

# Factores de crecimiento

## en el plasma rico en plaquetas (PRP) de sujetos tratados con antiagregantes plaquetarios

*Growth factors in the platelet-rich plasma (prp) from healthy subjects treated with antiplatelet drugs*

Maczy Gonzalez Dra<sup>1</sup>, Melvis Arteaga-Vizcaino MD<sup>2</sup>, Ana Ruiz Dra<sup>1</sup>, Jesus Estevez MD<sup>2</sup>, Jesus Quintero MD<sup>2</sup>, Maribel Quintero Dra<sup>1</sup>, Olga Briceño Dra<sup>1</sup>, Ricardo Atencio<sup>2</sup>, Ivis Marcano MD<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Hematología, Bioanálisis,

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia,

<sup>3</sup>Catedra de Practica Profesional de Hematología, Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.

<sup>4</sup>Medivital Clínica: Especialista en Obesología y trastornos metabólicos y Nutrición aplicada al entrenamiento físico deportivo.

Título Corto: Factores de crecimiento en plasma rico en plaquetas luego de fármacos antiplaquetarios

CORRESPONDENCIA: Maczy Gonzalez. Apartado Postal 4000-A Maracaibo, estado Zulia Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia maczy.gonzalez@gmail.com, 0424-6692707. FUENTE DE FINANCIAMIENTO: FONACIT (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología).

### Resumen

**Introducción:** El PRP es un bioproducto útil en la regeneración tisular. El objetivo fue evaluar la concentración del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFBB), factor de crecimiento epidermal (EGF) y factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF) en el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de sujetos tratados con fármacos antiagregantes plaquetarios antes y después de su administración.

**Materiales y Métodos:** Se determinaron mediante ELISA los niveles de PDGFBB, EGF y VEGF en el PRP, Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), exudado y lisado de 32 sujetos sanos antes y 24 horas después de ingerir Acido Acetilsalicílico (AAS) y Clopidogrel en dosis única. El PRP y el PPP se obtuvieron por el método de Anitua de una sola centrifugación.

**Resultados:** Hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores pretratamiento y postratamiento para el PDGFBB en el PPP (AAS:  $p < 0,01$ ), PPP y exudado (Clopidogrel:  $p < 0,001$ ), PRP (Clopidogrel:  $p < 0,01$ ) y para el VEGF en el lisado (AAS y Clopidogrel:  $p < 0,05$ ). Solo hubo correlación entre los valores basales del EGF en el grupo del AAS y el recuento plaquetario del PRP respectivo ( $r: 0,726$ ). Los valores basales de los factores de crecimiento medidos fueron mayores en el PRP y lisado. Hubo disminución significativa en el PDGFBB luego del tratamiento con Clopidogrel y un aumento significativo para el VEGF en el lisado.

**Conclusiones:** A pesar de que el comportamiento de los tres mediadores solubles fue diferente ante los fármacos antiagregantes, los cambios observados sugieren que una dosis única de los mismos no afecta marcadamente la secreción y disponibilidad de los factores de crecimiento medidos.

**Palabras Clave:** PRP, PPP, lisado, factores de crecimiento, antiagregantes plaquetarios.

### Abstract

**Introduction:** PRP is an useful bioproduct to tisular regeneration. The aim of study was evaluate the concentration of growth factors (PDGFBB, EGF and VEGF) present in the Platelet-rich plasma (PRP) in subjects treated with drugs which inhibit platelet aggregation as acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel before and after administration.

**Materials and Methods:** We determined by ELISA PDGFBB, EGF and VEGF levels in PRP, Platelet Poor Plasma (PPP), lysate and exudate from 32 healthy subjects before and 24 hours after ingesting acid Acetyl salicylic acid (ASA) and clopidogrel as a single dose. The PRP and PPP were obtained by the method of Anitua by single centrifugation method.

**Results:** To analyze the results of student test and Pearson correlation was applied, with statistical significance level of  $p < 0.05$ . PPP and exudate (Clopidogrel:  $p < 0.001$ ), PRP (Clopidogrel :  $p < 0.01$ ) statistically significant differences for PDGFBB in PPP ( $p < 0.01$  AAS) were found, and for VEGF in lysate (ASA and Clopidogrel:  $p < 0.05$ ). No significant difference was found for EGF. Only was no correlation between baseline values of EGF in the ASA group and the respective PRP platelet count ( $r = 0.726$ ). The results show that the average basal values of the three growth factors measured were considered particularly high in the PRP and lysate, showing the significant decrease for PDGFBB after antiplatelet therapy, especially of Clopidogrel and a significant increase for the VEGF only for the lysate.

**Conclusion:** Although the behavior of three different soluble mediators was different to antiplatelet agents, the observed changes support the conclusion that a single dose of these drugs not markedly affect the secretion and availability of the three growth factors measured in various platelet derived obtained.

**Key words:** PRP, PPP, lysate, growth factors, platelet antiagregants.

Las plaquetas contienen organelos citoplasmáticos cuyo contenido secretan al medio extracelular una vez activadas, entre los cuales se encuentran los cuerpos densos, gránulos  $\alpha$  y lisosomas. De estos organelos los más abundantes son los gránulos  $\alpha$ , los cuales poseen un contenido importante de proteínas, como la  $\beta$  tromboglobulina, factor plaquetario 4 (PF-4) neutralizante de la heparina y otros productos no proteicos como fibronectina, trombospondina, inhibidores de la fibrinólisis, fibrinógeno, factor von Willebrand, mediadores solubles tales como citoquinas, factores de crecimiento (FCs) y entre estos últimos, se encuentran proteínas pro y anti-angiogénicas que incluyen al factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), entre otros<sup>1,2</sup>.

