

## Casos clínicos

---

# Efecto del plasma rico en plaquetas en la cicatrización de heridas de piel

## *Effect of platelets rich plasma in the healing of skin wounds*

Bertone, PA<sup>1</sup>; Boaglio, CM<sup>2</sup>; Ruiz, FO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Médica Veterinaria. Doctora en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria. Profesora Adjunta Departamento de Clínica Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC).

<sup>2</sup> Médico Veterinario. Especialista en Clínica Animal. Profesor Adjunto Departamento de Clínica Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC.

<sup>3</sup> Microbiólogo. Doctor en Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. UNRC. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

36

### RESUMEN

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) tiene como finalidad la liberación de factores de crecimiento sostenida en el tiempo y se presenta como una alternativa terapéutica que promueve la reparación de los tejidos. El objetivo fue evaluar el efecto del PRP en la cicatrización de heridas de piel en conejos. Diseño de tipo experimental. El PRP se obtuvo por doble centrifugación la primera 1200 rpm, 10 minutos y la segunda 2000 rpm, 10 minutos de sangre venosa de cada conejo (n=12). Se realizaron dos heridas circulares en piel. Se aplicó por inyección PRP activado con CaCl<sub>2</sub> en la herida derecha y NaCl (0,9%) en la izquierda como control. En Grupo 1 (n=6) se observó el aspecto de las

heridas y se registró fotográficamente hasta la cicatrización completa. En el Grupo 2 (n=6) se realizaron biopsias de piel a 7, 15 y 30 días posquirúrgicos. La cicatrización total de las heridas se produjo, en promedio, a los 20 días en las heridas tratadas y en los controles a los 25 días. Los efectos del PRP en la cicatrización se estimaron por los cambios histológicos, en las heridas tratadas se observó densa vascularización y abundante proliferación de fibroblastos en el día 7, con valores promedios mayores a los controles (p<0.05). Aumento de la epidermis a los 15 días en las heridas tratadas. No hubo diferencias significativas en relación a polimorfonucleares. En el modelo evaluado el PRP es un preparado que puede emplearse para favorecer la cicatrización de las heridas de piel.

**Palabras clave:** cicatrización, piel, plasma, plaquetas.

### SUMMARY

Platelet Rich Plasma (PRP) has the purpose of releasing sustained growth factors over time and is presented as a therapeutic alternative that promotes the repair of tissues. The objective was to evaluate the effect of PRP on the healing of skin wounds in rabbits. Experimental design. The PRP was obtained by double centrifugation the first 1200 rpm, 10 minutes and the second 2000 rpm, 10 minutes of venous blood from each rabbit (n = 12). Two circular wounds were made on the skin. PRP was activated by injection with CaCl<sub>2</sub> in the right wound and NaCl (0.9%) in the left as control. In Group 1 (n = 6) the appearance of the wounds was observed and recorded photographically until complete healing. In Group 2 (n = 6) skin biopsies were performed at 7, 15 and 30 postoperative days. The total healing of the wounds occurred, on average, at 20 days in the wounds treated and in the controls at 25 days. The effects of PRP on healing were estimated by histological changes, in the treated wounds dense vascularization and abundant proliferation of fibroblasts was observed on day 7, with average values higher than controls (p < 0.05). Increase of the epidermis at 15 days in the wounds treated. There were no significant differences in relation to polymorphonuclear cells. In the model evaluated, PRP is a preparation that

can be used to promote the healing of skin wounds.

**Keywords:** healing, skin, plasma, platelets

### INTRODUCCIÓN

La cantidad de eventos donde la piel puede estar afectada por heridas o alteraciones de su integridad, como quemaduras, laceraciones, abrasiones y los continuos avances en el conocimiento del proceso de cicatrización han propiciado la búsqueda de preparados que aceleren y mejoren la reparación de los tejidos.<sup>1-3</sup>

El proceso de cicatrización de la piel está mediado por procesos físicos, químicos y celulares, para su estudio se divide en cuatro fases superpuestas bien definidas, que incluyen la hemostasia, la inflamación, la proliferación y, por último, la remodelación.<sup>2,4-7</sup> Schultz et al. subdividen la tercera fase en migración y proliferación y la cuarta en contracción y remodelación.<sup>5</sup>

