

Método óptimo para la obtención de plasma rico en plaquetas en el Servicio de Clínica del Dolor del CMN 20 de noviembre ISSSTE

X. L. Valadez Báez, J. R. Hernández Santos, J. C. Torres Huerta, S. Tenopala Villegas
y C. P. Canseco Aguilar

Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE. Ciudad de México, México

Valadez Báez XL, Hernández Santos JR, Torres Huerta JC, Tenopala Villegas S y Canseco Aguilar CP. Método óptimo para la obtención de plasma rico en plaquetas en el Servicio de Clínica del Dolor del CMN 20 de noviembre ISSSTE. Rev Soc Esp Dolor 2016; 23(4):175-180.

ABSTRACT

Objective: To determine the optimal method to collect platelet-rich plasma (PRP).

Material and methods: We collected 15 ml of blood from 36 healthy adults to determine platelet count and to test which of the following three protocols were the best to collect PRP. We used 3 ml of blood for each method: protocol 1: (n = 21) the blood tube was tested at 1200 revolutions per minute (RPM) in 2 centrifuge cycles of 8 minutes each; protocol 2 (n = 8): 1200 RPM/1 cycle/8 minutes, and protocol 3: (n = 7): 1200 RPM/1 cycle/10 minutes. From the blood samples that we collected, we also analyzed 1 ml of plasma to determine platelet performance by using an automatic flow cytometer (BD FACSCanto II). Platelet performance was determined by the following formula: platelet PRP count (100)/platelet count from total blood. The statistical method used were measures of central tendency, Chi-square, t-test, analysis of variance and the Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests.

Results: The basal overall count of platelet was 261.2 miles/mcl for the three methods (p = 0.906), 662.3 ± 243.3 (p = 0.001) for protocol 1; 377.9 ± 101.4 (p = 0.008) for protocol 2 and 30.9 ± 18.8 (p = 0.016) for protocol 3. Platelet performances were 255.2 ± 57.6 %; 149.3 ± 24.6 %; 13.3 ± 11.6 % respectively.

Conclusion: Applying the first protocol we obtain PRP (1200 RPM/2 cycles of 8 minutes each). This study was done in healthy adults; however, future studies with a larger sample size are needed to confirm our findings of this method. In case of collecting platelets in studies with greater population being the adequate, its clinical utility should be validated by including patients with chronic and degenerative diseases and take care of associated diseases.

Key words: Platelet-rich plasma, collection methods.

RESUMEN

Objetivos: Describir el método óptimo para obtener plasma rico en plaquetas (PRP).

Material y métodos: Previo consentimiento informado, se obtuvieron de 36 pacientes sanos una muestra sanguínea de 15 ml distribuidos en 5 tubos estériles: uno para obtención de biometría hemática y el resto se sometieron a alguno de los 3 protocolos para obtención de plasma rico en plaquetas. Protocolo 1 (n = 21): 1200 rpm/2 ciclos/8 minutos (cada ciclo); protocolo 2 (n = 8): 1200 rpm/1 ciclo de centrifugado/8 minutos. Protocolo 3 (n = 7): 1200 rpm/1 ciclo de centrifugado/10 minutos. De las muestras obtenidas, se analizó 1 ml de plasma mediante citómetro de flujo automatizado (BD FACSCanto II) y se determinó el rendimiento plaquetario mediante la fórmula: recuento de plaquetas PRP (100)/recuento de plaquetas de sangre total. El método estadístico empleado fue medidas de tendencia central, Chi cuadrado, t de Student, análisis de varianza, prueba de Wilcoxon y probabilidad de Kruskal-Wallis.

Resultados: El promedio de concentración basal plaquetaria fue de 261.2 miles/mcl para los 3 métodos (p = 0.906). Después del proceso de centrifugado para protocolo 1 fue 662.3 ± 243.3 (p = 0.001); protocolo 2, 377.9 ± 101.4 (p = 0.008) y 30.9 ± 18.8 (p = 0.016) para el 3. El rendimiento fue: 255.2 ± 57.6 %; 149.3 ± 24.6 %; 13.3 ± 11.6 %, respectivamente.

Conclusión: Se logró obtener PRP aplicando el primer protocolo (1200 rpm/2 ciclos/8 minutos cada ciclo). El estudio se realizó en pacientes adultos sanos, sin embargo, se tendrán que realizar estudios posteriores con una mayor población para comprobar la efectividad de este método. En caso de que la obtención plaquetaria en estudios con mayor población sea la adecuada, deberá validarse su utilidad clínica en paciente con enfermedades crónicas degenerativas y se tomen en cuenta las enfermedades concomitantes.