En ese contexto, el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) proporciona un alto contenido en plaquetas y éste se prepara a través de numerosas técnicas a partir de donaciones de sangre que se someten a centrifugación diferencial, logrando un concentrado plaquetario (600.000 a 1.500.000 x mm<sup>3</sup>). Es una fracción plasmática que posee una concentración de plaquetas de 2 a 5 veces superior al número de plaquetas en sangre periférica<sup>6</sup>. Por lo tanto, se considera un concentrado de plaquetas, obtenido generalmente por centrifugación de la sangre del propio paciente a quien se le va aplicar (autólogo)<sup>5-8</sup>. Las plaquetas al ser activadas con la mezcla de trombina y calcio, generan un producto de consistencia gelatinosa que puede ser aplicado en forma tópica sobre una herida, potenciando los mecanismos de regeneración, de manera rápida y eficaz<sup>3,4</sup>.

El PRP ha sido reconocido como un poderoso agente hemostático y adhesivo desde la década de 1970, así como una potente fuente de FCs desde 1990<sup>5</sup>. Entre los mediadores solubles más estudiados que se liberan del PRP, se encuentran el PDGFAB, VEGF y EGF y las Interleucinas 4 (IL-4) y 6 (IL-6)<sup>6-9</sup>.

El PDGF es una proteína catiónica termoestable con un PM de 30-40 Kd, es un dímero compuesto por dos cadenas peptídicas iguales o diferentes unidas por puentes disulfuro y sus isoformas más conocidas son PDGFAA, PDGFBB, PDGFAB, PDGFCC y PDGFDD. Su principal fuente son las plaquetas, donde se almacena en los gránulos  $\alpha$  y se libera cuando las plaquetas se agregan y se inicia la activación del sistema de la coagulación<sup>10,11</sup>. La función más importante del PDGF es promover la quimiotaxis, además puede estimular el reclutamiento, proliferación y sobrevivencia de células mesenquimales, del músculo liso, endoteliales, fibroblastos, y otras células reparadoras. Su función angiogénica es más débil que la desarrollada por VEGF<sup>1,12,13</sup>.

El VEGF, también denominado Factor de Permeabilidad Vasculare (VPF), es el más poderoso de los promotores del crecimiento vascular conocidos, presenta 5 isoformas distintas y la más abundante en las plaquetas es la VEGF-A. Pertenece a la familia que incluye al Factor de Crecimiento Placentario (PLGF). Entre las células productoras de este factor además de las plaquetas, se encuentran los macrófagos, osteoblastos y musculares lisas principalmente en estado de hipoxia. Actúa en los receptores de tirosinquinasa de las células endoteliales y se le considera un potente angiogénico durante las etapas embrionarias y postnatal<sup>14</sup>.

El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos, sintetizado y secretado por plaquetas, fibroblastos y células endoteliales, además de células renales y de glándulas salivares. Solo se ha descrito una isoforma. Posee propiedades mitogénicas, proapoptóticas, de migración y de diferenciación de fibroblastos, células epiteliales, renales y gliales a partir de células mesenquimales. Así mismo, se le atribuye la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de la epidermis, dermis, epitelio corneal, pulmones y de tráquea, durante la reparación tisular<sup>15,16</sup>.

El empleo médico del PRP hoy en día es reconocido en diversas áreas como la odontológica<sup>1,17,18</sup>, cirugía estética<sup>19,20,21</sup>, así como en otras ramas de la medicina en las cuales se asumieron esas experiencias para justificar su utilización en otras patologías, como en Hemofilia A y B, úlceras de miembros inferiores en pacientes con Diabetes Mellitus, artrosis y otras enfermedades<sup>22</sup>.

Es ampliamente conocida la utilización de ciertos medicamentos que tienen efecto antiagregante sobre las plaquetas como el ácido acetil salicílico (AAS) o aspirina y el Clopidogrel/Ticlopidina (Tienopiridinas), cuya indicación es universal en el tratamiento de pacientes con tendencia a formar trombos por diversas causas como cardiopatías congénitas o adquiridas, enfermedad cerebrovascular, etc. Estos fármacos actúan inhibiendo la agregación plaquetaria, reduciendo con ello el riesgo de formar un trombo plaquetario; no obstante, pueden interferir con la liberación de los FCs contenidos en los gránulos  $\alpha$ <sup>23-26</sup>. De esa manera en teoría, el PRP proveniente de sujetos tratados con antiagregantes plaquetarios, no sería de utilidad en las áreas de la medicina en donde ha sido probada su gran influencia en la cicatrización de diversos tipos de heridas.

Esta investigación espera contribuir a un mejor entendimiento del empleo efectivo del PRP en diversos procedimientos médicos, de allí que se planteó como objetivo evaluar la concentración de los factores de crecimiento (PDGF, EGF y VEGF) presentes en el PRP de sujetos tratados con diferentes fármacos que inhiben la agregación plaquetaria como el AAS y Clopidogrel, antes y después de su administración.

**Tipo y Diseño de investigación**

Se realizó una investigación descriptiva, de campo, no experimental y transversal<sup>27</sup>.

