neutrófilos. Biomet concentra glóbulos blancos y neutrófilos en 3,6X y 2,4X, respectivamente, por sobre la sangre entera.

Figura 1.

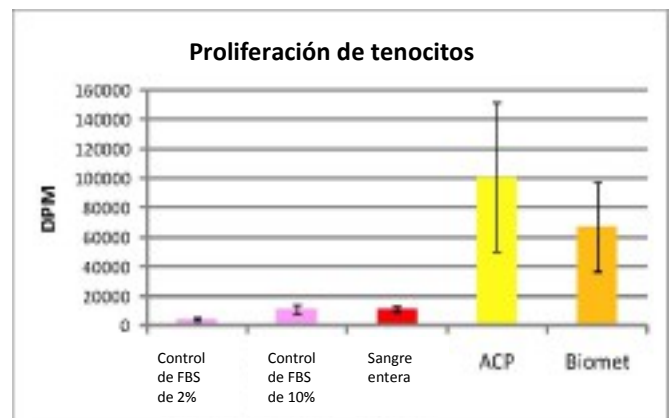


Figura 2.

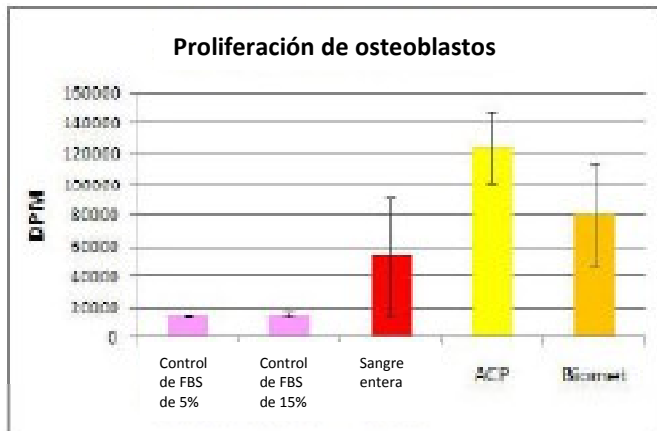


Figura 5.

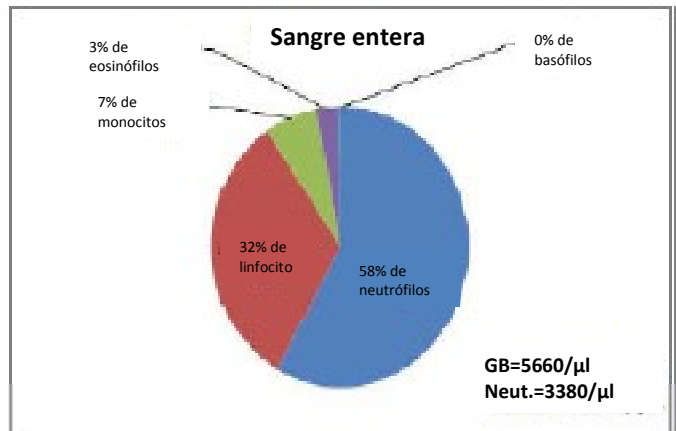


Figura 3.

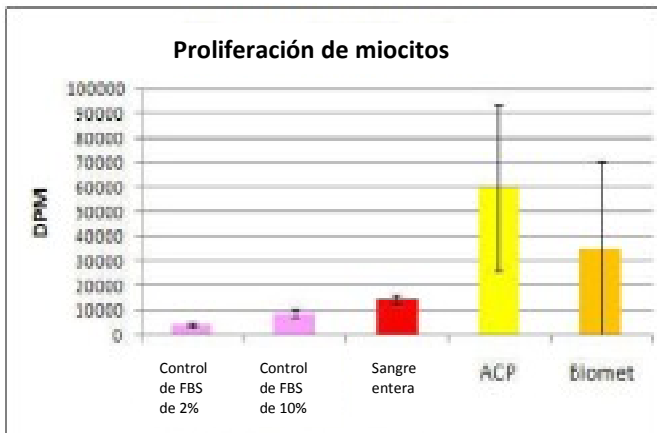


Figura 6.

