

# Sistemas de sangre autóloga basados en plasma: Arthrex ACP<sup>®</sup>, MTF Cascade<sup>®</sup>, y Orthovita<sup>®</sup> CellPaker<sup>®</sup>/Vitagel<sup>™</sup>

Investigación y desarrollo de Arthrex

## Introducción

Las plaquetas responden a la lesión vascular mediante el agregado, la adherencia, la activación y la degranulación en el sitio de la lesión. Los gránulos alfa dentro de las plaquetas liberan un gran número de factores de crecimiento (es decir PDGF-AB) que actúan como agentes quimioatrayentes y mitogénicos. Durante la activación, la selectina P se expresa rápidamente en la membrana de superficie de las plaquetas y, a su vez, se forman complejos basados en fibrina que pueden mejorar la agregación de plaquetas. Los siguientes estudios no solo comparan las concentraciones celulares de diferentes sistemas de sangre autóloga basados en plasma (Estudio 1, no activado), sino que también comparan los perfiles de liberación de PDGF-AB y Selectina P de las matrices de fibrina de cada sistema respectivo (Estudio 2, activado).

## Métodos y materiales (estudio 1, muestras no activadas)

Se recolectaron muestras de sangre entera de cinco donantes (n=5) con la proporción apropiada de anticoagulante. Cada muestra fue procesada según las especificaciones del fabricante, Tabla 1. Se realizó un análisis CBC inmediatamente después de la centrifugación y el procesamiento (para MTF Cascade, se tomó la CBC después del primer paso de centrifugación), Figura 1 y Tabla 2. Se realizó un análisis de factores de crecimiento después de un ciclo único de congelación a -81°C y descongelación mediante análisis ELISA, Tabla 2 (R&D Systems, Inc.). Se determinó la eficiencia de la captura de plaquetas a partir de la siguiente ecuación:  $[\text{Volumen}_{(\text{PRP})} \times \text{Concentración de plaquetas}_{(\text{PRP})}] / [\text{Volumen}_{(\text{Sangre entera})} \times \text{Concentración de plaquetas}_{(\text{Sangre entera})}]$ .

## Resultados (estudio 1, muestras no activadas)

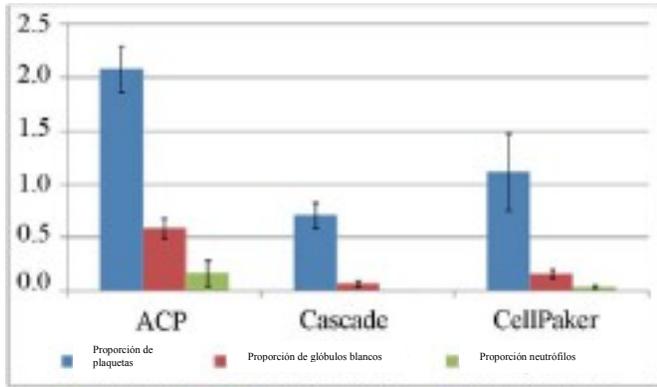
**Tabla 1:** Protocolos para sistemas probados de sangre autóloga basada en plasma

Sistema, empresa	Volumen de sangre entera (mL)	Fuerza centrífuga (RCF, g) Primer giro	Fuerza centrífuga (RCF, g) Segundo giro	Tiempo de centrifugación (min) Primer giro	Tiempo de centrifugación (min) Segundo giro
ACP de Arthrex	11	350	-	5	-
Cascade, MTF	9	1.100	1.450	6	15
CellPaker, Orthovita	10	1.530	-	2	-

**Tabla 2:** Concentración de plaquetas, Índices de plaquetas, Volumen de PRP, Eficiencia de captura de plaquetas, Niveles de PDGF-AB y Niveles de selectina P de los sistemas PRP basados en plasma (\*denota ANOVA de una vía significativamente diferente,  $\alpha=0.05$ )