**Población y muestra**

La población objeto de estudio estuvo conformada por sujetos adultos, de sexo masculino y femenino, aparentemente sanos, que acudieron al Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, República Bolivariana de Venezuela, durante el periodo comprendido entre febrero del 2014 y febrero del 2015. La muestra fue de tipo no probabilístico<sup>28</sup>.

**Criterios de inclusión**

Se incluyeron sujetos entre 18 y 50 años de edad, de sexo masculino y femenino, que desearon participar en este estudio, sin enfermedad clínica de base, aparentemente sanos (previa valoración clínica general) y con resultados normales en el estudio de agregación plaquetaria antes del tratamiento con el antiagregante plaquetario respectivo y que acataron de manera estricta el tratamiento indicado. Fueron excluidos aquellos que habían ingerido previamente antiagregantes plaquetarios o bebidas alcohólicas 11 días antes del estudio, o que estuvieran recibiendo cualquier tipo de tratamiento.

**Procedimiento**

Se incluyeron 32 sujetos, 20 femeninos y 12 masculinos y se distribuyeron en dos grupos, de la siguiente manera: 16 sujetos tratados con Aspirina a una dosis de 100 mg en dosis única y 16 individuos quienes recibieron Clopidogrel a una dosis de 75 mg en dosis única.

A todos los sujetos, en ayunas y previa asepsia de la zona, tanto antes como 24 horas después del tratamiento respectivo, se les extrajeron 20,5 mL de sangre venosa antecubital, con mariposa N° 21 empleando la técnica de doble jeringa para evitar la activación de las plaquetas<sup>29</sup>. La primera jeringa con 2,5 mL de sangre se dispensó en un tubo de vidrio que contenía EDTA para la hematología completa y conteo de plaquetas, que se procesó empleando un contador automático de células sanguíneas marca Beckman Coulter AC-T. La segunda jeringa con 18 ml de sangre venosa se distribuyó en tres tubos plásticos que contenían citrato de sodio al 3,8% (9/1), de la siguiente manera: en uno se vertió 9 mL y en los otros dos 4,5 mL. En un tubo de estos últimos, se realizó el estudio de agregación plaquetaria, con un agregómetro Chrono-log (Corp. Haverton, PA, USA) según el método turbidimétrico de Born<sup>30</sup>. En cada una de estas muestras también se realizó el conteo plaquetario.

Todos los tubos con citrato de sodio, se centrifugaron en una centrifuga clínica. El que contenía 9 ml de sangre, se dejó reposar 20 minutos, y luego fue centrifugado a una velocidad de 1.400 rpm por 7 minutos, siguiendo la técnica de Anitua<sup>5</sup>. Del volumen total obtenido en el PRP se extrajo 0,5 mL que correspondió a Plasma Pobre en Plaquetas (PPP). El resto (PRP) se tomó a través de un pipeteado muy metuculoso y

con una punta distinta, hasta la zona que se encontraba por encima de la fracción roja. Un mL del volumen total del PRP se separó en alícuota para recuento de plaquetas y medición de FCs. Por otra parte, a 1 mL del PRP obtenido se le adicionó 50 uL de cloruro de calcio al 10%, se mezcló y se dejó reposar por 15-30 minutos para obtener el PRP gelificado y posteriormente, se centrifugó a 2.500-3.000 rpm por 10 minutos, para obtener el exudado.

El tubo restante con 4,5 mL de sangre se dejó reposar 20 minutos y luego se sometió a 2 centrifugaciones, la primera a 1.400 rpm por 7 minutos (Método Anitua de una sola centrifugación)<sup>5</sup> y la segunda a una velocidad de 3.600 rpm por 10 minutos (Método modificado de Ghandi y col.)<sup>31</sup>.

El volumen total obtenido en el PRP luego de la segunda centrifugación (fracción del PRP más concentrada en plaquetas), se le descartó 0,5 mL del PPP y el resto del PRP se mezcló con una punta de pipeta distinta con el fin de obtener un plasma aún más concentrado en plaquetas, posteriormente se tomó una parte para realizarle un conteo de plaquetas y finalmente se separó y guardó en tubos Eppendorf.

El PPP, PRP sin activar, el exudado del PRP gelificado y el PRP de segunda centrifugación, se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron en tubos plásticos Eppendorf a -70°C en un ultracongelador (Forma Scientific U95-18), hasta el análisis de los FCs, con la técnica de Inmunoensayo Enzimático (ELISA)<sup>32</sup>.

El PRP de la segunda centrifugación en el momento del análisis de los FCs, se sometió a un proceso de descongelación y congelación consecutiva para propiciar la lisis de las plaquetas contenidas en él, de acuerdo al siguiente procedimiento: La primera descongelación de las alícuotas (tres por cada sujeto) se realizó a 37°C por 25 minutos y luego se mezclaron cuidadosamente y se organizaron en una sola alícuota por individuo. Cada alícuota se volvió a congelar a -20°C durante 1 hora, este procedimiento se repitió 4 veces más de manera consecutiva descongelando cada vez a 37°C por 15 minutos y congelando luego a -20°C (método modificado del aplicado por Perseghin y col.)<sup>33</sup>. Al final se distribuyó cada alícuota del lisado en tres de 200 µL para el procesamiento y análisis correspondiente de cada FC.

