

Artículo de Investigación

ESTUDIO COMPARATIVO ULTRAESTRUCTURAL DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS OBTENIDO MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN INDIVIDUAL Y DOBLE CENTRIFUGACIÓN

Jorge Meza¹, Leonel Castillo¹, Delsy Dávila², Ángel Carrero³, Ana Julia González⁴

¹ Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes.

² Centro de Microscopía electrónica, Universidad de Los Andes.

³ Odontólogo. Ejercicio privado.

⁴ Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular, Facultad de Odontología

Autor de correspondencia: Jorge Meza. E-mail: jorgemezaf_85@hotmail.com

Recibido: 27-09-2013; **Aceptado:** 18-11-2013

RESUMEN

La regeneración tisular ha sido uno de los retos más anhelados en la odontología. Debido a esto se han desarrollado gran cantidad de biomateriales, entre ellos el Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Este es un producto biológico, autólogo, no tóxico ni alergénico que contiene las plaquetas en forma de sobrenadante tras la centrifugación de sangre anticoagulada. El objetivo de este trabajo fue comparar, ultraestructuralmente, la morfología de las plaquetas en el PRP obtenido mediante el centrifugado individual y doble centrifugación, utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET). Mediante observación estructurada, las muestras sanguíneas fueron obtenidas de 5 pacientes de ambos sexos. A cada individuo se le extrajo una muestra de 20 ml, que se dividió en dos partes. Las muestras pasaron por separado por cada uno de los procesos de centrifugación. Luego de ser preparadas, se observaron al MET en el Centro de Microscopía Electrónica "Dr. Ernesto Palacios Prú" de la Universidad de Los Andes. Los resultados obtenidos indicaron alteración de la ultraestructura plaquetaria en ambos métodos, con mayor daño al ser sometidas al método de doble centrifugación específicamente en las organelas, respecto al método de centrifugación individual. La ultraestructura plaquetaria puede verse afectada luego de ser sometida a procesos de centrifugación para la obtención de PRP con menos daño al utilizar el método de centrifugación individual.

DeCS: plasma rico, plaquetas, ultraestructura, centrifugación, microscopía electrónica.

COMPARATIVE STUDY OF ULTRASTRUCTURAL PLATELET RICH PLASMA OBTAINED BY SINGLE AND DOUBLE CENTRIFUGATION

ABSTRACT

Tissues regeneration has been one of the most expected challenges in dentistry. Due those expectations great deals of biomaterials such as the Platelet Rich Plasma (PRP) have been developed. PRP is a non-toxic, non-allergic, autologous, biological product containing platelets as a supernatant after the centrifugation of anticoagulated blood. The aim of the present study was to ultrastructurally compare, by using Transmission Electron Microscopy (TEM), the morphology of platelets in PRP obtained through single and double centrifugation. Through structured observations, blood samples were obtained from five patients both, female and male. A 20 ml sample was taken from each individual. Later, those samples were divided in 2 parts and each was separately submitted to one centrifugation condition (single and double). After prepared, those samples were observed by using TEM at the Electronic Microscopy Center "Dr. Ernesto Palacios Prú" from the University of Los Andes. Results showed alteration in the platelets ultrastructure for samples treated with both methods, but there was more damage, specifically on the organelles in samples of double centrifugation when compared to single centrifugation ones. The platelets ultrastructure may be affected after being submitted to centrifugation processes to obtain PRP, but less damage is present when using the single centrifugation method.

Key words (MeSH): Ultrastructure, platelets, centrifugation, Platelet Rich Plasma (PRP), Electron Microscopy.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de respuesta de los tejidos ante una agresión está determinada por una serie de eventos que de manera progresiva, se activan para restablecer las condiciones de integridad que haya tenido el tejido antes de ser afectado. En vista de la importancia del proceso de cicatrización en el campo de la cirugía bucal y maxilofacial, es necesario estudiar y desarrollar métodos que permitan mejorar el proceso cicatrizal, tan importante luego de que se realizan diversos procedimientos quirúrgicos.