Sistema, empresa	Concentración de plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Aumento de plaquetas en la sangre entera	Volumen de plasma (mL)	Eficiencia de captura de plaquetas	PDGF-AB (pg/mL)	Selectina P (ng/mL)
Sangre Entera	238 ± 38	-	-	-	-	-
ACP de Arthrex	470 ± 45*	2,1 ± 0,2	3,7 ± 0,8	0,60 ± 0,10	26.259 ± 3.061*	421 ± 52*
Cascade, MTF	136 ± 61	0,7 ± 0,1	4,1 ± 0,5	0,26 ± 0,12	5.307 ± 3.170	186 ± 66
CellPaker, Orthovita	221 ± 105	1,1 ± 0,4	4,9 ± 0,7	0,45 ± 0,20	8.361 ± 5.078	246 ± 114

**Figura 1: Análisis CBC de sistemas de PRP basados en plasma**



**Discusión** (estudio 1, muestras no activadas)

El sistema de ACP de Arthrex tiene cantidades significativamente más altas de plaquetas, PDGF-AB, y Selectina P en el estado no activado ( $p < 0,05$  para todos los grupos). Si bien el sistema CellPaker tiene el tiempo más corto de centrifugación y el sistema de Cascade tiene el más largo, estos dos sistemas tuvieron una RCF que fue casi tres veces más alta que la del sistema ACP. La fuerza g elevada causa que las plaquetas se agrupen de forma más estrecha y por lo tanto sean más difíciles de aislar. Cascade está autorizado por la FDA como sistema PRP, pero no se obtuvo una concentración de plaquetas sobre la basal mediante un régimen centrífugo y de giro específico de Cascade. Orthovita Vitagel no está autorizado por la FDA como sistema PRP, pero sí está autorizado como hemostato quirúrgico. Vitagel utiliza una fuerza g elevada para facilitar la separación de plasma con fibrinógeno; al hacer estos, disminuye la producción potencial de plaquetas. ACP utiliza una fuerza g que permite la recolección máxima de plaquetas con una capa de plasma y al mismo tiempo remueve la mayoría de los glóbulos rojos y glóbulos blancos. El nivel significativamente más alto de PDGF-AB dentro de ACP se correlaciona con el número significativamente más alto de plaquetas cuando se lo compara con la basal y otros grupos testeados.

**Métodos y materiales (estudio 2, muestras activadas):**

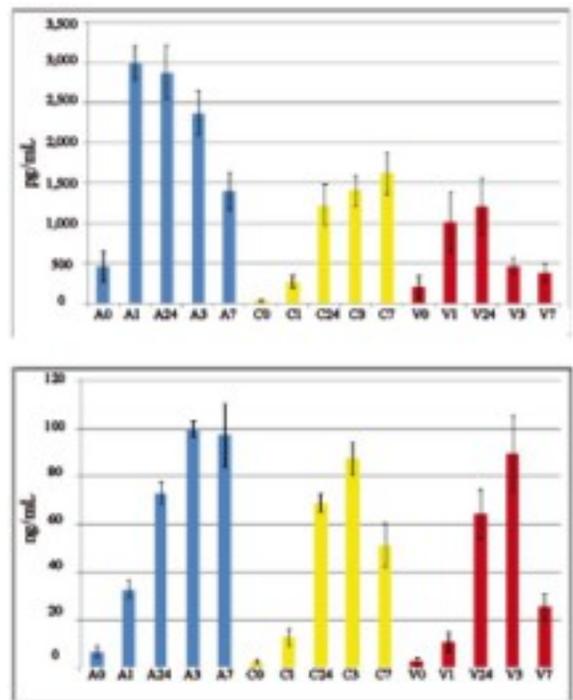
Las muestras de PRP anteriores ( $n=5$ ) fueron activadas según las especificaciones de cada fabricante: Cascade usa  $CaCl_2$  y Orthovita usa su kit Vitagel (colágeno/trombina). ACP fue activado con  $CaCl_2$ /trombina de acuerdo con una proporción publicada en literatura revisada por pares<sup>1</sup>. La matriz de fibrina activada fue luego colocada en un vial estéril de 40 mL y se agregaron 10 mLs de solución estéril de cloruro de sodio tamponada con fosfato (PBS), Figura 2. Después de los respectivos tiempos de incubación de 37°C, se retiraron 2 mL partes de PBS y se criocongelaron a hora cero, una hora, 24 horas, tres días y siete días. Después de congelar a -81°C, las muestras fueron descongeladas y se realizó un análisis ELISA, Figura 3 y 4 (R&D Systems, Inc.). Para el análisis estadístico, se usó una ANOVA de una vía,  $\alpha=0,05$ , para todas las comparaciones.