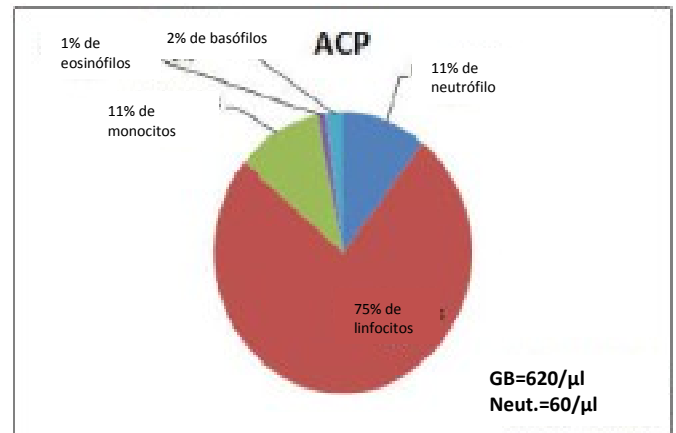


Figura 4.

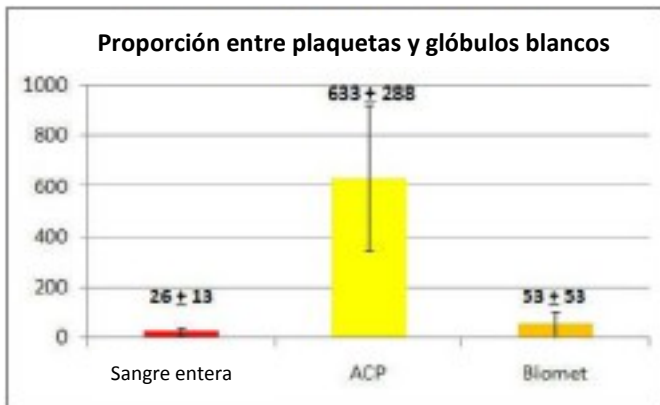
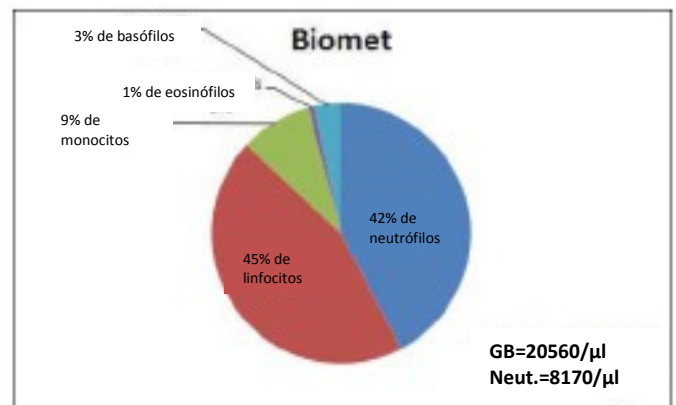


Figura 7.



## Debate

Existen tres teorías propuestas que explicarían por qué la proliferación celular de ACP era más alta o similar a la de Biomet. Una teoría hipotética es que las células tienen una capacidad máxima de respuesta a la dosis. Esto indicaría que solo un cierto nivel de factores de crecimiento liberados de plaquetas puede iniciar una respuesta proliferativa positiva; los demás factores de crecimiento restantes no se utilizan y se degradan con el tiempo. Una concentración del doble puede ser la cantidad máxima de plaquetas necesarias para llenar todos los receptores disponibles e invocar la mayor respuesta celular.