Debido a esto se han desarrollado gran cantidad de biomateriales, entre ellos el Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Este es un producto biológico, autólogo, no tóxico ni alergénico que contiene las plaquetas en forma de sobrenadante tras la centrifugación de sangre anticoagulada (1).

El objetivo de esta investigación fue comparar, ultraestructuralmente la morfología de las plaquetas en el PRP obtenido mediante el centrifugado individual y doble centrifugación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 5 pacientes de ambos sexos, a quienes se les tomaron muestras sanguíneas aproximadamente 20 ml a cada uno, estas fueron obtenidas en el Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular (LIBCEM) de la Facultad de Odontología de La Universidad de Los Andes, siguiendo el protocolo de punción venosa. Una vez tomadas, se distribuyeron en tubos citratados al 3.8%, y se dividieron en 2 porciones de 10 ml cada una para ser sometidos a los métodos de centrifugación. Figuras 1 y 2.

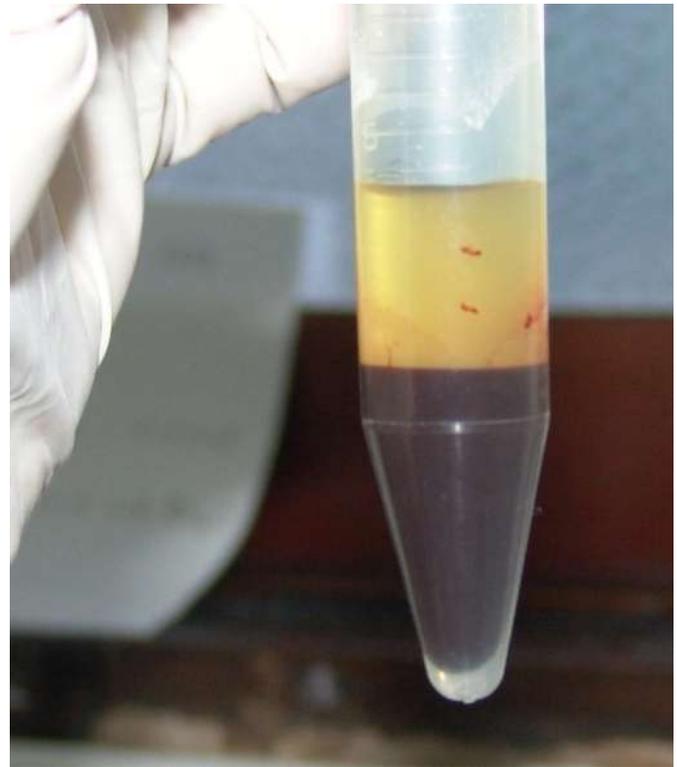


Figura 1. Obtención del plasma rico en plaquetas (PRP).

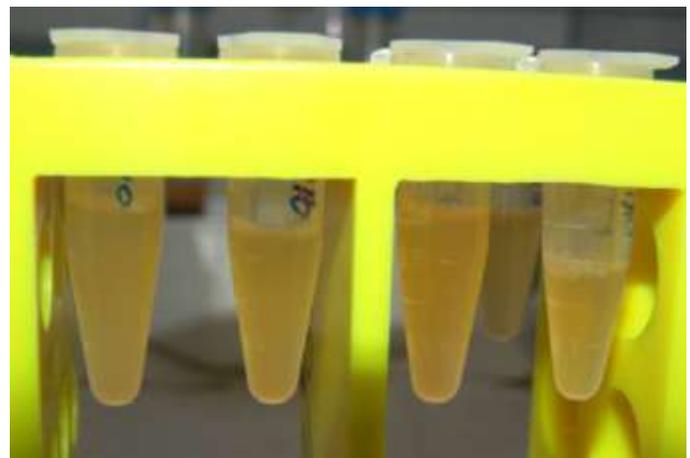


Figura 2. PRP sometido a centrifugación individual y doble centrifugación.