Los niveles de los factores de crecimiento PDGFBB, EGF y VEGF se midieron en muestras y estándares empleando el método de ELISA indirecto, cuyos ensayos para el PDGFBB y EGF fueron suministrados por ABCAM (ABCAM INC, CAMBRIDGE, USA: 1 Kendall Square, Ste B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA) con número de lote: GR 85403-1, GR85404-1 y GR 56644-1 para el PDGF, GR81587-1, GR81588-1 y GR81589-1 para el EGF. Los ensayos de VEGF fueron suministrados por Thermo Scientific (Pierce Biotechnology, 3747 N. Meridian Road, PO Box 117, Rockford IL61105, USA) con número de lote: ME 156238, MH 161815 y NE 168666. Todos los ensayos fueron ejecutados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se consideró como valor de referencia para plaquetas en sangre periférica entre 150.000 y 450.000 por  $\text{mm}^3$ <sup>3,34</sup>.

Para la tabulación y el análisis de los resultados que se obtuvieron, se utilizó la estadística respectiva. Los datos se muestran en tablas, en valores absolutos y porcentajes, así como media  $\pm$  desviación estándar. Para la comparación de las variables en estudio, se utilizó la prueba t de Student pareado, test y post test de comparación múltiple Tukey-Kramer, mientras que para el estudio de correlación se aplicó la prueba de Pearson y se consideró una  $p < 0,05$  como la menor probabilidad estadística<sup>35</sup>.

A todos los sujetos se les requirió su consentimiento informado por escrito antes de ser incluidos en el estudio<sup>36</sup> y se procedió de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de 1975, actualizada en el 2013, en la 64<sup>ta</sup> Asamblea Médica Mundial General de Fortaleza, Brasil y las recomendaciones elaboradas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) en el 2002<sup>37</sup>.

## Resultados

En la tabla I, se observa que el recuento plaquetario promedio en sangre de sujetos sanos incorporados a la presente investigación, se encuentra dentro del rango de referencia. Mientras que el valor del conteo plaquetario en PRP basal o antes del tratamiento respectivo ( $505,40 \pm 140,83 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) para todos los sujetos estudiados ( $n=32$ ), presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) cuando se comparó con el valor en sangre periférica ( $272,281 \pm 69,66 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), éste no fue estadísticamente significativo al compararse con el obtenido en el PPP basal ( $375,14 \pm 112,6 \times 10^3/\text{mm}^3$ ).

**Tabla I. NÚMERO DE PLAQUETAS EN SUJETOS SANOS ANTES DEL TRATAMIENTO CON AAS O CLOPIDOGREL**

Tipo de muestra	n=32	Número de plaquetas $10^3/\text{mm}^3$
Sangre		272,281 $\pm$ 69,66 a (150-379)
PPP $10^3/\text{mm}^3$		375,14 $\pm$ 112,6 b (247-626)
Basal		
PRP $10^3/\text{mm}^3$		505,40 $\pm$ 140,83 (316-740)
Basal		

Los resultados se expresan en media, desviación estándar y rango

n: Número de sujetos estudiados

PPP: Plasma Pobre en Plaquetas

PRP: Plasma Rico en Plaquetas

a: Plaquetas en sangre vs plaquetas en PRP basal:  $p < 0,0001$

b: Plaquetas en PPP basal vs plaquetas en PRP basal: NS

Los valores de plaquetas en el PRP obtenido del grupo tratado con AAS fueron mayores a los tratados con Clopidogrel, tanto antes como después de recibir el fármaco ( $p < 0,002$ ;  $p < 0,001$ ), respectivamente. Al compararse, el número de plaquetas antes y después de recibir el tratamiento en cada grupo, no hubo diferencias significativas, como se observa en la tabla II.

**Tabla II. Número de plaquetas en el PRP de sujetos sanos antes y después del tratamiento con aas o clopidogrel**

ANTIAGREGANTE	Número de plaquetas $10^3/\text{mm}^3$		p
	ANTES RECIBIDO	DESPUÉS	
AAS n=16	578,25 $\pm$ 125,33 (404-803)	566,86 $\pm$ 109,16 (405-784)	NS
CLOPIDOGREL n=16	432,56 $\pm$ 118,18 (251-604)	435,22 $\pm$ 108,48 (333-620)	NS
p	0,002	0,001	

Los resultados se expresan en media, desviación estándar y rango

n: Número de sujetos estudiados

AAS: Ácido acetil salicílico

NS: No significativo

La comparación de las concentraciones promedio de PDGFBB en el PPP, PRP y sus subproductos de sujetos sanos antes y después del tratamiento con AAS o Clopidogrel, se muestra en la tabla III. La menor concentración de este factor se observó en el PPP luego de recibir AAS con  $8,96 \pm 1,4$  ng/mL, valor que fue estadísticamente diferente al obtenido previo a su administración ( $p < 0,01$ ). Además, se observó una disminución de este FC en el PRP postratamiento, aunque no fue estadísticamente significativo. Al comparar los valores promedio de PDGFBB antes y después del tratamiento con Clopidogrel, se notó una disminución estadísticamente significativa tanto en el PPP y exudado ( $p < 0,0001$ ), así como en el PRP ( $p < 0,01$ ), postratamiento.

**Tabla III. Concentración de PDGFBB (ng/mL) en el PPP, PRP y sus subproductos de sujetos sanos, antes y después del Tratamiento con AAS o Clopidogrel**

PRODUCTO	AAS n=16		CLOPIDOGREL n=16	
	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
PPP	10,68 $\pm$ 1,9	8,96 $\pm$ 1,4 a	10,6 $\pm$ 1,8	8,53 $\pm$ 0,59 b
PRP	12,12 $\pm$ 2,51	11,36 $\pm$ 2,48	12,0 $\pm$ 2,4	9,65 $\pm$ 1,17 a
EXUDADO	10,84 $\pm$ 1,68	11,11 $\pm$ 1,14	10,7 $\pm$ 1,55	8,51 $\pm$ 0,75 b
LISADO	10,56 $\pm$ 2,36	10,85 $\pm$ 3,01	10,45 $\pm$ 2,1	10,15 $\pm$ 1,74

n: Número de sujetos estudiados.

