

artículo original

Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador

Growth factors derived from platelet and its applications in regenerative medicine. Potential use of ozone as activator

Adriana Schwartz

Ginecólogo-obstetra. Clínica Fiorela.
(Madrid, Spain)

Gregorio Martínez- Sánchez

Medinat srl Clinic
(Ancona, Italy)

Lamberto Re

Medinat srl Clinic
Pharmacology, D.I.S.M.A.R., University of Ancona,
(Ancona, Italy)

Autor para correspondencia:

Adriana Schwartz. M.D. Ginecólogo-obstetra. Clínica Fiorela. C/ Juan Andrés 60, Local 1 Bajo izda. CP 28035, Madrid- España.
E.mail: adrianaschwartztapia@gmail.com.

Gregorio Martínez-Sánchez, Ph.D. Medinat srl Clinic, Vía Fazioli 22, 60021 Camerano, Italy. Tel. +39 071 731076,
E.Mail: gregorcuba@yahoo.it

54 Lamberto Re. M.D., Ph.D. Medinat srl Clinic, Vía Fazioli 22, 60021 Camerano, Italy. Tel. Fax. +39 071 7310076
E.mail: lambertore@univpm.it

Keywords

Platelet-rich plasma
Platelet
Growth factors
Ozone

Abstract

A newer treatment, autologous platelet-rich plasma (PRP), represents a greater similarity to the natural healing process as a composite of multiple growth factors, is safe due to its autologous nature, and is produced as needed from patient blood. PRP is an concentration of platelets and growth factors, including transforming growth factor-beta (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), and platelet derived growth factor (PDGF). The enhancement of tissue healing by the placement of supraphysiologic concentration of autologous platelets at the site of tissue injury or surgery is supported by basic science and clinical studies. Due to the increased concentration and release of these factors, PRP can potentially enhance the recruitment and proliferation of stem cells and endothelial cells. Ozone can promote platelet aggregation and release of grow factors with both mitogenic and chemotactic properties. In addition to use in the treatment of chronic skin and soft tissue ulcerations, application of this method include periodontal and oral surgery, maxillofacial surgery, orthopedic and trauma surgery, cosmetic and plastic surgery, spinal surgery, heart bypass surgery, and burns. A better understanding of platelet function and appropriate clinical use is essential in achieving the desired outcomes of platelet-rich concentrate in clinical applications.

Sugerencia sobre cómo citar este artículo: Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. (2011). Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol.1, nº 1, pp. 54-73.

Palabras clave

*Plasma rico en plaquetas
Plaquetas
Factores de crecimiento
Ozono*

Resumen

Los tratamientos que emplean el plasma autólogo rico en plaqueta (PRP) mimetizan los eventos que se suceden durante el proceso fisiológico de cicatrización debido a la liberación de diversos factores de crecimiento. Al ser autólogo, la seguridad del procedimiento es alta y la cantidad requerida se obtiene de la sangre del propio paciente. El PRP es un concentrado de plaquetas y factores de crecimiento que incluye: el factor transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) entre otros. La potenciación del mecanismo de cicatrización inducido por concentraciones supra-fisiológicas de plaquetas autólogas en el tejido dañado o zona quirúrgica ha sido demostrado tanto en estudios básicos como clínicos. Debido a la alta concentración y liberación de estos factores, PRP pueden potencialmente incrementar el reclutamiento y proliferación de células madres y endoteliales. El ozono promueve la agregación plaquetaria y la liberación de factores con propiedades mitogénicas y quimiotácticas. Además de ser útil en el tratamiento de úlceras crónicas y de tejidos blandos, otras aplicaciones de este método involucran: cirugía oral y periodontal, cirugía maxilofacial, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía plástica y cosmética, cirugía de columna, cirugía cardiovascular y quemaduras. Un conocimiento más profundo de las funciones plaquetarias y su empleo apropiado desde el punto de vista clínico es fundamental para arribar a un uso óptimo desde el punto de vista terapéutico.

Introducción

El primer factor de crecimiento fue descubierto por la neurofisióloga italiano-judía Rita Levi en 1948 quien comparte el premio Nobel de medicina junto a Stanley Cohen en 1986. Fue denominado Factor de Crecimiento Nervioso (NFG). Desde 1990 se conoce que la regeneración de tejidos blandos, heridas y huesos depende de la acción de diferentes componentes sanguíneos (fibrina, fibronectina, factores de crecimiento entre otros) y que su presencia en elevadas concentraciones puede alterar o acelerar este proceso.⁶ El uso de concentrados de plaquetas para acelerar el proceso de cicatrización fue descrito por primera vez en 1997.⁷ Las plaquetas contienen grandes cantidades de factores de crecimiento que tiene un papel trascendental en el proceso de cicatrización, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), el factor de crecimiento transformador beta (TGF- β) y el factor de crecimiento vascular (VEGF) entre otros que son capaces de estimular la proliferación celular, la quimiotaxis, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis.⁹

Las plaquetas son principalmente conocidas por su papel en el proceso de hemostasia en el cual contribuyen a evitar la pérdida de sangre en las zonas vasculares heridas. Para llevarlo a cabo, las plaquetas se adhieren, se agregan y forman una superficie pro-coagulante, que provoca la generación de trombina y la formación de fibrina. La formación de un hematoma o un coagulo inicia la cascada de cicatrización. La formación de un coagulo puede iniciarse por una ruta intrínseca o extrínseca. La vía intrínseca se activa por un daño o alteración de la propia sangre, mientras que la vía extrínseca se inicia cuando la sangre entra en contacto con factores ajenos a la sangre (e.j. tejidos dañados). Ambas rutas involucran una cascada de eventos, que aunque se inician de manera diversa, tienen puntos de convergencia en las etapas finales. Las plaquetas son las células liberadoras de las proteínas esenciales y necesarias en la ruta de la formación del coagulo.¹¹

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) se define como la porción de la fracción de plasma de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior al valor basal.¹³ El PRP no solo contiene plaquetas, sino que además está formado por: plasma, leucocitos, factores de crecimiento, proteínas de secreción y todos los componentes de la cascada de coagulación.

El ozono promueve la agregación plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento provenientes de las plaquetas.^{14,15} La activación de plaquetas con ozono puede ser útil en el tratamiento de úlceras crónicas y de tejidos blandos, la cirugía oral y periodontal, cirugía maxilofacial, cirugía ortopédica y traumatología, cirugía plástica y cosmética, cirugía de columna, cirugía cardiovascular y quemaduras. El presente trabajo tuvo como objetivo hacer una revisión de los antecedentes, estado actual y perspectivas de los tratamientos basados en el uso de PRP, además de los distintos protocolos que aplican PRP activados con ozono.

Materiales y Métodos

La búsqueda y localización de la información, incluyó una revisión de artículos científicos en la base de datos MEDLINE, entre los años 2000-2011, para lo cual se utilizaron en lo fundamental los descriptores siguientes: ozono, plasma rico en plaquetas, plaquetas y factores de crecimiento derivados de plaquetas. Se localizaron y analizaron las fuentes de información primaria (artículos originales). La búsqueda bibliográfica incluyó artículos científicos de revisión y de resultados experimentales.