Método de Centrifugación Individual: la muestra sanguínea (10 ml) se recolectó en tubos Vacuum Diagnostics® citratados de 2,7 ml y posteriormente se colocaron en tubos plásticos de 5 ml, se centrifugó a 1800 rpm durante 8 minutos en una centrifuga Digisystem®.

Método de Doble Centrifugación: Los 10 ml restantes de sangre se sometieron a una primera centrifugación en una centrifuga Digisystem® durante 20 minutos a una velocidad de 1200 rpm, para obtener dos fracciones. Luego el sobrenadante se extrajo, tomando 2 ml por debajo de la línea divisoria entre la serie roja y el plasma, este volumen fue transferido a un tubo de ensayo plástico de 5 ml. Este sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación por 15 min a 2000 rpm, posteriormente desde el fondo del tubo se marcaron 0,5 ml los cuales correspondían al PRP.

Análisis ultraestructural: De las muestras de PRP inmediatamente después de ser extraída, fueron sumergidas en mezcla fijadora 3:3 (glutaraldehído al 3% más formaldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3), a 4°C y seccionados en bloques de aproximadamente 3 mm³, manteniendo estas condiciones durante 12 horas.

Luego fueron lavados con abundante tampón cacodilato 0,1 M y pH 6,3 para después ser postfijados durante 18 horas en tetraóxido de osmio al 1% preparado en la misma solución tampón. Posteriormente, se lavaron nuevamente en solución tampón y se inició el proceso de deshidratación e infiltración epoxídica (2).

Seguidamente, el material fue incluido en resina epoxídica y se llevó a una estufa a 60°C durante 48h para garantizar la polimerización de la resina. Lo cual permitió realizar cortes gruesos de 1 a 2 µm de espesor y cortes ultrafinos de 90 nm de espesor.

Estos fueron observados con microscopía de luz de alta resolución y microscopía electrónica de transmisión después de haber sido contrastados con p-fenil-endiamina y con acetato de uranilo y citrato de plomo, respectivamente. Las secciones fueron realizadas utilizando un Ultramicrótomo Sorvall Porter-Blum MT2-B y observadas a través de un microscopio fotónico Polyvar Reichert Jung con cámara fotográfica Infinity digitalizada y de un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-7000 , figura 3 y 4. (3,4,5).



Figura 3. Ultramicrótomo para realizar cortes ultrafinos.



Figura 4. Microscopio electrónico de transmisión.

Se puede observar que mediante el método de centrifugación individual hubo integridad de la membrana externa en la mayoría de los casos (figura 5); sin embargo, también se pudo observar alteración en el citoplasma y las organelas. De igual forma, se realizó un resumen de las características ultraestructurales para las muestras sometidas al proceso de doble centrifugación.

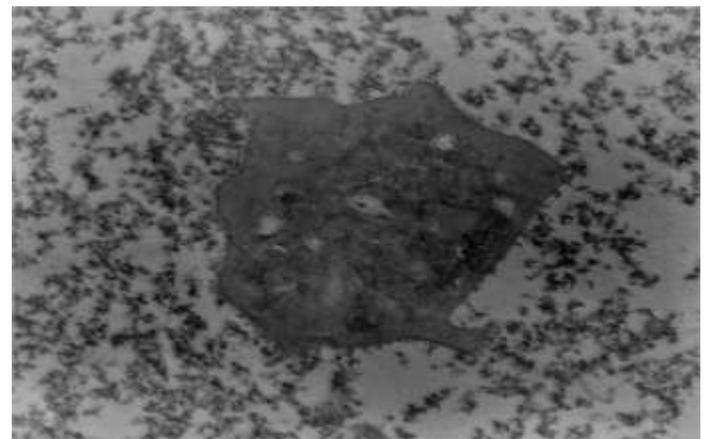


Figura 5: Microfotografía plaqueta sometida a centrifugación individual.