AAS: Ácido acetil salicílico.

PDGFBB: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas isoforma BB.

PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.

PRP: Plasma Rico en Plaquetas.

a: Con respecto a su control (antes)  $p < 0,01$ .

b: Con respecto a su control (antes)  $p < 0,0001$ .

La tabla IV, muestra las concentraciones de EGF en el PPP, PRP y sus respectivos subproductos en la población estudiada. Las mayores concentraciones se obtuvieron del PRP en ambos grupos. No se encontró diferencias estadísticamente significativas al compararse los valores del FC en los diferentes derivados plaquetarios antes y luego del tratamiento.

**Tabla IV. Concentración de EGF (pg/mL) EN el PPP, PRP y sus sub-productos EN sujetos sanos, antes y después del Tratamiento con AAS y Clopidogrel**

PRODUCTO	AAS (n=16)		CLOPIDOGREL (n=16)	
	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
PPP	96±141,1	172,75±167,4	11,9 ± 6,8	8,25±2,75
PRP	296,1±203,6	353,95±204,5	51,75±14,35	58,75±29,15
EXUDADO	150,25±120,8	159,7±71,1	29,75±12,95	36,8±11,95
LISADO	280±70	275±35	37±18,9	48±13

n: Número de sujetos estudiados.  
AAS: Ácido acetil salicílico.  
EGF: Factor de Crecimiento Epidermal.  
PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.  
PRP: Plasma Rico en Plaquetas.

Las concentraciones plasmáticas del VEGF en el PPP, PRP y sus subproductos antes y después de la administración de AAS o Clopidogrel, en sujetos sanos, se observan en la tabla V. El valor más alto encontrado para este factor fue en el lisado del grupo que recibió Clopidogrel con 1.076,8±534 pg/mL y el PRP del grupo que recibió AAS con 913,6±380,84 pg/mL. Cuando se compararon los valores pretratamiento y postratamiento, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas para el lisado ( $p<0,04$ ), en ambos grupos.

Sólo hubo correlación significativa ( $r:0,71$ ;  $p<0,001$ ) entre el recuento plaquetario del PRP basal y las concentraciones pretratamiento de EGF en el grupo de AAS (datos no mostrados en tabla).

**Tabla V. Concentración de VEGF (pg/mL) en el PPP, PRP y sus sub-productos de sujetos sanos, antes y después del Tratamiento con AAS y Clopidogrel**

PRODUCTO	AAS (n=16)		CLOPIDOGREL (n=16)	
	ANTES	DESPUÉS	ANTES	DESPUÉS
PPP	658,8±262,68	708,8±353,88	504±288,52	542±272,12
PRP	833,6±446,4	913,6±380,84	663,2±419,2	680,4±383,6
EXUDADO	756,4±375,56	870±387,76	568±366,24	568,4±309,32
LISADO	632,8±212	801,6±151,72 a	728,8±387,88	1076,8±534 a

n: Número de sujetos estudiados.  
AAS: Ácido acetil salicílico.  
VEGF: Factor de Crecimiento Vasculo Endotelial.  
PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.  
PRP: Plasma Rico en Plaquetas.  
a: con su respecto a su control (antes):  $p<0,04$ .

## Discusión

En la presente investigación, las cifras de plaquetas de los sujetos estudiados estuvieron dentro del rango de referencia antes del tratamiento con los antiagregantes plaquetarios utilizados<sup>34</sup>. Así mismo, el promedio del conteo plaquetario basal en el PRP de los 32 sujetos estudiados en la presente investigación, presentó un incremento significativo ( $p<0,0001$ ) cuando se comparó con la cifra en sangre. Este aumento que fue de 1,2 a 2,72 veces, se ubicó dentro del rango establecido para el protocolo de una centrifugación descrito por Anitua<sup>5,38</sup> y se ajustó a la definición de PRP enunciada en la literatura<sup>5</sup>. Estos valores son comparables con las descritas por diversos investigadores entre ellos, Castillo y col.<sup>39</sup>, quienes obtuvieron PRP a través de sistemas comerciales de separación celular y encontraron un promedio de plaquetas de  $566,2\pm292,6 \times 10^3/\text{mm}^3$  por el método GPS y  $443,8 \pm 24,7 \times 10^3/\text{mm}^3$  por el método Magellan.

Un hallazgo importante de la presente investigación fue que no hubo diferencia estadísticamente significativa en el conteo de plaquetas obtenido en el PPP basal al compararlo con el PRP basal. Esto sugiere que el PPP obtenido a través del protocolo de una sola centrifugación de Anitua<sup>5</sup>, no produce una pobre concentración de plaquetas como es catalogado, por lo que debe considerarse su incorporación al PRP para incrementar su contenido celular y de FCs.