**Figura 2: Sistemas de PRP basados en plasma activados *in vitro*** (izquierda a derecha: ACP, Cascade, Vitagel)



**Resultados** (estudio 2, muestra activada, liberación de tiempo)

**Figuras 3 y 4:** PDGF-AB (izquierda) y Selectina P (derecha) perfil *in vitro* de liberación de los sistemas PRP basados en plasma activados (A=ACP, C=Cascade, V=Vitagel; 0=hora cero, 1=1 hora, 24=24 horas, 3=3 días, 7=7 días)



**Discusión** (estudio 2, muestra activada, liberación de tiempo)

El sistema de ACP de Arthrex tuvo cantidades significativamente más altas de PDGF-AB en todo punto de tiempo respectivo excepto a los siete días ( $p < 0,05$  para todos los puntos de tiempo). Las concentraciones de PDGF-AB tendieron a incrementar con el tiempo con Cascade, mientras que decrecía con el tiempo en ACP. Sin embargo, no hubo diferencia en las concentraciones de PDGF-AB en el día siete ( $p=0,370$ ). Vitagel alcanzó una liberación máxima después de 24 horas y luego cayó con el tiempo. Las concentraciones de selectina P, en el tiempo, indican que todos los sistemas tenían activación continua de plaquetas durante siete días, todos los sistemas llegaron a un máximo a los tres días. Después de siete días, es natural esperar que la liberación del factor de crecimiento y la activación de plaquetas caiga para todos los grupos puesto que el lapso de vida de una plaqueta, en promedio, es de siete días<sup>2</sup>. Dentro de la literatura publicada para Cascade, se ha discutido que el uso de  $CaCl_2$  sola sin trombina es más favorable debido a la menor activación

inicial de las plaquetas, y en lugar de eso, ocurre una liberación teórica en el tiempo. Este estudio ilustró cómo ACP todavía ha aumentado PDGF en el tiempo con el uso de trombina cuando se compara con otros sistemas. Una función que causa esta diferencia estadística es el hecho de que ACP puede concentrar más plaquetas inicialmente que los otros dos sistemas. Este estudio también indicó que muchas plaquetas permanecen inactivadas en la matriz de fibrina creada mediante la combinación de ACP con  $\text{CaCl}_2$ /trombina. Estas plaquetas a su vez se activan con el tiempo en forma similar a una matriz de fibrina que se crea por  $\text{CaCl}_2$  y centrifugación. Estos resultados ilustran que todos los sistemas muestran viabilidad de plaquetas, activación, y liberación de factor de crecimiento durante un lapso de siete días de degradación *in vitro* independientemente del uso de  $\text{CaCl}_2$ , trombina, y/o colágeno.

### Síntesis

Cuando se elige un sistema PRP, es muy importante elegir un sistema basado en plasma en lugar de un sistema basado de capa leucoplaquetaria. El sistema de capa leucoplaquetaria incluirá niveles aumentados de glóbulos blancos (específicamente neutrófilos) y glóbulos rojos que han tenido el potencial de cicatrización del tejido que se trata<sup>3</sup>. Cuando se elige un sistema basado en plasma, resulta esencial comprender qué se está recogiendo dentro del plasma que se está usando para cada tratamiento. Comparado con los otros sistemas de sangre autóloga basados en plasma, ACP tiene una concentración de plaquetas más alta con una liberación correspondientemente más alta de factores de crecimiento en el estado no activado y después de tres días en el estado activado. Este trabajo ayuda a identificar por qué el sistema PRP de ACP de Arthrex es el sistema ideal de sangre autólogo basado en plasma cuando se compara con otros sistemas disponibles.

### Referencias:

1. Nikolidakis, D., Jansen, J. The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: Literature Review. *Tissue Engineering; Part B*. 2008; 14(3):249-258.
2. Marx, RE. Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *J. Oral Maxillofacial Surg.* 62 204:489-496.
3. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* 2005; 15(11):599-607.