En la clínica se presentan pacientes con heridas que no mejoran a pesar del tratamiento adecuado y una opción terapéutica para estimular y acelerar el proceso de curación es la generación de concentrados plasmáticos de plaquetas.<sup>2,8,9</sup>

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es un volumen de plasma autólogo con una concentración de plaquetas al menos el doble de los valores basales y se obtiene por doble-centrifugación, con parámetros de tiempo y velocidad establecidos.<sup>10</sup>

## Efecto del plasma rico en plaquetas en la cicatrización de heridas de piel

El uso de este concentrado plasmático plaquetario se fundamenta en la modulación y aceleración de los procesos de reparación a través de la liberación de los factores de crecimiento presentes en las plaquetas, iniciadores de la mayoría de los procesos de regeneración.<sup>8,9,11-13</sup>

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación del PRP en la cicatrización de heridas quirúrgicas experimentales en piel de conejos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo con un diseño de tipo experimental es parte de un proyecto de investigación aprobado y financiado por Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNRC (Res. Rec. N°161/16) y todos los procedimientos de estudio en animales fueron aprobados por el Comité de Ética de la UNRC.

El material de estudio, PRP se obtuvo de sangre venosa de cada conejo anestesiado (n=12) en tubos con solución Citrato de Na 3,8 % (Volumen 4,5 cc con 0,5 cc Citrato de Sodio).

Se realizó doble centrifugación, la primera a velocidad de 1200 rpm, 10 minutos se separa la sangre completa en una franja roja inferior de eritrocitos, una franja leucocitaria intermedia y otra traslúcida superior de plasma, por pipeteado se retiró la parte superior del plasma, que se colocó en un segundo tubo y se realizó una segunda centrifugación a 2000 rpm, 10 minutos y se retira con

pipeta el PRP que se reserva para su uso. Todo el proceso se desarrolló en condiciones de asepsia y se obtuvieron 3,2 veces más plaquetas que el recuento plaquetario de sangre periférica.

Se utilizaron 12 conejos albinos neozelandeses (*Oryctolagus Cuniculi*) clínicamente sanos, machos y hembras, peso promedio 4,5 Kg.

Se empleó anestesia general para realizar dos heridas circulares (20 mm) en piel de espesor completo, una a cada lado del dorso del animal. Por inyección en los bordes de la herida quirúrgica se aplicó PRP, activado con CaCl<sub>2</sub> en la herida derecha y en la izquierda NaCl 0,9%, como control, ambos tratamientos se realizaron por única vez.

En el Grupo 1 (n=6) se observó diariamente el aspecto de las heridas y se registró fotográficamente hasta la cicatrización completa. Se registró en una tabla de observación para el desarrollo espacial y temporal del tejido de granulación.

En el Grupo 2 (n=6) se realizaron biopsias de piel a los 7, 15 y 30 días posquirúrgicos. Las muestras para microscopia se fijaron en formaldehído en solución acuosa al 10%. Se utilizó tinción diferencial de hematoxilina y eosina y de tricrómica de Masson para los cortes histológicos.

Se evaluó el proceso cicatrizal analizando las variables: polimorfonucleares, mononucleares, proliferación vascular, fibroblastos,

## Efecto del plasma rico en plaquetas en la cicatrización de heridas de piel

colágeno y reepitelización. Para estimar la evolución se empleó una escala semicuantitativa (0: ausente a 3: acentuado).

### RESULTADOS

En el examen macroscópico las heridas presentaron color rojizo con exudado sero-sanguinolento durante los dos primeros días como se visualiza en la Figura 1.



Figura 1. Aspecto de las heridas el primer día posquirúrgico, la herida derecha tratada con PRP y la herida izquierda control.

En la Figura 2 se observa al día 8 la retracción de los bordes de la herida tratada con PRP, la mayor reducción del diámetro de la herida tratadas en comparación con las heridas control se registró a los 3, 8 y 12 días.