En relación al número de plaquetas obtenido en el PRP luego de 24 horas de tratamiento con AAS o Clopidogrel, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los valores promedio en el PRP basal antes del tratamiento. El hallazgo de que ambos fármacos antiagregantes, en dosis única, no afectaron sensiblemente el número de plaquetas en los sujetos estudiados, podría ser explicado, en primer lugar porque su efecto lo ejercen sobre la función de las plaquetas y en segundo lugar, por el hecho que el recambio plaquetario en condiciones normales después de la administración de estas drogas, es de aproximadamente 7 días<sup>40,41</sup>. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hayasaka y col.<sup>42</sup>, quienes realizaron un estudio comparativo de la afectación de los parámetros hematológicos en 2 grupos de pacientes tratados por 2 meses con aspirina más Clopidogrel y aspirina solamente, y no hallaron diferencias estadísticamente significativas en el número de plaquetas (basal y postratamiento), pero si para la cuenta roja, blanca, hemoglobina y hematocrito.

Sin embargo, cuando se comparó el conteo plaquetario del PRP antes y después del tratamiento entre los dos grupos, a pesar de estar dentro del límite esperado para un PRP, hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,002$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Sin embargo, estas variaciones en el número de plaquetas en sujetos sanos responden claramente a fluctuaciones fisiológicas descritas en la literatura científica<sup>5,34,38</sup>.

Cuando se analizaron las concentraciones promedio de PD-GFBB determinadas en el PPP, PRP y sus subproductos, an-

tes y después del tratamiento con los fármacos utilizados, se observó una marcada disminución de los niveles de este factor, en dos de los cuatro productos plaquetarios (PPP y PRP) luego del tratamiento con AAS (aunque solo fue significativo para el PPP,  $p < 0,01$ ). Sin embargo, los valores promedio basales de PDGFBB más elevados se notaron en el PRP y no en el exudado ni lisado como se esperaría. Estos resultados son similares a los obtenidos por Passaretti y col.<sup>43</sup>, quienes compararon el aporte de FCs en el PRP y Plasma Rico en Factores (PRF) y describieron en el PRF (equivalente al exudado de esta investigación) niveles de PDGF dos veces menor que en el PRP. Estos resultados podrían ser consecuencia de que el PRP es el producto derivado de las plaquetas en el cual existe la mayor concentración de las mismas.

El hecho que los valores del FC medido en el lisado se asemejen a los del PRP, a pesar que este es un producto obtenido de la congelación y descongelación repetida, confirma que este proceso no parece comprometer la disponibilidad de los FCs tal como lo describe Perseghin y col.<sup>33</sup>, quienes compararon los niveles de FCs en sangre fresca y lisado y no encontraron diferencias significativas.

En el mismo orden de ideas, los valores promedio de PDGFBB en el PRP y sus subproductos a nivel basal y después de la administración del Clopidogrel, arrojaron diferencias significativas para el PRP, PPP y exudado, con niveles más bajos que los hallados en el grupo del AAS. Estos resultados podrían confirmar un mayor nivel de alteración en la capacidad de secreción del PDGFBB por parte de los derivados plaquetarios en los sujetos tratados con Clopidogrel.

Es importante destacar que las concentraciones promedio del PDGFBB antes del tratamiento, fueron similares a los reportados por otros investigadores y cuyos valores oscilaron entre 2,3 y 37 ng/mL<sup>44-48</sup>. Entre estos estudios destaca el realizado por Christgau y col.<sup>45</sup>, quienes evaluaron los niveles de varios FCs en concentrados plaquetarios de donantes de sangre y establecieron su correlación con la regeneración periodontal. En este trabajo, el valor de PDGFBB fue de  $15,8 \pm 7,9$  ng/ml, lo que se consideró como elevado.

Al considerar el EGF, se observó un aumento aunque no significativo, de las concentraciones promedio del FC luego del tratamiento en ambos grupos de estudio, en todos los derivados plaquetarios. Sin embargo, los valores basales de este FC fueron similares a los citados por otros autores<sup>48,49,50</sup>. Eppley y col.<sup>48</sup>, reportaron un valor de EGF en el PRP de  $470 \pm 320$  pg/mL, similar a los valores basales (antes) y post-tratamiento para el grupo del AAS de la presente investigación, no así para el grupo de Clopidogrel, en el cual las concentraciones fueron más bajas.

Es importante destacar, que no existen valores referenciales oficialmente establecidos para los FCs que fueron analizados en la presente investigación, debido a que los sistemas comerciales de medición de los mismos no se encuentran estandarizados, de allí que existan diversos reportes de con-

centraciones para poblaciones similares por diferentes autores. Este aspecto limita la comparación de los presentes resultados con otros trabajos científicos<sup>51</sup>.

En relación al VEGF, se pudo observar que los subproductos con valores promedio más altos de éste fueron el PRP (antes y después) y en el lisado de los tratados con AAS y Clopidogrel, respectivamente. Estos resultados permiten confirmar lo asegurado por otros autores como Weibrich y col.<sup>33</sup>, Perseghin y col.<sup>51</sup> y Barsotti y col.<sup>52</sup>, quienes han destacado que el congelamiento a muy bajas temperaturas ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) y su rápida descongelación ( $37^{\circ}\text{C}$ ), es un método común y efectivo para lograr la liberación de los FCs, sin afectación de sus concentraciones, ni de los niveles biológicamente activos, gracias en gran medida a la lisis masiva de las plaquetas presentes en el derivado plaquetario. Este aspecto es de utilidad clínica a la hora de considerar la utilización de concentrados de PRP congelados, de pacientes que reciban antiagregantes plaquetarios como los empleados en el presente estudio<sup>53</sup>.