Aspectos estructurales de las plaquetas

Las plaquetas son células sanguíneas que proceden del megacariocito, célula que prolifera y madura en la médula ósea bajo la influencia de la trombopoyetina. La fragmentación de su citoplasma da nacimiento, a nivel del seno vascular a las plaquetas, que son células que carecen de núcleo y no pueden replicarse. Circulan en la sangre en forma de disco biconvexo (discocitos) de aproximadamente 3 μm^2 de diámetro, 4 – 7 μm^3 de volumen y 10 pg de peso. Poseen carga eléctrica negativa en su superficie. Su concentración normal en la sangre es de $150 \cdot 10^6/\text{mL}$ a $350 \cdot 10^6/\text{mL}$ y su tiempo de vida media en sangre es de 5 a 10 días (Fig. 1).

La membrana externa constituye una bicapa lipoproteica con glicoproteínas que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, TXA₂, trombina), proteínas de adhesión (fibrinógeno, fibronectina, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand [vWF]) y para ligandos fibrosos como el colágeno, además, posee enzimas importantes para el funcionamiento celular y fosfolípidos. Es responsable de la interacción de la célula con el medio circundante a través de receptores entre las que figuran las integrinas las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas que tienen la secuencia arginina-glicina-aspartato (e.j: fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor de von Willebrand, colágeno). Las integrinas más estudiadas han sido GPIIb/IIIa y la GPIb/IX. La GPIIb/IIIa ocupa una gran proporción de la superficie plaquetaria (~15 % de la proteína total de la membrana y 3 % de la célula). Hay de 3 a 8 réplicas en la plaqueta en reposo. Es un heterodímero de 228 kDa, dependiente de calcio, cuyas subunidades a y b son codificadas por genes diferentes. La mayor proporción de esta glicoproteína es extracelular y dispone de 2 segmentos transmembrana y 2 cortos segmentos citoplasmáticos formados por los extremos C terminales. En la plaqueta en reposo se halla en forma de monómero, ya que la asociación de las subunidades requieren calcio extracelular, que se enlaza a la subunidad IIb.¹⁸

La GP Ib/IX es un heterodímero formado por la asociación de las GP Ib y IX. La GPIb consta de una cadena a y una b enlazadas por puentes disulfuro. Tiene regiones extracelulares (~40 nm), que garantizan la interacción con los ligandos vWF y trombina), submembrana y citoplasmáticos, que actúan como anclaje del complejo a la célula. Esta glicoproteína es rica en leucina. Después de la GPIIb/IIIa es la mayoritaria en la membrana de la plaqueta ($1 - 3 \cdot 10^4$ moléculas /plaqueta). Las subunidades GP1 a y b y la GPIX son codificadas por genes diferentes, localizados en cromosomas diferentes. La región extracelular posee los dominios de identificación de la trombina y el vWF. Las diferentes porciones de este complejo tienen una función: la región extracelular facilita el acceso al subendotelio y la interacción con trombina y vWF; la región intracitoplasmática une los dominios funcionales extraplaquetarios con el citoesqueleto de actina; la región transmembrana actúa como anclaje de la glicoproteína en la membrana plaquetaria.¹⁹

El citoplasma contiene partículas de glucógeno diseminadas o aglomeradas que constituyen la fuente energética de esta célula. Contiene ribosomas en muy pocas cantidades, fundamentalmente en las células jóvenes, lo que concuerda con la casi nula actividad de síntesis proteica. Soporta, además, los microtúbulos que aparecen en forma de circunferencia, ubicados de manera concéntrica y que mantienen la forma discoide de la célula y garantizan su resistencia a la deformación.¹⁹

El citoesqueleto es un gel viscoelástico que contiene filamentos de actina entrecruzados, conectados a la GPIb por proteínas de unión de actina. Tiene como funciones: a) la regulación de las propiedades de la membrana, tales como sus contornos y estabilidad, junto a los microtúbulos propicia el mantenimiento de la forma de la plaqueta en reposo, b) mediación de la distribución lateral de las glicoproteínas recep-

toras en la membrana, c) constituyen una barrera para la exocitosis. Su alteración puede llevar a la fragmentación del citoplasma formando micropartículas.²⁰

El gel contractil está formado por largos filamentos de actina enrejados, conectados con el citoesqueleto submembranoso y miosina que se encuentra en forma no polimérica en la célula en reposo. Constituye el cuerpo de los organelos celulares, los cuales se desplazan hacia el centro de la célula a consecuencia de la contracción del gel.²⁰

El sistema canalicular abierto está formado por canales ramificados, se conecta a la membrana externa y posee características similares a ella en cuanto a su composición. A través de este sistema se transportan las GPIIb/IIIa y la GP1b hacia los gránulos alfa.

El sistema tubular denso es un sistema de membranas que aparece en la vecindad de los microtúbulos y rodea los organelos, con apariencia, y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio, de forma similar a los túbulos del músculo esquelético y por un mecanismo más rápido que el de las mitocondrias. También posee ATPasas, enzimas del metabolismo del ácido araquidónico y adenilato ciclasa. Las plaquetas poseen organelos inespecíficos, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que tienen características y funciones similares a los de otras células pero, además, portan organelos específicos, que son los gránulos alfa y los gránulos densos.²¹

Los gránulos alfa son organelos esféricos de 140 nm a 400 nm en diámetro, contienen más de 30 proteínas bioactivas (Tabla 1).⁹ Constituyen un 15 % del volumen total de las células. Sus membranas contienen GPIIb/IIIa, pequeñas cantidades de GPIb, GPIX y P selectina. Tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas, de ahí que la cantidad de gránulos alfa (como promedio 35-40) determina el valor funcional de la célula. También participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido.²⁰