Figura 2. Aspecto de las heridas a los 8 días del tratamiento, presentan color rosado amarillento y secas, la herida derecha tratada con PRP presenta menor diámetro que la herida izquierda control.

En la Figura 3 se observa el aspecto de las heridas a los 12 días, menor diámetro de la herida derecha tratada con PRP y en la Figura 4 se observa el aspecto de las heridas a los 19 días.



Figura 3. Aspecto macroscópico de las heridas a los 12 días del tratamiento, se observa la mayor retracción de los bordes en la herida derecha tratada con PRP respecto a la herida izquierda control.



Figura 4. Aspecto macroscópico de las heridas a los 19 días del tratamiento, la herida derecha tratada con PRP y la herida izquierda control.

La cicatrización total de las heridas, en promedio, se produjo a los 20 días en las heridas tratadas con PRP y en las heridas

## Efecto del plasma rico en plaquetas en la cicatrización de heridas de piel

controles a los 25 días. En la Figura 5 la representación gráfica del valor promedio del tejido de granulación entre las heridas tratadas con PRP y las heridas del grupo control en los días del estudio.

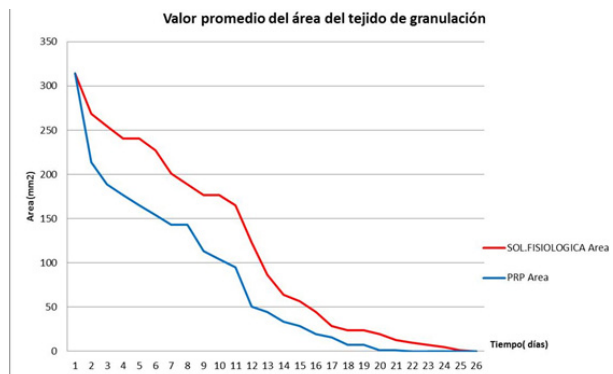


Figura 5. Representación gráfica del valor promedio del área de tejido de granulación en los conejos tratados con PRP y control durante los 30 días del estudio.

En la evaluación microscópica de la reacción inflamatoria de la herida no hubo diferencias estadísticamente significativas en relación a polimorfonucleares entre las heridas tratadas y control ( $p = 0,90$ ) durante todo el periodo de estudio. Respecto a las células mononucleares en las heridas tratadas con PRP se observó un incremento significativamente mayor a los 7 días en comparación al control.

A los 7 días, se observa en la dermis papilar de piel de conejo de la herida control desorganización de dermis y escasos fibroblastos, mientras que en la herida tratada con PRP hay mayor número de fibroblastos, con valores promedios mayores a los controles ( $p < 0,05$ ). A los 15 días de tratamiento

con PRP se registra la mayor proliferación de fibroblastos.

A partir del día 7 se halló un importante nivel de proliferación vascular temprana y un aumento vascular estadísticamente más significativo a los días 7 y 15 en las heridas tratadas en comparación a los controles como se observa en la Figura 6 y la Figura 7.

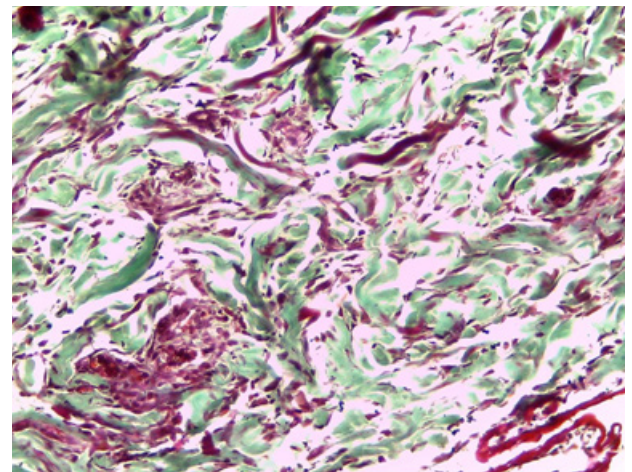


Figura 6. Corte histológico de piel de conejo de heridas control, a los 15 días en la zona de dermis papilar desorganizada, escasos vasos sanguíneos y fibroblastos. Tinción tricrómica de Masson. Microfotografía 20x.