Palabras clave: Plasma rico en plaquetas, métodos de obtención.

INTRODUCCIÓN

El plasma rico en plaquetas (PRP) fue dado a conocer por primera vez por M. Ferrari, en 1987, como un componente autólogo utilizado en una cirugía cardíaca a corazón abierto con la intención de disminuir el sangrado y, por ende, el consumo de productos para transfusión homóloga (1). El PRP se define como una fracción de plasma obtenido de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior a la del plasma en condiciones basales. Debe su interés terapéutico al papel reparador de las plaquetas, específicamente a los factores de crecimiento liberados por sus gránulos (1,2). Existen múltiples variables que influyen en el efecto del PRP sobre la cicatrización de una herida, entre ellas la concentración plaquetaria, el tipo de lesión y la condición médica del paciente. Estas variables y su interacción es una razón por la cual no existe una recomendación única sobre el nivel de aumento de plaquetas que debe producir el PRP sobre la línea de base. Algunos investigadores han sugerido que el PRP debería alcanzar una concentración en plaquetas de 3 a 5 veces superior al nivel normal, aunque la relación entre el número de plaquetas y el beneficio clínico obtenido es uno de los parámetros que permanecen pendientes de determinar con exactitud (3-5). En la literatura se encuentran una gran variedad de conceptos en cuanto a la cantidad de plaquetas requeridas para calificar como PRP, sin embargo no existe un consenso sobre ello, ni sobre el proceso de obtención. Para la propuesta de nuestro trabajo definiremos el PRP como el plasma obtenido que contenga más del 50 % de la concentración basal del paciente. Rodríguez y cols. mencionan que “la centrifugación es el procedimiento básico para obtener PRP, con un rendimiento aproximado del 10 % sobre la sangre extraída” (3). Cabe destacar la importancia de realizar el proceso con una centrífuga calibrada de acuerdo a las condiciones del paciente (1). Asimismo, el concepto de rendimiento plaquetario se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{recuento de plaquetas PRP} \times 100}{\text{recuento de plaquetas sangre total}}$$

Existen diferentes protocolos para la obtención de PRP, de acuerdo a cada sistema y cada autor. Existen, incluso, kits desechables para este propósito. Algunos autores presentan dos centrifugados, otros simplemente uno, y existe una amplia variación en cuanto a los tiempos de centrifugado, como lo expresan diferentes investigaciones (6,7).

En cuanto a la aplicación del PRP, existen investigaciones que alentan su uso en tendinopatía rotuliana crónica (8-11). Su uso ha mostrado beneficios clínicos en su aplicación en articulaciones, representando una opción con la cual se pueden obtener múltiples beneficios por su potencial beneficio en la regeneración condral, y tratarse de un producto autólogo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Es un estudio de cohorte. Se realizó la selección de 36 pacientes sanos. Se les explicó el procedimiento y se obtuvo el consentimiento informado. Se solicitó que el paciente acudiera en ayuno de 8 horas. Se realizó limpieza de la zona de punción de la vena cefálica con alcohol isopropílico para obtención de una muestra sanguínea de 15 ml con un sistema vacutainer, la cual se distribuyó en 5 tubos estériles; en el primer tubo con EDTA como anticoagulante se recolectaron 4 ml de sangre, se rotuló para obtención de biometría hemática proporcionando el conteo basal de plaquetas. En los 4 tubos restantes con citrato de sodio como anticoagulante, se recolectaron 2.7 ml de sangre en cada uno, y se sometieron a uno de los 3 protocolos para obtención de PRP, como se describen a continuación: protocolo 1 (n = 21) se aplicaron 1200 rpm, dos ciclos de centrifugado de 8 minutos cada uno; protocolo 2 (n = 8) se utilizaron 1200 rpm durante 1 ciclo de centrifugado por 8 minutos y protocolo 3 (n = 7) a 1200 rpm 1 ciclo de centrifugado por 10 minutos, utilizando la centrífuga EBA 20, Hettich, modelo D-78532 Tuttlingen; posteriormente se recolectó 1 ml de PRP para efectuar la cuantificación mediante citómetro de flujo fluorescente automatizado (BD FACSCanto II).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se tomaron como herramientas medidas de tendencia central, χ^2 , t de Student, análisis de varianza, prueba de Wilcoxon y probabilidad de Kruskal-Wallis. El objetivo del estudio se centró en obtener plasma rico en plaquetas con alguno de los protocolos estudiados. Para evaluar diferencias en la distribución de la edad entre los sexos se utilizó la prueba Chi cuadrado, y para comparar la población entre géneros se aplicó la t de Student. Se realizó análisis de varianza entre los grupos de edad. Con la prueba de Wilcoxon se evaluaron los cambios observados entre los métodos y con la prueba

de Kruskal-Wallis se compararon los valores plaquetarios basales y finales de los 3 protocolos empleados.