RESULTADOS

Se realizó un análisis general de la estructura de la plaqueta para las muestras en ambos métodos de centrifugación. En primer lugar, en el gráfico 1 se resumen las características ultraestructurales para la muestra de centrifugado individual.

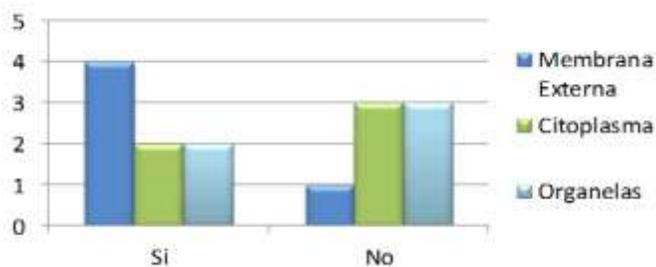


Gráfico 1. Ultraestructura plaquetaria del PRP obtenido por centrifugación individual y doble centrifugación. Estructura de la Plaqueta. Centrifugación Individual.

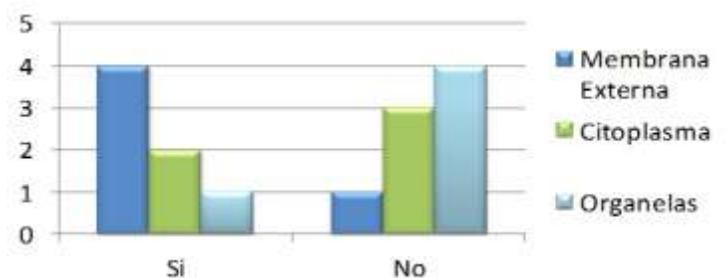


Gráfico 2. Ultraestructura plaquetaria del PRP obtenido por centrifugación individual y doble centrifugación. Estructura de la Plaqueta Centrifugación doble.

En el Gráfico 2, se puede observar que hubo integridad de la membrana externa en la mayoría de las muestras estudiadas, y también una mayor cantidad de muestras con alteración del citoplasma y las organelas.

Los resultados obtenidos indicaron alteración de la ultraestructura plaquetaria en ambos métodos, con mayor daño al ser sometidas al método de doble centrifugación específicamente en las organelas, respecto al método de centrifugación individual (figura 6). La ultraestructura plaquetaria puede verse afectada luego de ser sometida a procesos de centrifugación para la obtención de PRP con menos daño al utilizar el método de centrifugación individual.

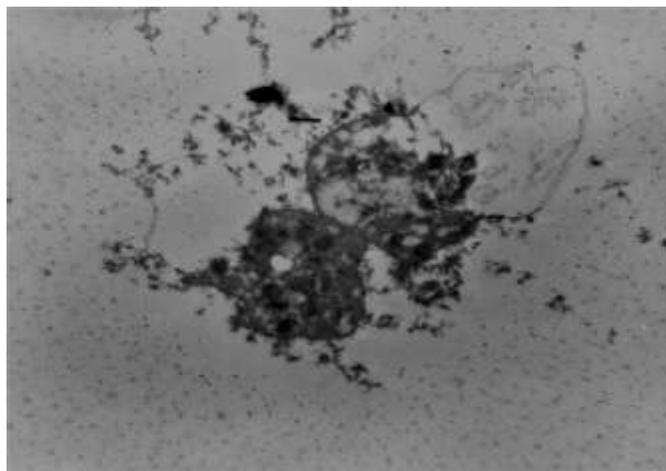


Figura 6. Microfotografía de plaqueta sometida a doble centrifugación.

Concentración plaquetaria del PRP obtenido mediante los métodos de centrifugación usados.