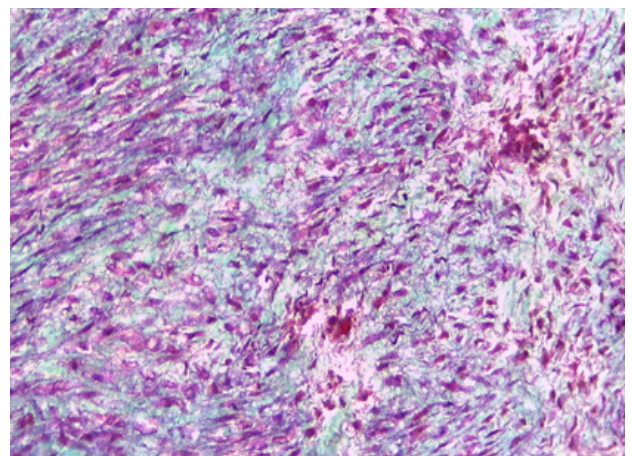


Figura 7. Abundante neo-vascularización y presencia de fibroblastos en corte histológico de piel de conejo. A los 15 días de tratamiento con PRP, en la zona de dermis papilar. Tinción tricrómica de Masson. Microfotografía 20x.

El mayor engrosamiento de la epidermis se encontró a los 15 días en las heridas tratadas con PRP y las heridas de control en el día 30, lo que indica que las heridas tratadas con PRP se diferencian más rápido que las heridas de control. En la Figura 8 se observa una muestra de piel tratada con PRP donde claramente se evidencia un engrosamiento del epitelio plano estratificado con una capa de queratina.

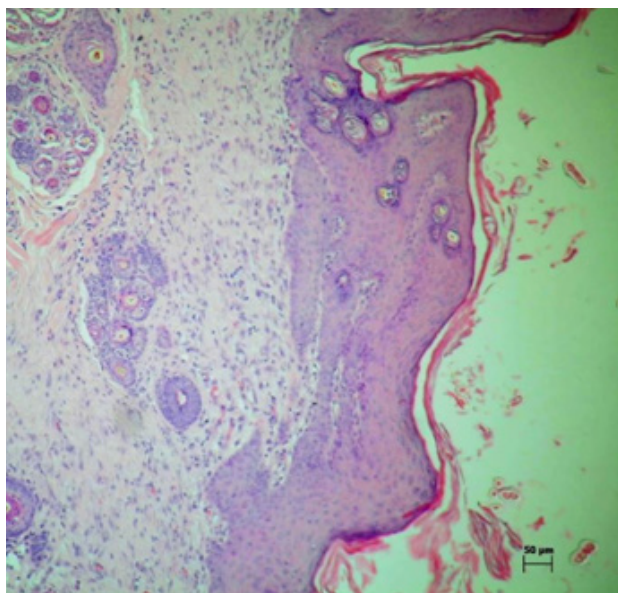


Figura 8. Corte de piel de conejo tratada durante 15 días con PRP. Se visualiza el engrosamiento de la epidermis (epitelio plano estratificado) y una capa de queratina. Tinción hematoxilina y eosina. Microfotografía 10x.

Al finalizar la experiencia, día 30, las biopsias de piel tratadas con PRP mostraron abundancia de fibras colágenas y reorganización del material fibroso en la dermis papilar compatible con fase de remodelación. Mientras que en los controles se observó menor cantidad de fibras colágenas, dispuestas en forma desorganizada y mayor

presencia de vasos sanguíneos, compatible con fase proliferativa de la cicatrización; como se observa en la Figura 9 respecto a la Figura 10 que se corresponde a las tratadas con PRP.