RESULTADOS

Del total de la población estudiada (n = 36), 20 pacientes pertenecen al sexo masculino y 16 al femenino. Para evaluar diferencias en la distribución de la edad entre los sexos se utilizó la prueba χ^2 , la cual mostró una $p < 0.05$. La mediana en la edad de la población masculina fue 32 años con un promedio \pm desviación estándar 35.2 ± 8.6 ; en la población femenina la mediana fue de 35 años con promedio \pm desviación estándar 37.1 ± 10.4 . La mediana en la edad de la población total fue de 32 años con un promedio \pm desviación estándar 36.1 ± 9.4 . La t de Student mostró una $p = 0.549$ (NS) al comparar la población entre géneros (Tabla I y Figura 1). A los pacientes se les aplicaron 3 protocolos diferentes. Se evaluó si existía diferencia en la distribución de la edad entre grupos. No hubo diferencias significativas entre ellos ($p = 0.334$). Igualmente el análisis de varianza no mostró diferencias, con una $p = 0.938$ (Tabla II). En el análisis del número de plaquetas basal y final respecto al método aplicado, se obtuvo un valor de 255.9 ± 61.7 miles/ml y 662 ± 243.3 respectivamente con una $p < 0.001$ aplicando el protocolo 1. El valor basal de plaquetas para el protocolo 3 fue de 276.0 ± 97.6 y el final de 300.9 ± 18.8 con una $p = 0.016$, que muestra disminu-

ción del número de plaquetas. Para el protocolo 2 el valor basal fue 251.9 ± 45.9 y el final 377.9 ± 101.4 con una $p = 0.008$. Al comparar el número de plaquetas basal entre los métodos no se observaron diferencias significativas ($p = 0.906$), lo cual sí ocurre al comparar el número de plaquetas final entre ellos ($p < 0.001$) (Tabla III y Figura 2). En el análisis del rendimiento obtenido se observó que con el protocolo 1 se incrementó 255.2 ± 57.6 % respecto al valor basal. Con el protocolo 2 fue de 149.3 ± 24.6 ; y para el protocolo 3, el rendimiento sólo fue del 13.3 ± 11.6 %. La prueba de Kruskal-Wallis arroja un valor de $p < 0.001$ (Tabla IV y Figura 3).

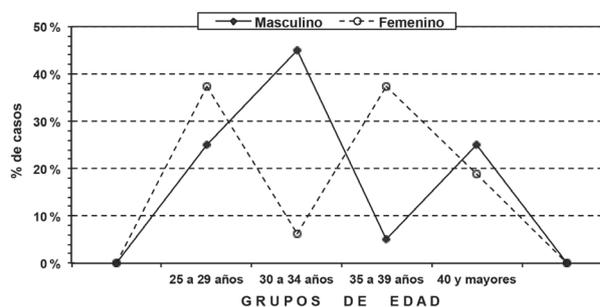


Fig. 1. Distribución porcentual, por grupos de edad y sexo, de 36 pacientes voluntarios, derechohabientes del ISSSTE de Clínica del Dolor.

TABLA I
DISTRIBUCIÓN POR EDAD Y SEXO DE 36 PACIENTES VOLUNTARIOS, DERECHOHABIENTES DEL ISSSTE DE CLÍNICA DEL DOLOR

<i>Prueba χ^2 para evaluar diferencias en la distribución de la edad entre sexos. Promedio, desviación estándar, mínimo y máximo y mediana de la edad por sexo y total, Prueba t de Student entre sexos</i>						
Grupo de edad	Masculino		Femenino		Total	
	Número de pacientes	%	Número de pacientes	%	Número de pacientes	%
25 a 29 años	5	25.0 %	6	37.5 %	11	30.6 %
30 a 34 años	9	45.0 %	1	6.3 %	10	27.8 %
35 a 39 años	1	5.0 %	6	37.5 %	7	19.4 %
40 y mayores	5	25.0 %	3	18.8 %	8	22.2 %
Total	20	100.0 %	16	100.0 %	36	100.0 %
$\chi^2 (3) = 10.244; p = 0.013; p < 0,05$						
Promedio \pm Desv. Est.	35.2 \pm 8.6		37.1 \pm 10.4		36.1 \pm 9.4	
(Mínimo - Máximo)	(29 - 58)		(26 - 58)		(26 - 58)	
Mediana	32		35		32	
Prueba t de Student entre sexos	t (34) = 0.605; p = 0.549; NS					