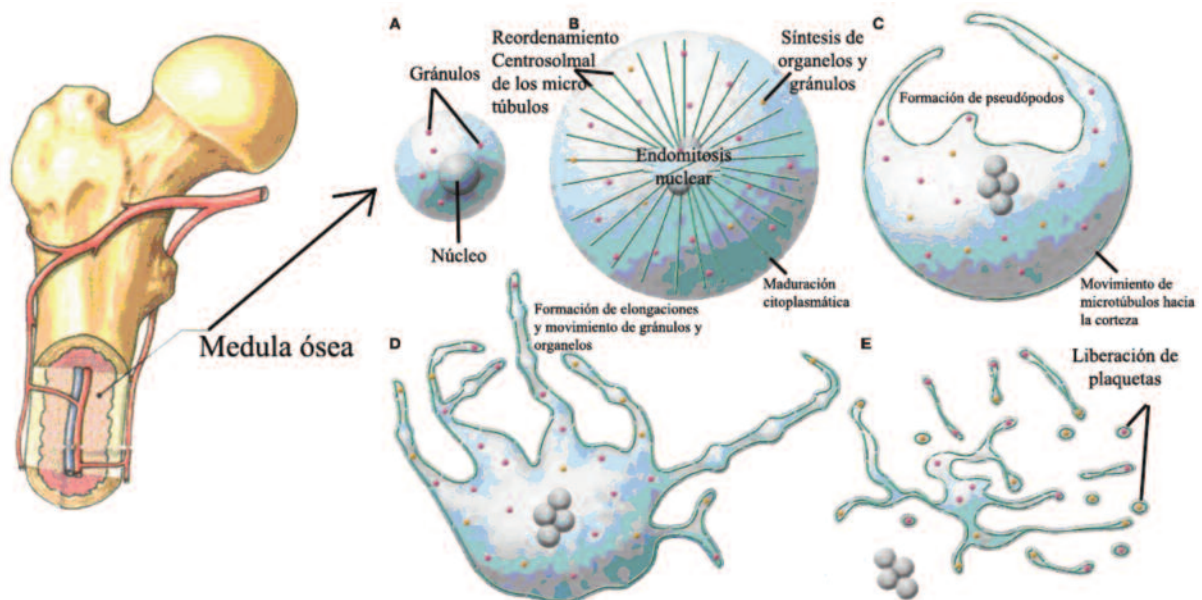


Figura 1. Proceso de formación de las plaquetas a partir de los megacariocitos. El proceso de maduración de los megacariocitos parte de células inmaduras (A) hasta llegar a la liberación de las plaquetas (E). En la fase B ocurre la endomitosis nuclear, la síntesis de organelos y la maduración y expansión citoplasmática, además tiene lugar el reordenamiento centrosomal de los microtúbulos. En la fase C, los microtúbulos se desensamblan y migran hacia la corteza. Se inicia la formación de las pro-plaquetas con la emisión de pseudópodos (D). Toda la masa del megacariocito se transforma en pro-plaquetas que se liberan (E). Modificado de Partel et al. (2005).³

Tabla 1. Algunos factores de crecimiento liberados de las plaquetas y sus funciones.

Factor	Células*	Blanco	Efectos biológicos
PDGF**	Plaquetas, macrófagos, monocitos, células endoteliales, músculo liso.	Fibroblastos, músculo liso, células gliales, macrófagos, neutrófilos.	Estimula la síntesis de proteínas y ADN en tejido óseo. Efecto mitogénico en células mesenquimales. Efecto angiogénico en células endoteliales. Facilita la formación de colágeno tipo I.
VEGF***	Plaquetas, células del mesénquima y del estroma.	Células endoteliales, monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales.	Quimiotaxis y proliferación de células endoteliales. Hiper-permeabilidad de los vasos sanguíneos. Potente inductor de la formación de vasos sanguíneos.
TGF-β	Plaquetas, Linfocitos T, macrófagos/monocitos, neutrófilos.	Fibroblastos, células estromales de la médula ósea, células endoteliales, pre-osteoblastos.	Estimula la angiogénesis. Estimula la formación de tejido óseo. Estimula la síntesis de la matriz celular. Quimiotáctico para osteoblastos. Estimula la quimiotaxis endotelial. Inhibe los osteoclastos.
PDAF	Plaquetas, células endoteliales.	Células endoteliales.	Efecto mitogénico sobre células endoteliales. Incrementa la angiogénesis y la permeabilidad capilar.
IGF-1	Osteoblastos, macrófagos, monocitos, condrocitos.	Fibroblastos, osteoblastos, condrocitos.	Estimula la proliferación de osteoblastos y la síntesis de la matriz. Incrementa la expresión de proteínas de la matriz ósea (e.j. osteocalcina). En combinación con PDGF mejoran la calidad de la cicatrización.
EGF	Queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, plaquetas (~105 pg/10 ⁶ células).	Células epiteliales, células endoteliales.	Mitógeno, proapoptótico, quimiotaxis y diferenciación de células epiteliales, renales, gliales y fibroblastos.
FGF	Fibroblastos, queratinocitos, Astrocitos, plaquetas (FGF2, bFGF).	Fibroblastos.	Aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN. Proliferación y diferenciación de los osteoblastos. Inhiben los osteoclastos. Proliferación de fibroblastos e inducción de la secreción de fibronectina por estos. Pro-angiogénesis por acción quimiotáctica sobre células endoteliales.
PF-4	Plaquetas.	Fibroblastos, neutrófilos.	Quimiotáctico para neutrófilos y fibroblastos.

Leyenda: * Células que lo liberan; PDGF, factor de crecimiento derivado de la plaqueta; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; TGF-β, factor de crecimiento transformante beta; PDAF, Factor angiogénico derivado de la plaqueta; IGF-1, factor de crecimiento insulínico tipo 1; EGF, factor de crecimiento epidérmico; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; PF-4, Factor plaquetario 4. ** Existen cinco isoformas diferentes de PDGF que activan la respuesta celular a través de dos receptores. Los ligandos conocidos incluyen A, B, C y D y un heterodímero AB con receptores alfa (PDGFRA) y beta (PDGFRB). *** VEGF incluye las proteínas homodiméricas VEGF-A (que es la que se designa normalmente al hablar de VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF (placental growth factor).

Los gránulos densos se caracterizan por su alta densidad que le confieren el elevado contenido en calcio (50 % del total, en una concentración 2 mol/L) y fósforo inorgánico.¹⁹

Aspectos fisiológicos de las plaquetas

Las plaquetas se caracterizan por un elevado consumo de oxígeno, es 6 veces superior al de las células musculares en reposo. La fuente de energía es la glucosa. Incorporan a su interior (por un mecanismo independiente de energía) fragmentos de membrana que contienen GPIIb/IIIa y también fibrinógeno y (por un mecanismo dependiente de energía) fragmentos de membrana que contienen GPIb, esto permite

la regeneración de los receptores de membrana.

Estas células concentran la mayoría de la serotonina de la sangre la cual toman unida a calcio mediante transporte activo. También toman del plasma ligandos como fibrinógeno, colágeno, fibronectina y aminas biógenas.²⁰

Activación plaquetaria. La participación de las plaquetas en los procesos de hemostasia y trombosis depende de la ocurrencia de 3 eventos: el enlace plaqueta - superficie o adhesión plaquetaria; el cambio de forma y el enlace plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria.

Adhesión plaquetaria: Las plaquetas son capaces de adherirse a superficies artificiales, sobre las cuales se expanden. Utilizan como ligando al fibrinógeno, a través de su unión a GPIIb/IIIa. También se adhieren al colágeno (fundamentalmente de los tipos I y III), vWF, fibronectina y laminina. En condiciones de bajo flujo sanguíneo, este evento es mediado por la interacción vWF-GPIb, pero en condiciones de alto flujo también se requiere la participación de GPIIb/IIIa. Se forman enlaces firmes que dependen de la estructura fibrilar del colágeno y de la cantidad de subunidades RGD. La adhesión plaquetaria al colágeno requiere de la interacción del colágeno con vWF del plasma, GPIb, GPIIb/IIIa de la membrana de la plaqueta que durante la formación del coágulo establecen enlaces plaqueta-fibrina. Se produce la internalización de las mallas de fibrina o de colágeno, que son rodeados de microfilamentos.

Cambio de forma: La primera manifestación física de la activación plaquetaria es el cambio de forma de discocito a esferocito, que se acompaña de un incremento en la superficie desde 8,02 mm² (en la plaqueta en reposo) a 13,0 mm² (en la plaqueta activada). Disminuye la longitud del subesqueleto submembrana cuya evaginación aporta membranas para este proceso.