La segunda teoría es que un sistema PRP de capa leucoplaquetaria puede concentrar en exceso la cantidad de plaquetas necesarias para una respuesta fisiológica máxima. Las concentraciones de plaquetas mayores de 4X sobre la basal han demostrado causar un efecto inhibitorio paradójico en la proliferación celular<sup>12</sup>. Esto puede indicar que podría estar ocurriendo un ciclo de retroalimentación negativa cuando las plaquetas y los factores de crecimiento están concentrados en exceso. Los ciclos de retroalimentación negativa son vías comunes que el cuerpo utiliza para compensar las fluctuaciones de tales cosas como temperatura corporal, producción de hormonas, y producción de proteínas<sup>3</sup>.

La tercera teoría involucra la premisa propuesta de que ciertos glóbulos blancos pueden ser perjudiciales para el crecimiento. Los glóbulos blancos activados liberan citocinas tales como metaloproteinasas (MMP) e interleucinas-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) de la matriz, que son inflamatorias y pueden llevar a la degradación de la matriz de tejido. Además, los glóbulos blancos liberan especies de oxígeno reactivas (radicales libres), que también destruyen el tejido circundante<sup>4</sup>. Los glóbulos rojos (GR) liberarán radicales libres similares a los glóbulos blancos, que también son indiscriminados<sup>5</sup>. Aunque Biomet tiene una concentración alta de plaquetas, generalmente 5-7X sobre la basal, su sistema concentra glóbulos blancos y contiene glóbulos rojos. Los glóbulos blancos, e incluso los glóbulos rojos, pueden contrarrestar los efectos de la concentración aumentada de plaquetas en la proliferación celular, como se estableció en este estudio. También se siente que la liberación de enzimas proteolíticas y radicales libres de los glóbulos blancos y glóbulos rojos tendrá un mayor efecto negativo sobre la formación de la matriz de tejido en lugar de proliferación celular. Puesto que este estudio aborda la proliferación celular y no la formación de matriz de tejido, es posible que el efecto perjudicial completo de los glóbulos blancos y los glóbulos rojos no se revele. Se necesitarán más estudios para analizar el supuesto aumento en la degradación de la matriz de tejido que ocurre con un PRP de capa leucoplaquetaria

comparado con un PRP basado en plasma.

Aunque el ACP tiene una concentración general de plaquetas más baja (2-3X) que Biomet, tiene una relación más alta de plaquetas con glóbulos blancos, lo que parece ser de mayor importancia. Debido a estas diferencias básicas debatidas entre los dos productos finales de PRP, el efecto del ACP en la proliferación celular es significativamente más alto o está tendiendo hacia un aumento significativo al compararse con el sistema GPS de Biomet.

## Conclusión

En este modelo, ACP produjo cantidades más grandes de proliferación celular para diferentes tipos de células comparadas con PRP de capa leucoplaquetaria, el sistema Biomet. Estos resultados sugieren una de dos cosas: tener una concentración más alta de plaquetas en PRP no lleva a un aumento de la proliferación celular y/o el aumento de la presencia de glóbulos blancos puede impedir el potencial máximo de crecimiento.

## Referencias

1. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res* 2006;17(2): 212-9.
2. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;34(4): 665-71.
3. Sherwood L. Human Physiology: From Cells to Systems. 7th ed. Belmont (CA): Brooks/Cole; 2007, p. 15.
4. Scott A, Khan KM, Roberts CR, Cook JL, Duronio V. What do we mean by the term "inflammation?" A contemporary basic science update for sports medicine. *Br J Sports Med* 2004;38(3): 372-80.
5. Jiang N, Tan NS, Ho B, Ding JL. Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nat Immunol* 2007;8(10): 1114-22.

***El sistema de doble jeringa (ACP) se utiliza para facilitar la preparación rápida y segura del plasma autólogo rico en plaquetas (PRP) a partir de una pequeña muestra de sangre obtenida en el centro de atención del paciente. El PRP se puede mezclar con hueso de autoinjerto o aloinjerto antes de su aplicación en un sitio quirúrgico ortopédico según se considere necesario por las exigencias del uso clínico.***