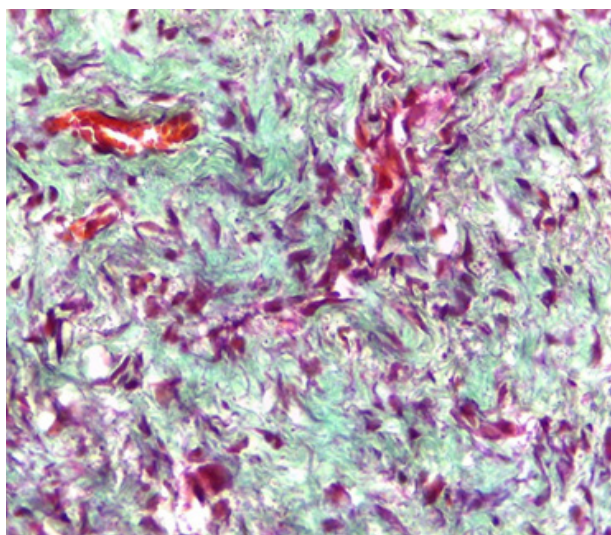


Figura 9. Corte histológico de piel de conejo de herida control a los 30 días. Se observa fibras colágenas dispuestas en forma desorganizada y presencia de vasos sanguíneos compatibles con fase proliferativa. Tinción tricrómica de Masson. Microfotografía 40x.

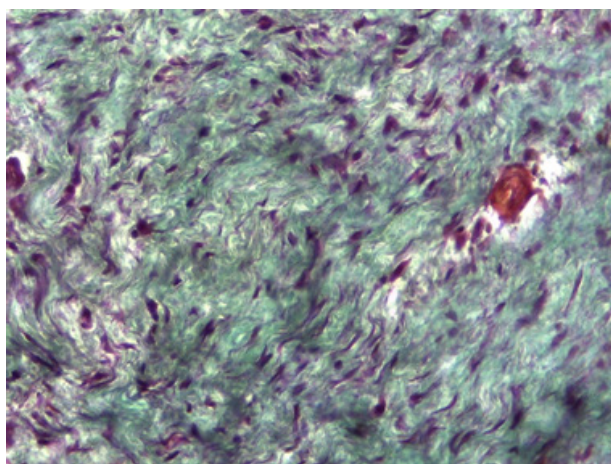


Figura 10. Abundancia de fibras colágenas y una reorganización del material fibroso en la dermis papilar compatible con fase de remodelación en corte histológico de piel de conejo tratada con PRP durante 30 días. Tinción tricrómica de Masson. Microfotografía 40x.

### DISCUSIÓN

La evaluación de una herida, coincidiendo con bibliografía<sup>2,3</sup> puede valorarse mediante un análisis fotográfico y por medición de la reducción del tamaño de la misma, que en este estudio se facilitó por la forma circular elegida para la herida quirúrgica, propuesta por Collins.<sup>1</sup> Las heridas se examinaron macroscópicamente y microscópicamente, se compararon los resultados de las heridas control y de las tratadas con PRP para evaluar la evolución de la curación.

La cicatrización total se produjo cinco días antes en las heridas tratadas con PRP. Inferimos que el uso de este concentrado plaquetario como cicatrizante se fundamenta en la modulación y aceleración de los procesos cicatrizales a través de los factores de crecimiento presentes en las plaquetas, iniciadores de la mayoría de los procesos de regeneración.<sup>6,8-10</sup>

El uso de factores de crecimiento sintéticos tiene un elevado costo económico y son necesarias dosis repetidas para conseguir un efecto terapéutico clínicamente evidente,<sup>12</sup> los resultados obtenidos evidencian clínicamente que la obtención de este preparado biológico suministró una liberación mantenida en el tiempo de los factores de crecimiento contenidos en las plaquetas.<sup>8,11</sup>

El análisis histológico de cortes de tejidos permite estimar la evolución en la reparación de los tejidos en diversos modelos

experimentales. La bibliografía<sup>1,2,4-7</sup> menciona que la cicatrización de la piel es un proceso de complejos mecanismos celulares, moleculares, fisiológicos y bioquímicos, que por medio de la quimiotaxis, proliferación, depósito y reorganización de la matriz extracelular regulan el cierre de los tejidos lesionados.