TABLA II
DISTRIBUCIÓN POR EDAD DE 36 PACIENTES VOLUNTARIOS, DERECHOHABIENTES DEL ISSSTE DE CLÍNICA DEL DOLOR, A LOS CUALES SE LES APLICARON DIFERENTES TIEMPOS Y CICLOS DE CENTRIFUGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Prueba χ^2 para evaluar diferencias en la distribución de la edad entre grupos. Promedio, desviación estándar, mínimo y máximo y mediana de la edad por sexo y total, Prueba ANOVA entre grupos

Grupo de edad	2 ciclos a 1200 RPM - 8 minutos c/u		1 ciclo a 1200 RPM - 10 minutos		1 ciclo a 1200 RPM - 8 minutos	
	n.º	%	n.º	%	n.º	%
25 a 29 años	8	38.1 %	1	14.3 %	2	25.0 %
30 a 34 años	4	19.0 %	2	28.6 %	4	50.0 %
35 a 39 años	4	19.0 %	3	42.9 %	0	0.0 %
40 y mayores	5	23.8 %	1	14.3 %	2	25.0 %
Total	21	100.0 %	7	100.0 %	8	100.0 %
$\chi^2 (6) = 6.859; p = 0.334; NS$						
Promedio \pm Desv. Est.	36.42 \pm 10.4		36.1 \pm 6.1		35.0 \pm 10.0	
(Mínimo - Máximo)	(26 - 58)		(29 - 47)		(28 - 58)	
Mediana	33		35		31.5	
Análisis de varianza entre grupos	F (2.33) = 0.064; p = 0.938; NS					

TABLA III
PROMEDIO \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE PLAQUETAS BASAL Y FINAL DE TRES PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

Se evalúan los cambios observados entre el valor inicial y el final con la prueba de Wilcoxon (p), para cada uno de los métodos de obtención de PRP. Se comparan los valores basales y los finales del número de plaquetas entre métodos de obtención, con la prueba de Kruskal-Wallis

Método de obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)	Basal, previo al procedimiento	Al término del procedimiento	p
2 ciclos a 1200 rpm - 8 minutos c/u	255.9 \pm 61.7	662.3 \pm 243.3	p < 0.001
1 ciclo a 1200 rpm - 10 minutos	276.0 \pm 97.6	300.9 \pm 18.8	0.016
1 ciclo a 1200 rpm - 8 minutos	251.9 \pm 45.9	377.9 \pm 101.4	0.008
Probabilidad con la prueba de Kruskal-Wallis	0.906	p < 0.001	

DISCUSIÓN

En nuestro estudio se emplearon 3 diferentes métodos para obtención de PRP. Encontramos que se obtuvo una ganancia de 255.2 % del valor basal con el método de 2 ciclos por 8 minutos cada uno a 1200 rpm. Estos resultados corresponden con lo expuesto en la literatura en cuanto a la técnica para obtención de PRP en tubo. Sin embargo, en relación a la cuantificación de PRP, nuestro estudio tuvo un mayor rendimiento (255.2 %) comparado con el

realizado por García y cols. (8), en donde ellos realizan 4 protocolos para la obtención de PRP, reportando que el mayor número de plaquetas obtenido fue con el método de un centrifugado inicial a 1800 rpm por 8 minutos seguido por un segundo centrifugado sólo del plasma obtenido a 1800 rpm por 8 minutos, con promedio de 191.31 % del conteo inicial.

En nuestro estudio se llevaron a cabo 2 métodos de un solo centrifugado, de los cuales uno de ellos mostró ser una técnica para obtener plasma pobre en plaquetas (PPP).