Se produce la redistribución de los microtúbulos, lo que le confiere la característica de deformabilidad celular y la posibilidad de emitir pseudópodos. Los microtúbulos que están en estrecho contacto con el gel contráctil, se trasladan hacia el centro de la célula. Se procede a la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa. Es un proceso independiente de calcio (cuando el estímulo es el ADP) y dependiente de energía.¹⁸

Agregación plaquetaria. Los estímulos fisiológicos para la activación plaquetaria son la trombina, el colágeno, el ADP, la epinefrina, el tromboxano A₂ (TXA₂). Los eventos posteriores tienen elementos comunes y otros que lo diferencian. En el caso de la trombina, el ADP y el TXA₂, se trata de receptores acoplados a proteínas de unión a nucleótidos de guanina (proteínas G). El de trombina es una glicoproteína con 7 dominios transmembrana, de la cual hay de 1 500 a 2 000 copias que se desensibilizan rápidamente al producirse la activación las cuales no son recuperables. El receptor del ADP es purinérgico, él se caracteriza por responder con activación frente al ADP y con inhibición frente al ATP. Su estructura no ha sido identificada y por mucho tiempo se ha denominado farmacológicamente como receptor P₂T. Sin embargo, algunas evidencias experimentales recientes, sugieren que se trata de 3 receptores, uno P₂Y₁, igual al que media la vasodilatación y que es causante del aumento del calcio citoplasmático, el cambio de forma y la agregación plaquetaria, otro P₂Y₁ cyc, que media la inhibición de la adenilciclase y uno P₂X₁ (no acoplado a proteína G) con una menor significación.¹⁸

Se plantea que al menos una glicoproteína, la GPVI, actúa como receptor para la fase de activación inducida por el colágeno y que su estimulación es una señal para una fosfolipasa C. Un evento que sigue a la activación es el incremento de la concentración de calcio citoplasmática, cuyo mecanismo bio-

químico no ha sido determinado totalmente en la mayoría de los casos. Con respecto a la trombina, el colágeno y el TXA₂, se ha demostrado la ocurrencia de activación de la fosfolipasa C, que da lugar a la formación de 1,4,5 trifosfato de inositol (que libera calcio del sistema tubular denso y activa una miosina cinasa) y 1,2 diacilglicerol (que activa la proteína cinasa C, que desencadena una serie de fosforilaciones de proteínas que parecen importantes para el proceso de agregación plaquetaria). En el caso del TXA₂ se cree que también hay entrada a la célula del calcio extracelular a través de una intensificación del intercambio Na⁺/H⁺ de lo cual depende más de la mitad del incremento del calcio citoplasmático.

La trombina, el ADP y la epinefrina inducen inhibición de la actividad adenilciclase en la plaqueta, cuya implicación en el resultado final no está bien determinado. Se desconocen los mecanismos bioquímicos que llevan a la activación de la GPIIb/IIIa y el enlace del fibrinógeno, pero hay evidencias de que este último es independiente del calcio. La activación plaquetaria por agentes como trombina, colágeno, ADP y epinefrina, puede conducir a la activación de la fosfolipasa A₂ citoplasmática, que requiere concentraciones fisiológicas de calcio para activarse, la cual cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y da lugar al ácido araquidónico que se metaboliza preferencialmente por la vía de la TXA₂ sintetasa para dar lugar al TXA₂, producto inestable (sólo 5 s dura su actividad) cuyos precursores, los endoperoxidos cíclicos, son también capaces de activar el receptor. De esta manera el TXA₂ constituye un amplificador de la señal de activación plaquetaria.²⁰

Después de un estímulo fuerte los gránulos alfa y densos se alargan y emiten pseudópodos, se aproximan a la membrana plasmática (lo que es posible debido a la disolución del sistema canalicular abierto), se funden con la membrana, aumentan de volumen debido a la entrada de agua y esto propicia la liberación de su contenido al medio exterior, lo que se denomina secreción.

Un elemento que distingue a los agentes inductores de agregación de la plaqueta es el peso relativo que tienen la síntesis de TXA₂ y la secreción en el resultado final. Por ejemplo, la agregación inducida por trombina, es resultado fundamentalmente de la señal dada por la activación de su receptor, ya que no es afectada por la inhibición que ejerce la aspirina sobre la síntesis del TXA₂. El ADP produce una primera fase de agregación reversible, de aproximadamente 30 s de duración y que es consecuencia de la señal de activación del receptor, a lo que sigue una segunda fase irreversible y que depende de la síntesis de TXA₂. El TXA₂ parece requerir de la liberación de ADP. La conocida susceptibilidad a la aspirina de la agregación inducida por colágeno, sugiere la importancia de la liberación de TXA₂ en su mecanismo de activación plaquetaria. La epinefrina se considera un agonista débil que amplifica el efecto de otros estímulos a través del incremento de la concentración de calcio intracelular y de la actividad adenilato ciclase.

Los concentrados de plaquetas

Los concentrados de plaquetas fueron originalmente utilizados en medicina transfusional en el tratamiento o prevención de hemorragias a causa de una severa trombocitopenia. Los concentrados estándares de plaquetas a transfundir se denominaron PRP y su concentración era de 0,5•10¹¹ plaquetas por unidad.²² Las potencialidades del uso de productos derivados de la sangre para estimular la cicatrización y sellar heridas fue descrito por primera vez en 1970.²³ Se trataba fundamentalmente de concentrados de fibrinógeno cuya polimerización se inducía con calcio o trombina. Por su alto contenido en factores de crecimiento el uso de las plaquetas en acelerar el proceso de cicatrización resulta muy atractivo y se ha venido utilizando en los últimos años en la práctica clínica.²³

El uso de los concentrados de plaquetas cuenta con protocolos diversos, un punto en común es que se obtienen por lo general a partir de sangre con anticoagulante y se procesan de manera usual como máximo una hora antes de ser administrados. Uno de los pasos más comunes es la centrifugación inicial de la sangre, cuyo objetivo es obtener diferentes fracciones: 1) Fracción correspondiente a los glóbulos rojos (sedimento), 2) Capa leucocitaria, 3) Fracción de plasma acelular que teóricamente se subdivide en a) Zona rica en plaquetas o PRP y b) Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) (Fig. 2). Otro método implica la extracción del sobrenadante (descartando los eritrocitos) del primer centrifugado y la re-centrifugación a mayores gravedades.²⁴ Un método alternativo a la centrifugación es la filtración, para lo cual se emplean dispositivos apropiados, se plantea que este método requiere un 40% menos de tiempo y que es menos traumático para las plaquetas, mientras que se obtienen concentraciones similares de plaquetas y factores de crecimiento.⁹

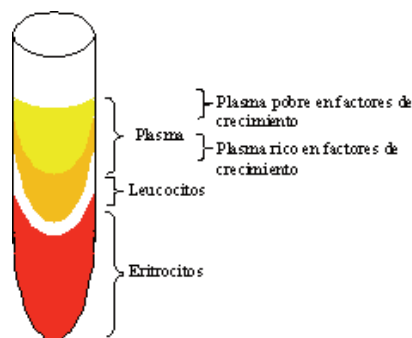


Figura 2. Fracciones que se obtienen tras la centrifugación de la sangre. El protocolo clásico²⁵ describe la centrifugación de 5 mL de sangre tratada con citrato (8 min a 460 g) mediante la cual se distinguen tres fracciones fundamentales: 1) Fracción eritrocitaria, 2) Capa leucocitaria y 3) Plasma acelular. Esta última fracción puede sub dividirse en dos sub fracciones: a) Fracción rica en factores de crecimiento y b) Fracción pobre en factores de crecimiento. En un segundo momento, se extrae la fracción rica en factores de crecimiento y se añaden los activadores. Modificado de Dohan et al. 2009.²⁵

Las técnicas de obtención pueden variar también en dependencia de su obtención manual o con dispositivos creados al efecto, pasando por sistemas abiertos como el PRGF (creado por Anitua en 1999^{26,27}) que es sencillo pero exige trabajar en medio estéril como flujo laminar, campana de vacío o en quirófano. Otros métodos que existen en el mercado son cerrados o semi cerrados siendo su coste variable según la casa comercial (e.j. BTI, GPS de BIOMET, AGF de MBA, PReGF de Harvest, PRO-TEAL, GMP, Orthogen, entre otros).