En la realización de este estudio se hizo un conteo plaquetario inicial y uno aplicado a cada método de centrifugación lo cual permitió observar la concentración plaquetaria en cada uno de los grupos de muestras. Los resultados de estos conteos se muestran en la Tabla 1 y 2.

Contaje Inicial	Contaje PRP. Individual *	Aumento
389.400 x mm ³ .	625.500 x mm ³ .	1.36 veces.

* Individual 8 min x 1800 rpm.

Tabla 1: Contaje método de centrifugación individual.

Contaje Inicial	Contaje PRP. Doble*	Aumento
389.400 x mm ³ .	773.500 x mm ³ .	2.1 veces.

* Doble 20 min x 1200 rpm y 15 min x 2000 rpm.

Tabla 2: Contaje método de centrifugación doble.

DISCUSIÓN

Al analizar los datos obtenidos se pudo apreciar que estos hallazgos coinciden con el estudio de Tamimi y col. (9) en cuanto la alteración de estructura de la plaqueta al ser sometida al método de doble centrifugación. Sin embargo este estudio no describe en detalle que estructura plaquetaria se ve afectada.

Las alteraciones presentes en la ultraestructura de la plaqueta, específicamente en las organelas las cuales se vieron afectadas, pudieran obedecer a una fuerza de centrifugación excesiva; ya que la aplicación de ésta reduce dramáticamente la cantidad de factores de crecimiento contenidos en las organelas, específicamente en los gránulos α de la plaquetas (16). Al hacer un procedimiento de doble centrifugación se incrementa la cantidad de

fuerza centrífuga aplicada, exponiendo la plaqueta a dichos efectos.

De esta forma, es posible hablar a favor del uso del método de centrifugación individual, pues a través de éste se observaron menos alteraciones a la integridad de las plaquetas.

Por otra parte, al realizar el conteo plaquetario previo y posterior a la obtención del PRP se obtuvo información extra a los objetivos de esta investigación y se compararon los resultados con el estudio de otros autores como Anitua y Hatakeyama (5).

La concentración plaquetaria obtenida mediante centrifugación individual fue de 625.500 plaquetas con un aumento del 1.39 en relación al conteo plaquetario previo a la realización del estudio, cantidad similar a la obtenida por el método propuesto por Anitua que fue de 1.09 (5).

Al comparar los resultados de la presente investigación donde el promedio de concentración plaquetas del método de doble centrifugación fue de 773.500 con un aumento del 2.1, lo que difiere a los resultados propuestos por Sonnleitner (5) quien encontró que éste método concentra (4.60), es decir 4 veces más que el obtenido por Anitua y que el obtenido es este estudio.

Es pertinente resaltar que dado que existen poca investigación relacionadas con el análisis ultraestructural del PRP obtenido mediante los diferentes métodos, se dificulta comparar los resultados con otras publicaciones y deja esta investigación como punto de partida para futuros estudios.

CONCLUSIONES

La ultraestructura plaquetaria puede verse afectada luego de ser sometida a procesos de centrifugación para la obtención de PRP. Con el método de centrifugación individual se obtienen plaquetas con menos alteraciones en la ultraestructura que con el método de doble centrifugación. Pareciera ser más efectivo el método de centrifugación individual en cuanto a mantener la ultraestructura de la plaqueta ya que ésta se ve menos afectada al estar expuesta a menos cantidad de fuerza centrífuga.