Además, se apreció que ambos grupos de estudio experimentaron un incremento de los valores promedio de VEGF luego del tratamiento respectivo, siendo más evidente en el grupo del AAS. Esto sugiere una alteración de la secreción de FCs que parece ser específica para cada fármaco.

La correlación entre el recuento plaquetario del PRP basal y la concentración de EGF del PRP antes de la administración del AAS podría significar que una alteración de las cifras plaquetarias se relaciona directamente con un aumento o disminución de los valores de este FC.

En conclusión, se pudo constatar en la presente investigación que existen dos tipos de comportamiento en cuanto a la concentración de los tres FCs estudiados, luego del tratamiento con antiagregantes plaquetarios. El primero de ellos fue el exhibido por el PDGFBB, cuyos valores promedio se mantuvieron por debajo de los basales en casi todos los subproductos plaquetarios, siendo esta disminución más evidente y significativa en el grupo del Clopidogrel, lo que sugiere que este fármaco propicia un mayor nivel de afectación del patrón de secreción de este FC que el AAS. Sin embargo, no se podría afirmar que una dosis única de este fármaco pueda ser responsable de la alteración de la biodisponibilidad de este FC. El segundo tipo de comportamiento es el desarrollado por el EGF y VEGF, cuyas concentraciones mostraron un incremento por encima de los valores basales luego del tratamiento respectivo. Estos resultados parecen indicar que ambos fármacos afectan la secreción de ambos FCs, pero sin aparente detrimento de sus niveles biológicamente activos, además de que el PPP, PRP y sus derivados demostraron contener concentraciones similares de los tres FCs medidos, lo que permitiría recomendar el empleo de cualquiera de ellos en las diferentes áreas médicas.

## Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el FONACIT (Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología), a través del proyecto PEII # 2012000985. Los autores agradecen la dotación de materiales reactivos y equipo necesario para la ejecución de este trabajo de investigación. Así mismo, se contó con la colaboración del Laboratorio de Hematología del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, en cuyos laboratorios se llevó a cabo el análisis de las muestras recolectadas.

## Referencias

1. Dohan DM, Choukroun MD, Antoine D, Dohan S, Dohan A, Mouhyi J and Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3): E45-50.
2. Dohan DM, Choukroun MD, Antoine D, Dohan S, Dohan A, Mouhyi J and Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3): E51-5.
3. Carlson N, Roach R. Platelet-rich plasma Clinical applications dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002; 133(10): 1383-86.
4. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Yana Koyano K. The contribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor- $\beta$ 1, and insulin-like growth factor-I in platelet-rich plasma to the proliferation of osteoblast-like cells *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(6): 724-9.
5. Anitua E, Sánchez M, Prado R, Orive G. Plasma rich in growth factors: The pioneering autologous technology for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res J Biomed Mater Res A* 2011; 97 (4):536.
6. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet rich plasma the enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; 18(1): 93-103.
7. Fernández BJE, Galindo MP, Ávila OG, Caba O, Sánchez FE, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet rich plasma gel. *Clin Oral Implant Res* 2006; 17(6): 687-93.
8. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra R, Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promotes proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; 23(2): 281-286.
9. Okuda K, Kawase T, Momose M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-Rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003; 74(6): 849-57.
10. Antoniades HA. Human platelet-derived growth factor (PDGFBB): Purification of PDGFBB-I and PDGFBB-II and separation of their reduced subunits (fibroblast growth factor/platelets/polypeptide hormones). *Proc. Natl Acad Sci. USA*. 1981; 78 (12): 7314-7317.
11. Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GG, Seoane J. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Medicina Oral* 2002; 7(5): 375-390.
12. Carrasco J, Bonete D, Gomar F. Plasma Rico en Plaquetas vs. Plasma Rico en factores de crecimiento. *Rev Esp de Cir Ost* 2009; 239 (46):127-139.
13. Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol* 2007; 19 (1): 39-52.
14. Zachary I. VEGF signaling integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31(6):1171-7.
15. Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, López-Saura P, González-López T, Castro-Santana MD, López-Mola E, Guillen-Nieto G, Herrera-Martínez L. Epidermal growth factor in clinical practice-a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. *Int wound J*. 2009; 6(5): 331-346.
16. Yates RA, Nanney LB, Gates RE, King LE. Epidermal Growth Factor and related growth factors. *Int J Dermatol*. 1991; 30(10): 687-694.
17. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, Hoopes JE, Fenselau A. The effect of bovine basic fibroblast growth factor on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 1992; 28(3):242-245.
18. Whitman DH, Berry R, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with application in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(11): 1294-9.
19. Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2002; 18(1): 27-33.
20. Yao F, Eriksson E. Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regen* 2000; 8(3): 443-451.
21. Arquero P. Plasma Rico en plaquetas en cirugía estética. *Revista de la AECEP* 2009; 42-48.
22. Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming factor-beta or platelet-derived growth factor. *Periodontol* 2005; 76(5): 760-7.
23. Ackerman RH, Newman KL. Incomplete end-point effects in patients on aspirin compounds. *Ann Neurol* 1990; 28: 224.
24. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthetase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72(8): 3073-3076.
25. Defreyn G, Bernat A, Delebasse A, Maffrand JP. Pharmacology of ticlopidine. A review. *Semin Thromb Hemost* 1989; 15(2): 159-66.
26. Féliste R, Delebassée D, Simon MF, Chap H, Defreyn G, Vallée E; Douste-Blazy L, Maffrand JP. Broad spectrum anti-platelet activity of ticlopidine and PCR 4099 involves the suppression of the effects of released ADP. *Thromb Res* 1987; 48(4): 403-15.
27. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista LP. *Metodología de la Investigación*. Cuarta Edición México D.F: Editorial Mc Graw Hill. 2006, p 102-117.
28. Arias Fidiás G. *El Proyecto de Investigación, Introducción a la Metodología Científica Quinta Edición*. Caracas-Venezuela: Editorial Episteme; 2006, p 40-45.
29. Symansky MR, Fox HA. Umbilical vessel catheterization: Indications, management, and evaluation of the technique. *J Pediatr*. 1972; 80(5): 820-826.
30. Born GV, Cross MJ. The aggregation of the blood platelets. *J Physiol* 1963; 168: 178-83.
31. Ghandi A, Doumas C, O'Connor P, Russell Parsons J, Lin SS. The effect of local platelet rich-plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 2006; 38(4):540-46.