El uso de los preparados de plaquetas está sujeto a numerosas variables, las cuales incidirán en su eficacia clínica. Algunas de estas variables son: concentración de plaquetas que se logra, técnica de obtención, concentración de proteínas secretadas, manipulación y aplicación clínica. Sobre la cantidad de plaquetas que se obtiene con distintos métodos se han reportado variaciones que van desde 2 a 8,5 veces el valor basal. En cuanto a este aspecto se refiere que para obtener óptimos resultados se requiere concentrar las plaquetas entre 3-5 veces por encima del valor basal.²⁸ Teniendo en consideración que un individuo normal tiene alrededor de 200 000 plaquetas/ μ L un concentrado de plaquetas con 1 000 000 plaquetas/ μ L sería óptimo con fines terapéuticos.²⁹ Se ha demostrado que concentraciones superiores no incrementan el efecto, en cuanto a la cicatrización de heridas se refiere.¹³

Los preparados de PRP son estables en las soluciones anticoagulantes durante 8 h. Antes de aplicarlos, se deben activar, por lo general añadiendo 1000 U de trombina (activador que polimeriza la fibrina en un gel insoluble que origina la degranulación de las plaquetas y la liberación de los factores de crecimiento) o una solución de cloruro de calcio al 10 %. La adición de estos componentes provoca la liberación inmediata de los factores de crecimiento. Tras 15-20 min después de añadir el cloruro de calcio se forma un gel inestable que debe ser utilizado de manera inmediata. Si se coloca el PRP sin activador la liberación de los factores tiene lugar en los tejidos de manera lenta.

Antes de su aplicación. Según sea el tiempo y temperatura tras la activación, se puede obtener desde un líquido para infiltración, hasta un compuesto sólido gelatinoso maleable útil para sellar o compactar (gel de plaquetas o coágulo). Si solo interesase el gel adhesivo sin factores, puede activarse PPP obteniéndose un coágulo de fibrina.

Los rendimientos que se obtienen al centrifugar la sangre son variables y depende entre otros del valor de hematocrito individual. Como referencia con la centrifugación (460 g) de 8 mL de sangre total se obtiene 1 mL de plasma pobre en factores de crecimiento y 1 mL de plasma rico en factores de crecimiento. La cantidad de PRP a preparar dependerá de su uso final. En el proceso de preparación se deben tener en cuenta que para tratamientos quirúrgicos el lugar de preparación será un quirófano. Para infiltraciones, se podrá realizar en una sala de curas cuidando al máximo la asepsia. El paciente se preparará con 15 días de antelación recetándole un multivitamina (sobretudo vitamina C). Si es fumador se le solicita que no fume o lo haga menos durante 15 días.

La extracción sanguínea se realiza al paciente unos minutos antes de comenzar con el procedimiento terapéutico a realizar. La cantidad dependerá del defecto a tratar. A manera de ejemplo, si la técnica requiere el uso de heparina, la jeringuilla se carga previamente con 30 UI/mL de heparina y se extraen 20 mL de sangre con aguja tipo mariposa 21 a 18 G. La extracción debe realizarse en modo de evitar la hemólisis, se aspira delicadamente. La sangre se trasfiere al contenedor que se utilizará para centrifugar vertiéndola por la pared interior delicadamente, en modo de evitar la formación de espuma (hemólisis). La separación del plasma se realiza generalmente mediante centrifugación durante 8 min a 200-460 g. En este caso se usa una centrifugación a bajas gravedades que permita concentrar las plaquetas en el plasma que se encuentra más próximo a los hematíes. Al final del proceso se obtiene un estimado de 10 mL de plasma, de los cuales de 6 mL a 7,5 mL corresponderá a PPP y 2,5 mL a 4 mL PRP por cada tubo de sangre anticoagulada. Aunque debido al hematocrito del paciente, se obtenga mayor volumen total, sólo se aprovecharán como máximo 4 mL de PRP. Las plaquetas que se extraen por succión se encuentran en la zona central del plasma y hacia la zona más próxima al paquete eritrocitario. Si se incrementa la velocidad de centrifugación estas sedimentan y no se pueden extraer. Si se desea hacer una segunda centrifugación del sobrenadante de la primera, se emplean 3000 g, en este caso hacia la zona baja del tubo se concentran las plaquetas y hacia la parte superior encontraremos el PPP.

Inconvenientes prácticos

Es posible que después de centrifugar se observe un plasma blanquecino con aspecto sebáceo. Esto puede tener dos posibles orígenes: que el paciente esté en plena digestión tras una ingesta de grasas o que padezca de dislipidemia. Este plasma no debe utilizarse nunca para infiltraciones. También es posible encontrar un color rosáceo, esto se debe a una extracción de sangre traumática que provoca una liberación de tromboplastina tisular, dando lugar a micro-coágulos que retienen algunos hematíes. Este plasma tampoco se recomienda que se use. El plasma ideal es de color amarillento traslúcido.

Otra posible complicación es que durante la extracción de sangre ésta salga con exceso de velocidad creando hemólisis. Este plasma será rojizo y se deberá desechar. Esto se evita haciendo la extracción con un catéter de calibre adecuado.

Clasificación de los concentrados de plaquetas

El uso de los concentrado de plaquetas se guía por diferentes protocolos lo que trae aparejado resultados clínicos variables debido al empleo de concentrados con diferentes características biológicas y con tipos de aplicaciones diversos. Se ha propuesto una clasificación de los preparados ricos en plaquetas en las siguientes categorías: 1) P-PRP, plasma rico en plaquetas puro; 2) L-PRP, Plasma rico en leucocitos y plaquetas; 3) P-PRF, plasma rico en plaquetas y fibrina y 4) L-PRF, plasma rico en leucocitos plaquetas y fibrina. Para la obtención de cada uno de estos concentrados existen dispositivos disponibles en el mercado o métodos manuales. Los métodos manuales tienen como desventaja la variabilidad que induce la habilidad del operado para aspirar el plasma, mientras que los métodos automáticos son más precisos pero incrementan los costos del procedimiento notablemente.

Con relación a los agentes inductores de la coagulación existen también variaciones, por ejemplo se usa gluconato de calcio o batroxonina (enzima que lisa fibropéptidos e induce la polimerización en ausencia de trombina bovina, la gelificación tiene lugar en 10 min).

La obtención del L-PRF tiene la particularidad de que no se emplean ningún agente anticoagulante. En esencia se centrifuga a baja velocidad la sangre total y se deja en reposo. El proceso natural de coagulación se activa y como consecuencia dentro del tubo se obtienen tres fases: en el fondo la capa eritrocitaria, en el centro un coagulo que atrapa la mayor parte de las plaquetas y leucocitos, y en la fase superior el suero. El coagulo formado es estable y se utiliza como material de relleno en cirugía de la cavidad oral,³⁰ maxilofacial^{31,32} y cirugía plástica.³³ Este método tienen numerosas ventajas pues permite obtener de manera económica y rápida material para el relleno de cavidades.