Los fibroblastos conservan la integridad tisular, mediante la síntesis de componentes de la matriz extracelular y del tejido granulación.<sup>2,4-6</sup> La mayor intensidad de fibroblastos se observaron en las heridas tratadas, es lo esperado por el efecto de quimiotaxis de los factores de crecimiento.<sup>6,7</sup> Este hallazgo coincide con reportes<sup>13</sup> que consideran al PRP como un material biológico que actúa mediante una matriz de fibrina rica en plaquetas y citoquinas que favorecen la proliferación de fibroblastos.

La revascularización temprana observada en este estudio después del tratamiento con el PRP, fue similar a los hallazgos de Vendraminet al que testearon la aplicación de PRP en injertos cutáneos observando el desarrollo de un tejido de granulación de mejor calidad y con presencia de vascularización más intensa que los controles y lo relaciona con los factores de crecimiento que se encuentran en las plaquetas, responsables de actuar en las primeras etapas de curación.<sup>2,7,11</sup>

En la etapa de proliferación las células endoteliales y los fibroblastos deben estar presentes, éstas células promueven la pro-

liferación y diferenciación de los queratinocitos, esencial en la reepitelización y en la deposición de colágeno<sup>2,4,5</sup>. En el presente estudio el cierre cutáneo en las heridas tratadas con PRP fue más temprano que en el grupo control, la evaluación histológica global reveló que en la etapa final del proceso de curación de las heridas tratadas muestran una mejor organización de los haces de las fibras de colágeno en comparación con las heridas no tratadas. Hay reportes<sup>6,9,12</sup> de los estímulos inducidos por los factores de crecimiento como método para mejorar la sobrevida tisular que acuerdan con nuestro estudio. Los resultados obtenidos evidencian que la producción de este preparado permitió una liberación sostenida en el tiempo de los factores de crecimiento y favoreció la cicatrización.

### CONCLUSIÓN

En el modelo evaluado, la aplicación del PRP demostró mayor eficacia en la evolución clínica e histológica de la cicatrización de las heridas de piel en conejos, lo que indicaría su potencial bioterapéutico.

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses. ✍

### BIBLIOGRAFÍA

<sup>1</sup>Collins, T. Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: Robbins S., Cotran, R., Kumar, V., Collins, T. (Eds) Patología estructural y funcional. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000:95-120.

<sup>2</sup> Enoch, S y Leaper, DJ. Basic Science of Wound Healing. Surgery 2007; 26:31-37.

<sup>3</sup>Fossum, T. Cirugía en pequeños animales. 3° edición. Argentina. Intermédica. 2000.

<sup>4</sup>Young, A. and McNaught CE. The physiology of wound healing. Surgery 2011; 29(10):475-479.

<sup>5</sup>Schultz, GS.; Davidson, JM.; Kirsner RS.; Bornstein P.; Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. Wound Repair and Regeneration 2011; 19(2):134-148.

<sup>6</sup>Martin, P.; Nunan, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. Br J Dermatol 2015; 173(2):370-378.

<sup>7</sup>Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. The Journal of International Medical Research 2009; 37:1528-1542.

<sup>8</sup>De Acosta Andino, D.; Porres Aguilar, M.; Vázquez Saldaña, D.; Makipour, J.; Bedolla E. Actualización bibliográfica sobre el uso de preparaciones ricas en plaquetas en la cicatrización de heridas. Cirplást Iberolatinoam 2010; 36(3): 231-238.

<sup>9</sup>Beca, T.; Hernández, G.; Morante, S.; Bascones, A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. Periodon Implantol 2007; 19:39-52.

<sup>10</sup>Marx, R. Quantification of Growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. J Oral Maxillofac Surg 2000; 58:300-301.

<sup>11</sup> Vendramin, F.; Franco, D.; Franco, T. Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. Rev Bras Cir Plást 2010; 25(4):589-594.

<sup>12</sup>Anitua, E.; Sánchez, M.; Orive, G.; Andia, J. Delivering growth factors for therapeutics. Review. Journal Trends in Pharmacological Sciences 2008; 29(1):37-41.

<sup>13</sup>Liu, Y.; Kalen, A.; Risto, O. Fibroblast proliferation due to exposure to platelet concentrate in vitro is pH dependent. Wound Repair Regen 2002; 10:336-40.