32. Engvall E, Perlman P. Immunosorbent Assay. *Immunochem* 1971; 8(9):871-874.
33. Perseghin P, Sciorelli G, Belotti D, Speranza T, Pogliani E, Ferro O, Gianoli M, Porta F, Paolini G. Frozen-and-thawed allogeneic platelet gels for treating postoperative chronic wounds. *Transfusion* 2005; 45(9): 1544-1546.
34. Beutler E, Lichtman M. *Williams hematology*. 5th ed. New York USA: McGraw-Hill, 1995, p 11-26.
35. Daniel W. *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Segunda edición. México, DF: Editorial Limus, 1991, p 503-544.
36. Instituto Venezolano de Investigaciones Clínicas (IVIC). Consentimiento informado. Disponible en: [www.ivic.gob.ve/bioetica](http://www.ivic.gob.ve/bioetica). Actualizado hasta 25 de Mayo 2014. Consultado el 26 Junio 2014.
37. CIOMS working group on the revision on 2002 CIOMS Ethical guidelines for Biomedical research (Internet). (Citado 29 Oct 2015). Disponible en: <http://www.cioms.ch/index.php/2012-06-10-08-47-53/ethics/cioms-guidelines-working-group>.
38. Lorente Perez-Sierra A, Rodríguez F. ¿Conseguimos plasma concentrado rico en plaquetas de forma ambulatoria? *Cient. Dent* 2005; 2(2): 73-78.
39. Castillo T, Pouliot M, Kim HJ, Dragoo J. Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems. *Am J S Med* 2011; 39(2): 266-271.
40. Patrono C, Bachmann F, Baigent C, Bode C, De Caterina R, Charbonnier B, Fitzgerald D, Hirsh J, Husted S, Kvasnicka J, Montalescot G, García Rodríguez L, Verheugt F, Vermylen J, Wallentin L. Grupo de trabajo sobre el uso de agentes antiplaquetarios en pacientes con enfermedad cardiovascular aterosclerótica de la Sociedad Europea de Cardiología. Documento de Consenso de Expertos sobre el uso de agentes antiplaquetarios. *Revista Española de Cardiología* 2004; 57(10):963-80.
41. Molina V, Arruzazabala L, Carbajal D, Más R. Farmacología de los agentes antiagregantes plaquetarios. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2005; 36(1): 3-12.
42. Hayasaka M, Takahashi Y, Nishida Y, Yoshida Y, Hidaka S, Asai S. Comparative effect of clopidogrel plus aspirin and aspirin monotherapy on hematological parameters using propensity score matching. *Vasc H risk manag* 2013; 9: 65-70.
43. Passaretti F, Tia M, D'Esposito V, Pascale MD, Corso MD, Sepulveres R, Liguoro D, Valentino R, Beguinot F, Formisano P, Sammartino G. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets (serial on line)*; 2013 (citado 2014 julio 15). Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/09537104.2013.809060>
44. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factors levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002;30(2):97-102.
45. Christgau M, Moder D, Hiller K-A, Dada A, Schmitz G. Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. *J Clin Periodontol* 2006; 33(11): 837-845.
46. Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, Wildermann B. Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, celiac crest and platelet preparation *Bone* 2006; 39(5): 1156-1163.
47. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Different preparation methods to obtain platelet components as a source growth factors for local application. *Transfusion* 2001; 41(10): 1217-1224.
48. Eppley B, Woodwell J, Higgins J. Platelet Quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *PRS* 2004; 114(6):1502-1508.
49. Fréchette J-P, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing. *J Dent Res* 2004; 84(5):434-439.
50. Bertrand-Duchesne MP, Grenier D, Gagnon G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *J Periodont Res* 2010; 45(1):87-93.
51. Fahey JL, Aziz N, Spritzler J, Plaeger S, Nishanian P, Lathey JL; Seigel J, Landay AL, Kilarui R, Schmitz JL, White C, Wara DW, Akridge R, Cutilli J, Douglas SD, Reuben J, Shearer WT, Nokta M, Pollard R, Schooley R, Ashtana D, Mizrahi D y Waxdal M. Need for an External Proficiency Testing Program for Cytokines, Chemokines, and Plasma Markers of Immune Activation. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(4): 540-548).
52. Weibrich W, Kleis W, Hafner G. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: Curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Or Maxill Im* 2002;17(2): 184-190.
53. Anitua E, Troya M, Zaldueño MM, Orive G. The effect of different drugs on the preparation and biological outcomes of plasma rich in growth factors. *Ann Anat* 2014;196(6):423-9.