La mayor parte de los estudios realizados hasta el momento con PRP han utilizado protocolos seleccionados bajo bases empíricas. El PRP ha sido obtenido por los procedimientos descritos pero con grandes variaciones, por ejemplo la fuerza centrífuga utilizada varia de 160 g a 3000 g y el tiempo de centrifugación de 3 min a 20 min. Es por lo anterior que es difícil definir si los resultados que actualmente han sido publicado han usado P-PRP o L-PRP. Estudios in vitro demuestra que en efecto los PRP estimulan la proliferación de distintos tipos de células (e.g. osteoblastos, fibroblastos, células del tendón, condrocitos, ligamento periodontal, células madres mesenquimales del hueso).²² Pero al mismo tiempo otros estudios del mismo tipo han encontrado resultados contradictorios.³⁴ Lo mismo tiene lugar para los efectos relacionados con la diferenciación celular inducida con PRP.^{35,36} La variabilidad en los resultados parece depender del número de plaquetas que contienen los PRP, planteándose en general que existe un número óptimo por encima del cual los efectos inductores serian negativos. Por otra parte, la diferencia fundamental en cuanto a los preparados L-PRP y P-PRP la determina el papel potencial de los leucocitos en los procesos de proliferación, diferenciación, inmunitarios y en la respuesta a infecciones, pero en la práctica la aplicación de métodos donde no se ha controlado el número de leucocitos en los preparados impide discernir entre la utilidad de uno u otro tipo de preparados.

Algunos autores han recomendados sin una demostración experimental la eliminación de los leucocitos de los PRP, mientras que otros lo aconsejan. Estos últimos tienen en consideración el papel de los leucocitos en los procesos de respuesta inmune, respuesta a infecciones y secretor de VEGF. Investiga-

ciones recientes han demostrado que el uso de L-PRP estimulan el anabolismo y la remodelación de tendones³⁷ y pudieran ser de utilidad en el tratamiento de la tendinitis.⁵ Han sido utilizado además en la cicatrización ósea³⁸ y en el control del dolor y la inflamación.⁵ Aunque se ha lanzado la hipótesis sobre el papel sinérgico que podrían tener los leucocitos y las plaquetas hasta el momento no existen estudios sólidos que lo demuestren.

Algunos de los productos del PRP presentan efectos antibacterianos contra *Staphylococcus aureus*³⁹ e incluso antiinflamatorios mediados por el bloqueo de la proteína MCP-1 y la generación de lipoxina A4.⁴⁰ Esto hace que los pacientes presenten en general menores índices de inflamación y expresen menos sensación de dolor en su recuperación funcional. Los resultados anteriores pudieran relacionarse con la presencia de leucocitos en el PRP utilizado.

Anitua defiende la no inclusión de leucocitos,²⁷ argumentando que alteran la función de algunos factores de crecimiento e interfieren en la acción antiinflamatoria. Otros, como Smart PRePTM system (Harvest Technologies Corporation, Munich, Alemania) alegan que carece de importancia este detalle y además su PRP contiene algunos hematíes. Otros autores prefieren la inclusión de leucocitos para el tratamiento de las úlceras u otras cirugías ya que consideran que tiene un efecto antimicrobiano y desinfectante.

La presencia de fibrinógeno y la densidad del gel o coagulo es también un factor determinante. De esto dependerá la velocidad de liberación de las citocinas y por tanto su efecto final.

Seguridad

Dado que los PRP son preparados autólogos, su administración es segura y no está sujeta a la transmisión de enfermedades como HIV, Hepatitis, entre otras. Los PRP son bien tolerados por los pacientes. Cuando se emplea trombina bovina como agente acelerador de la coagulación existe la posibilidad de la inducción de anticuerpos contra esta proteína, no obstante el proceso de producción actual de la trombina para estos fines, elimina el factor Va que es el antígeno responsable.

El uso de PRP está contraindicado en pacientes que padecen de trastornos de la coagulación (trombocitopenia, hipofibrinogenia o que reciben terapia anticoagulante), que poseen hipersensibilidad a productos bovinos (en el caso que se use la trombina), o anestésicos locales (en el caso que se use alguno). Ante la sospecha de lesión precancerosa o cancerosa, lo prudente, es no aplicarlos.⁹ En casos en los que el conteo de plaquetas sea inferior a $100 \cdot 10^3$ plaquetas / μL , embarazo o lactancia el procedimiento está contra indicado.

El paciente debe ser informado de la posible presencia de síntomas indeseables temporales después de la inyección (dolor local, eritema). Esta respuesta se produce de manera natural debido a la estimulación de los mediadores de la inflamación. En general los eventos adversos son mínimos, pero los riesgos comunes a cualquier inyección como: infección local, daño neurovascular, entre otros, pueden ocurrir de manera remota.⁴¹

Aplicaciones clínicas

Las aplicaciones terapéuticas del PRP son muy diversas. Se utilizó hace años en cirugía como coagulante, sellante y compactante de injertos óseos. En los últimos tiempos se sugieren nuevas terapias fundamentadas en el potencial regenerativo y antiinflamatorio de los factores de crecimiento contenidos

en las plaquetas y que estas liberan al activarse. También se utiliza junto a auto o aloinjertos óseos o con algún sustrato de fosfato tricálcico u otro material de relleno óseo combinado con células madre, en casos de falta de consolidación ósea.

Se están desarrollando estudios, tanto a nivel pre-clínico como clínicos, destinados a generar evidencia científica de los efectos antiinflamatorios, analgésicos y/o regenerativos del PRP infiltrado en articulaciones artrósicas, tendinitis, ligamentoplastias y otras lesiones musculoesqueléticas.

Desde hace más de 10 años que se viene aplicando el PRP en medicina deportiva: lesiones musculares, tendinosas y también en trastornos degenerativos: artrosis, condropatías y problemas de cicatrización. La indicación ideal en la artrosis es aquel paciente que no es sensible a los tratamientos convencionales y que por razones varias (edad, riesgo quirúrgico, entre otros), no procede una cirugía radical como la artroplastia total o prótesis. También el deportista con problemas de condropatía puede recuperar sus prestaciones habituales con este tratamiento.

Está indicado en aquellas situaciones en que se precise estimular la regeneración celular. Sobre todo cuando existe degeneración de partes blandas: tendinitis degenerativas, degeneración discal, fascitis, degeneración del cartílago. Se está utilizando con éxito actualmente en:

- Condropatías, osteocondritis y artrosis
- Lesiones de ligamentos de la rodilla u otras articulaciones
- Ligamentoplastias
- Lesiones musculares y tendinosas
- Consolidación ósea
- Implantación de prótesis articulares
- Cicatrización de úlceras y heridas
- Lesiones corneales
- Implantes dentales
- Regeneración cutánea: úlceras de decúbito, retardos de cicatrización, medicina estética.

Cabe destacar su utilización en lesiones del tendón de Aquiles en las lesiones ligamentosas de la rodilla como la del ligamento cruzado anterior y ligamentoplastias, en la fascitis plantar, en la epicondilitis del codo, fracturas, pseudoartrosis y fusión intervertebral en la patología del manguito rotador del hombro. Y por supuesto en la patología del cartílago y la artrosis. En cirugía se utiliza además por su acción antiinflamatoria, antiedematosa y antihemorrágica. Otros autores resaltan su acción antimicrobiana.