Con base en los datos obtenidos es posible hablar a favor de la obtención de PRP por medio del método de centrifugación individual, el cual mostró ser más favorable desde el punto de vista económico, de tiempo y de practicidad lo cual justifica el uso del método de centrifugación individual en la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al Laboratorio Integrado de Biología Celular y Molecular (LIBCEM) de la Facultad de Odontología de La Universidad de Los Andes y al Centro de Microscopía Electrónica. “Dr. Ernesto Palacios Prú”. De la Universidad de Los Andes, a todo su personal por colaboración, apoyo y ayuda desinteresada para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1999;14(4):529-35.
2. Anitua E. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). *Gaceta Dental*, 2001; 123:51-4.
3. Marx RE, Garg A. *Dental and Craniofacial Applications of platelet-rich plasma.* Quintessence Books. 2005.
4. Jovani, Maria. El plasma rico en plaquetas en la regeneración ósea post-exodoncia. estudio radiográfico. Tesis doctoral. Universitat de Valencia. Servei publicacions. 2009.
5. Hatakeyama, M. Beletti, M. Zanetta, D. Dechichi, P. Radiographic and Histomorphometric analysis of bone healing using autogenous graft associated with platelet-rich plasma obtained by 2 different methods. *Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105 : e13- e18. 2007.
6. Klinger MHF. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Ann Hematol* 1996;76:103-.
7. McKensie S. *Hematología Clínica.* Editorial El Manual Moderno, México 2000.
8. Anitua E. Factores de crecimiento plasmático. Una revolución terapéutica. *Ideas y Trabajos Odontostomatológicos.* 2001; 2: 90-4.
9. Gómez, B. Becerro, R. Losa, M. Sánchez, R. Plasma Rico en Factores de Crecimiento. (PRGF). *Revist Intern de Ciències Podològiques.* Vol. 1. 2007, 7-10
10. Ballester JF, Solá J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnás MM, Molinos Alvarez . A. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del coágulo concentrado de plaquetas. *Rev Esp Odontostomatológica de implantes* 2003; 11(1): 6-13.
11. Lobato, M. Criado, A. Plasma Rico en Plaquetas en la clínica dental. *Gaceta Dental* 2009 166-168.
12. . Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Puesta al Día publicaciones, SL.* Vitoria, 2000.
13. . Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): What is PRP and What is not PRP? *Impl Dent* 2001; 10(4): 225-8.
14. Tamimi, F. Montalvo, S. Tresguerres, L. Blanco, L. 2007. Comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral maxillofac Surg.* 65-1084-1093.

15. Bowen A. et al. Técnicas quirúrgicas avanzadas para la regeneración ósea en implantología. *Gaceta Dental*. 2002;128:36-60.
16. Whitman DH, Berry RL, Green D. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Maxillofac Surg* 1997; 55:1294-99.
17. Castillo, Leonel. Efecto del Plasma Rico en Plaquetas sobre la Regeneración Osea: Estudio en animales de Laboratorio. Tesis de Maestría. 2009.
18. Felzani R. Cicatrización de los tejidos con interés en cirugía bucal: revisión de la literatura. *Acta Odontol. Venez* v.43 n.3 Caracas 2005.
19. Hernández R. Fernández C. Baptista L. Metodología de la Investigación. México. Editorial McGraw-hill; 2003.
20. Setubal G. De Freitas C. Neves C. Dos Santos T. De Bittencourt C. Sadigursky M 2008. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 105:e5-e12.
21. Sonnleitner, D. Huemer, P. Sullivan, D. A Simplified technique for Producing Platelet-Rich Plasma and Platelet Concentrate for Intraoral Bone Grafting Techniques: A technical Note. *Inter. J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15:879-882.
22. Landerberg R, Roy M, Glickman Rs. Quantificación of growth factor level using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac Surg*. On line 2000; 58 (3) : 3-4
23. Landerberg R, Roy M, Glickman Rs. Quantificación of growth factor level using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. *J. Oral Maxillofac Surg*. On line 2000; 58 (3) : 3-4
24. Palacios-Prü EL, Mendoza-Briceño RV. (1972). An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res.*, 36: 404-408.
25. Watson H.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol.*, 4: 475-478.
26. Reynolds E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain electron microscopy. *J Cell Biol.*, 17: 208-212.
27. Sato T. (1967). A modified method for lead staining of thin sections, *J Electron Microsc.*, 16: 133.