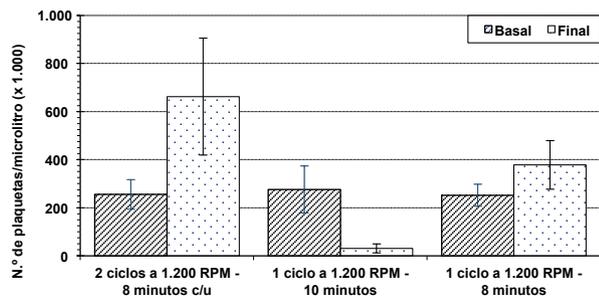


Fig. 2. Promedio \pm desviación estándar del número de plaquetas basal y final de tres procedimientos para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

TABLA IV
PROMEDIO \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL RENDIMIENTO DE TRES MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

<i>Se comparan los rendimientos que se obtuvieron, mediante la prueba de Kruskal-Wallis</i>	
<i>Método de obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP)</i>	<i>Basal, previo al procedimiento</i>
2 ciclos a 1200 rpm - 8 minutos c/u	255.2 \pm 57.6
1 ciclo a 1200 rpm - 10 minutos	13.3 \pm 11.6
1 ciclo a 1200 rpm - 8 minutos	149.3 \pm 24.6
Probabilidad con la prueba de Kruskal-Wallis	p < 0.001

*Nota: Se observaron cambios estadísticamente significativos con p < 0.001 entre método de obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) entre los tres procedimientos evaluados en este estudio.

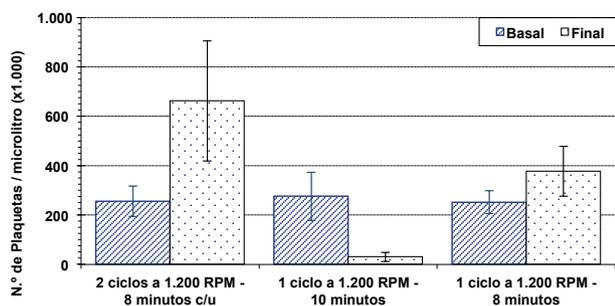


Fig. 3. Promedio \pm desviación estándar del número de plaquetas basal y final de tres procedimientos para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

Siendo el método óptimo el de doble centrifugado, sin embargo no se recomienda su uso por el riesgo de excesiva manipulación, con riesgo de contaminación del producto y/o activación prematura de las plaquetas (1). También debe tomarse en cuenta la condición clínica del paciente; en el presente estudio se descartó un paciente en el que se obtuvo PPP (plasma pobre en plaquetas) con la técnica de doble centrifugado; posteriormente se diagnosticó con sarcoma.

CONCLUSIÓN

Se logró obtener PRP aplicando el primer protocolo (1.200 rpm/2 ciclos/8 minutos cada ciclo). El estudio se realizó en pacientes adultos sanos. Sin embargo, se tendrán que realizar estudios posteriores con una mayor población para comprobar la efectividad de este método. En caso de que la obtención plaquetaria en estudios con mayor población sea la adecuada, deberá validarse su utilidad clínica en paciente con enfermedades crónico degenerativas y se tomen en cuenta las enfermedades concomitantes.

CORRESPONDENCIA:
Xóchitl Libertad Valadez Báez
libertadvaladez@gmail.com

BIBLIOGRAFÍA

- Arcuri A. Plasma rico en plaquetas. Recuperación de tejidos con factores estimulantes de crecimiento autólogos. Buenos Aires: Amolca; 2013. p. 7-10.
- de la Mata J. Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatólogo? En: "Clínica. Madrid: Elsevier; 2012. p. 1-6.
- Rodríguez J, Palomar MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. Rev Esp Cir Oral Maxilofac 2012;34(1):8-17. DOI: 10.1016/j.maxilo.2011.10.007.
- Kirchner F. Tratamiento de las patologías discales y degenerativas de la columna vertebral con plasma rico en factores de crecimiento plaquetario ozonizados. Revista Española de Ozonoterapia 2012;2(1):91-106.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004;62(8):489-96. DOI: 10.1016/j.joms.2003.12.003.
- Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. J Craniomaxillofac Surg 2002;30:97-102. DOI: 10.1054/jcms.2002.0285.
- Gómez Martín B, Becerro de Bengoa Vallejo R, Losa Iglesias ME, Sánchez Gómez R. Plasma rich in growth factors (PRGF). Revista Internacional de Ciencias Podológicas 2007;1(1):7-10.

8. García R. Estudio comparativo de 4 protocolos para obtención de plasma rico en plaquetas (PRP). Disponible en <http://www.fundacioncarraro.org/revista-2008-n27-art4.php>. Revisado el 20 de noviembre de 2014.
9. Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea: plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Vitoria: Puesta de día publicaciones; 2000. p. 13-55.
10. Geoffrey D, Frank RA, Fortier LA, Cole BJ. Platelet-rich Plasma for Articular Cartilage Repair. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* 2013;21(4).
11. Anitua E. Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *J Oral Implantol* 2006;32(2):72-6. DOI: 10.1563/736.1.