En las lesiones cutáneas u otros procesos cicatriciales se aprecia un aumento en la rapidez y calidad de la cicatrización. En la tabla 2 se resumen algunos ejemplos de los resultados de un grupo de estudios que soportan el uso de los PRP.

Tabla 2. Ejemplos de estudios sobre aplicaciones del plasma rico en plaquetas.

Aplicación	Características del estudio	Resultado	Bibliografía
Hueso	33 pacientes sometidos a reconstrucción mandibular.	Comprobación radiológica de la aceleración de la consolidación ósea (4 semanas contra 6 en el grupo control).	Tayapongsak <i>et al.</i> 1994. ¹
	PPR junto a injerto óseo autólogo.	Incrementó en el doble la formación ósea y en un 25 % la densidad.	Marx <i>et al.</i> 1998. ²
	Fractura en el diabético.	Acelera la cicatrización y disminuye las complicaciones.	Grant <i>et al.</i> 2005. ⁴
Tendón	140 pacientes con epicondilitis lateral del codo.	Mejora significativa y sostenida después del tratamiento.	Mishra <i>et al.</i> 2006. ⁵
	28 pacientes con epicondilitis refractaria.	Mejoría en 79 %.	Edwards y Calandruccio 2003. ⁸
Articulación	71 pacientes tratados y 61 control después de una artroplastia de rodilla.	En los tratados mejoró la recuperación, no ocurrió infección y el dolor disminuyó.	Berghoff <i>et al.</i> 2006. ¹⁰
Agente hemostático	Aspersión de PRP sobre la herida. Modelo animal en cerdos.	Reducción del sangramiento a los 5 min, superior en un 70 % en los casos tratados con respecto al placebo.	Pietrzak <i>et al.</i> 2007. ¹²
Cicatrización	171 pacientes destinados a amputación.	En un 78 % se evitó la amputación.	Caino <i>et al.</i> 1993. ¹⁶
	Pacientes con pie diabético (72).	68,4% pacientes (13/19) cicatrizaron comparados con el 42,9 % (9/21) en el grupo control (suero fisiológico).	Drive <i>et al.</i> 2006. ¹⁷
	10 pacientes sometidos a cirugía maxilofacial	Incremento en la cicatrización en el área tratada con PRP	Lindeboom <i>et al.</i> 2007. ¹⁷

El ozono como activador las plaquetas

Liberación de factores de crecimiento

Estudios realizados por el Dr. Bocci(1999)¹⁴ y Re (2010)¹⁵, han demostrado que la ozonización del plasma heparinizado promueve la agregación plaquetaria acentuando así la liberación de sus factores de crecimiento. Se observó una gran diferencia entre la sangre anticoagulada con citrato o con heparina. El estudio del Dr. Bocci¹⁴ se realizó a diferentes concentraciones: 20 µg/mL, 40 µg/mL y 80 µg/mL de ozono, con mediciones tras 2 h, 4 h y 8 h de incubación. Constató que cuando se utiliza heparina, aumenta la agregación plaquetaria en un 20 % con una concentración de ozono de 40 µg/mL y en un 68% cuando la concentración es de 80 µg/mL.

Los factores de crecimiento derivados de las plaquetas que se estudiaron fueron: PDGF AB, se libera especialmente cuando la sangre está heparinizada, a partir de 40 µg/mL de ozono, superando en más del doble a lo que se libera si la sangre se trata con citrato, las concentraciones más elevadas se alcanzaron a partir de las 2 h de incubación. TGF beta1, se libera de manera creciente desde la primera hora hasta la cuarta, con una mayor expresión a las 4 h en el grupo donde se heparinizó la sangre y se trató con 80 µg de O₃. IL-8, se libera a las 4 h, se supone que es el tiempo que necesita su síntesis. TBX2, se libera desde la primera hora de incubación, los valores a las 2 y 4 h son similares y las diferencias en cuanto a su liberación dependiente del anticoagulante se registraron solo para 2 h de incubación a las concentraciones de 20 µg de O₃ y 80 µg de O₃ a favor del citrato.¹⁴ Por otra parte, la presencia de FGF es independiente del anticoagulante y se activa de igual modo con cloruro de calcio que con el ozono.¹⁵

El efecto anticoagulante de la heparina se ejerce a través de la activación de la antitrombina III. La heparina se une al inhibidor de la coagulación antitrombina III, produce un cambio conformacional de la molécula que acelera más de 1000 veces la unión de la antitrombina III a los factores activados, principalmente la trombina y el factor Xa, con menor intensidad al XIa y XIIa (complejo heparina-antitrombina se une finalmente a la trombina). Esta unión inactiva las proteasas de la coagulación de suero. La inhibición de la activación mediada por trombina de los factores V y VII es de importancia fundamental

para el efecto anticoagulante. La heparina es anticoagulante con efectos in vivo, e in vitro.

El citrato sódico (10 mL 3,3% puede anti coagular 100 mL de sangre) es sólo anticoagulante in vitro por ser un secuestrador de los iones de calcio, y no tiene efecto sistémico.

Los métodos convencionales de activación de las plaquetas usan citrato debido a que el cloruro de calcio que se añade para la activación, satura la capacidad quelante del citrato y activa el proceso de formación del coagulo. Por tanto, cuando se trate de activar el PRP con O₃ y se necesite del coagulo (ej. para rellenar cavidades) deberá usarse como anticoagulante citrato, mientras que cuando la mayor importancia la tiene lograr un plasma más rico en factores (ej. para inyecciones sub cutáneas en piel) deberá usarse heparina.

La combinación de ambas técnicas, activación con calcio y ozono, acelera la activación de las plaquetas. Al ozonizar el PRP se forman ozónidos y otros derivados, que difunden en el interior de la plaqueta, se activa la fosfolipasa C y la A₂ (dependiente de calcio), facilitando la formación de sustancias pro-agregantes (PGE₂, Tromboxano, etc). Con ello se consigue no solo liberar los factores de crecimiento más rápidamente, sino que la formación de peróxidos despliega muchas rutas metabólicas curativas que estaban silentes.

Procedimiento de ozonización del plasma

De manera general se carga en una jeringa un volumen de ozono similar al volumen de PRP obtenido, las concentraciones de O₃ van de 40 µg/mL a 80 µg/mL se procede a mezclar con el PPR por un minuto y a continuación se añade el cloruro de calcio. Será la combinación de ambos la que dará una mejor y óptima liberación de los factores de crecimiento.

Formación del coágulo: si el propósito es la formación del coágulo, es de vital importancia respetar las proporciones y nunca poner más cloruro cálcico del indicado, además de obtener el plasma con citrato de sodio como anticoagulante. Para acelerar la coagulación y la formación de fibrina se utiliza una incubadora que eleva la temperatura a 37° C y se incuba durante unos 30 a 40 min. El coágulo obtenido se comportará como una esponja empapada en factores de crecimiento.

En el caso de usar la técnica para la cura de heridas, estas se tratan con ozono (con agua ozonizada o bolsas de ozono), se debridan y se procede a irrigar la úlcera con el PPR no coagulado, se cubre la úlcera con la membrana biológica (fibrina), plasma coagulado y se sella con un apósito hidrocoloide durante 3 días. Este procedimiento se repite cada 15 días.

En aplicaciones para bioestimulación cutánea y tratamientos anti-envejecimiento, se debe inyectar intradérmicamente con técnica de mesoterapia e inmediatamente después de la activación. Se dan 3 sesiones de tratamiento separadas con dos semanas entre sí. Como norma se infiltra en todo el trayecto de la arruga 1 mL de PPR. En rodilla se infiltra entre 6 mL y 8 mL. En codo de 3 mL a 6 mL, en epicondilitis de 2 mL a 3 mL.

El sobrenadante del PRP es también ideal para su uso como colirio. La aplicación del PRP tanto de forma tópica como en colirio ha demostrado ser un procedimiento fiable, seguro y eficaz para restaurar la superficie epitelial de la cornea. La formulación líquida del PRP es empleada además para bioactivar

la superficie de los implantes dentales o para aglutinar injertos. Mientras que el coágulo de PRP es ideal para estimular la regeneración ósea en alveólos postextracción, tratamiento de úlceras, ingeniería de tejidos, entre otros.

Para la artrosis la combinación de la ozonoterapia tradicional con la de PRP potencia el efecto regenerativo del PRP, garantizando su esterilidad y añade los efectos conocidos del ozono como antiinflamatorio y en el control del dolor.

Otra aplicación del plasma es el llamado plasmagel. Este se obtiene del plasma pobre en plaquetas y se utiliza para rellenos. Para su preparación se carga previamente la jeringa con ácido ascórbico 100 mg/mL, a razón de 1 mL por cada 5 mL de sangre que se va a extraer, mezclándose en la jeringa. Después la sangre sin anticoagulante se centrifuga (1800 r·min⁻¹, 8 min). El PRP se carga en jeringuillas de 1 mL y se introduce en agua a 95 °C -98°C durante 3 min, con lo cual el plasma se gelifica por desnaturalización de las proteínas y ese es el material que se utiliza para los rellenos faciales. Se debe prestar especial atención a la desnaturalización de las proteínas, para lograr la formación de un gel con una viscosidad tal que facilite su inyección. Las infiltraciones se hacen por lo general con una jeringuilla de 1 mL y aguja de 27 G. Este procedimiento mantiene su efecto relleno de 3 a 4 meses (comunicación personal, de A. Schwartz).

Una vez hecho los rellenos se utiliza el PRP rico en factores ozonizado para bioestimular. Se repite la bioestimulación con PRP una vez al mes, durante 3 meses y a los 3 meses se revalora el paciente para un nuevo relleno con plasmagel, que en este caso sustituye en gran medida al ácido hialurónico.

La tecnología del PRP abre nuevas perspectivas en el área de regeneración tisular humana y es una inestimable herramienta para tratar una amplia gama de lesiones tisulares, en ortopedia, medicina deportiva, medicina estética, vascular, odontología, implantología, cirugía maxilofacial, oftalmología y otras. La activación de PPR con ozono ha demostrado una gran eficacia desde el punto de vista clínico, así como su combinación con la ozonoterapia convencional. En este campo se acumula una gran cantidad de datos basados en la observación clínica de los practicantes, pero se hacen necesarios el establecimiento de protocolos de trabajo estándares así como el estudio clínico y molecular más profundo de sus efectos.

References

1. Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994 Feb;52(2):161-5; discussion 6.
2. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
3. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3348-54.

4. Grant WP, Jerlin EA, Pietrzak WS, Tam HS. The utilization of autologous growth factors for the facilitation of fusion in complex neuropathic fractures in the diabetic population. *Clin Podiatr Med Surg*. 2005 Oct;22(4):561-84, vi.
5. Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*. 2006 Nov;34(11):1774-8.
6. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993 Mar;7(1):52-62.
7. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Nov;55(11):1294-9.
8. Edwards SG, Calandruccio JH. Autologous blood injections for refractory lateral epicondylitis. *J Hand Surg Am*. 2003 Mar;28(2):272-8.
9. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*. 2008 Jul;22(6):432-8.
10. Berghoff WJ, Pietrzak WS, Rhodes RD. Platelet-rich plasma application during closure following total knee arthroplasty. *Orthopedics*. 2006 Jul;29(7):590-8.
11. Kang YH, Jeon SH, Park JY, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011 Feb;17(3-4):349-59.
12. Pietrzak WS, An YH, Kang QK, Demos HA, Ehrens KH. Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. *J Craniofac Surg*. 2007 May;18(3):559-67.
13. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
14. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm*. 1999;8(4-5):205-9.
15. Re L, Martínez-Sánchez G, Perez-Davison G, Sirito M. Role of Ozone/Oxygen in Fibroblast Growth. Factor Activation. *Discovering the Facts. International Journal of Ozone Therapy*. 2010;9:55-8.
16. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC, Moyles BG. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet-derived growth factors. *J Foot Ankle Surg*. 1993 May-Jun;32(3):263-8.
17. Lindeboom JA, Mathura KR, Aartman IH, Kroon FH, Milstein DM, Ince C. Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing. *Clin Oral Implants Res*. 2007 Feb;18(1):133-9.
18. Mininkova AI. [Platelet structure and functions (a review of literature). Part 1]. *Klin Lab Diagn*. 2010 Nov(11):21-6.

19. Hovig T. Megakaryocyte and platelet morphology. *Baillieres Clin Haematol.* 1989 Jul;2(3):503-41.
20. García MM, Coma CA. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 2000;1(2):132-41.
21. Moreno A, Menke D. Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. *Clin Lab Med.* 2002 Mar;22(1):193-213, vii.
22. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158-67.
23. Matras H. [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr Z Stomatol.* 1970 Sep;67(9):338-59.
24. Tozum TF, Demiralp B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 2003 Nov;69(10):664.
25. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Feb;84(2):415-21.
26. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999 Jul-Aug;14(4):529-35.
27. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007 Nov;28(31):4551-60.
28. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004 Mar;36(1):28-35.
29. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Apr;62(4):489-96.
30. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):e56-60.
31. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Mar;101(3):299-303.
32. Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, Mahler P. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 May;105(5):572-9.
33. Braccini F, Dohan DM. [The relevance of Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) during facial aesthetic

- lipostructure (Coleman's technique): preliminary results]. *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)*. 2007;128(4):255-60.
- 34.Slapnicka J, Fassmann A, Strasak L, Augustin P, Vanek J. Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Feb;66(2):297-301.
- 35.Soffer E, Ouhayoun JP, Dosquet C, Meunier A, Anagnostou F. Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Oct;15(5):581-8.
- 36.Goto H, Matsuyama T, Miyamoto M, Yonamine Y, Izumi Y. Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation following subcutaneous transplantation. *J Periodontal Res*. 2006 Oct;41(5):455-62.
- 37.Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*. 2007 Feb;25(2):230-40.
- 38.Bielecki T, Gazdzik TS, Szczepanski T. Benefit of percutaneous injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *Eur Surg Res*. 2008;40(3):289-96.
- 39.Yang Y, Liu H, Liu G, Ran X. [Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from health volunteers in vitro]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010 May;24(5):571-6.
- 40.El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol*. 2007 Apr;78(4):661-9.
- 41.Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008 Dec;1(3-4):165-74.