

## Factores de crecimiento en plasma rico en plaquetas de individuos sanos tratados con agentes antiplaquetarios

Maczy González-Rincón<sup>1</sup>; Gino Curiel<sup>2</sup>; Keiryth Barreto<sup>2</sup>; Ana Ruiz<sup>3</sup>;  
Jesús Quintero<sup>4</sup>; María Patricia Sánchez<sup>2</sup>, Carem Prieto<sup>5\*</sup>; Hermel Espinosa<sup>6</sup>;  
Fabricio Guerrero<sup>7</sup>; Karla Aspiazú<sup>8</sup>

(Recibido: febrero 03, Aceptado: mayo 20, 2022)  
<https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol6iss10.2022pp58-68p>

### Resumen

Las propiedades del plasma rico en plaquetas (PRP) son atribuidas especialmente a su alto nivel de factores de crecimiento (FCs), la acción de los agentes antiplaquetarios podría alterar la liberación de los FCs del PRP. Este estudio evaluó los niveles del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) en el PRP y plasma pobre en plaquetas (PPP) de 20 individuos sanos antes y después del tratamiento con agentes antiplaquetarios. A los 20 individuos se les extrajo una muestra de sangre venosa para la obtención del PPP y PRP mediante el método de centrifugación única de Anitua. Los mismos 20 individuos se dividieron en dos grupos: 10 recibieron una dosis oral diaria Aspirina (100 mg) y 10 de Clopidogrel (75 mg) por 7 días. Luego del tratamiento se repitió el procedimiento de obtención del PRP y PPP. Se midieron los niveles de los FCs en las muestras usando la técnica de ELISA. Al comparar los niveles pretratamiento y postratamiento, hubo una disminución significativa en el grupo tratado con Aspirina en el PDGF-BB (PPP: <0,05) y EGF (PPP: <0,05/ PRP: <0,04) y el grupo tratado con Clopidogrel en el PDGF-BB (PPP: <0,009/ PRP:<0,0001), VEGF-A (PPP: <0,001/ PRP<0,01) y EGF (PPP: <0,04/ PRP<0,018). La disminución de los FCs después del tratamiento con ambos agentes antiplaquetarios, especialmente Clopidogrel, no permite asegurar que el efecto clínico de los FCs plaquetarios pueda verse afectado sensiblemente por lo que se necesitan futuros estudios clínicos.

**Palabras Clave:** Aspirina; Clopidogrel; EGF; PRP; PDGF; VEGF.

## Growth factors in platelet rich plasma of healthy participants treated with antiplatelet agents

### Abstract

Properties of platelet rich plasma (PRP) were attributed specially of high levels of growth factors (GFs), action of antiplatelet agents could alter the release of GFs from PRP. This study assessed the level of platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and epidermal growth factor (EGF) from PRP of 20 healthy participants before and after treatment with antiplatelet agents. Venous blood samples were collected from the 20 participants to obtain PPP and PRP by the single centrifugation method of Anitua. The same 20 participants were divided in two groups: 10 received a dairy oral dose of Aspirin (100 mg) and 10 of Clopidogrel (75 mg) for 7 days. The procedure to obtain PPP and PRP was repeated after treatment. Levels of GFs were measured using the technique of ELISA. When pretreatment and posttreatment levels were compared, a significant decrease was found in the group treated with Aspirin in the PDGF-BB (PPP: <0,05) and EGF (PPP: <0,05/ PRP: <0,04) and group treated with Clopidogrel in PDGF-BB (PPP: <0,009/ PRP:<0,0001), VEGF-A (PPP: <0,001/ PRP<0,01) and EGF (PPP: <0,04/ PRP<0,018). Decreases in GFs after treatment of each antiplatelets agent, specially Clopidogrel, cannot ensure that clinical effect of platelet GFs would be completely affected, future clinical studies are needed.

**Keywords:** Aspirin; Clopidogrel; EGF; PRP; PDGF; VEGF.

<sup>1</sup> Licenciada en Bioanálisis, Doctora en Ciencias de la Salud. Universidad del Zulia, Venezuela. Email: maczygonzalez@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9343-6548>

<sup>2</sup> Lic. en Bioanálisis. Universidad del Zulia, Venezuela. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8572-4451>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0743-400X>; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7290-5349>

<sup>3</sup> Licenciada en Bioanálisis, Doctora en Ciencias de la Salud. Universidad del Zulia, Venezuela. Email: ruizag2801@yahoo.es. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9500-8755>

<sup>4</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Director del Instituto de Investigaciones Clínicas "Dr. Américo Negrette". Universidad del Zulia, Venezuela. Email: jequin@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5677-8821>

<sup>5</sup> Licenciada en Bioanálisis, Doctora en Ciencias de la Salud, Investigadora del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas Dr. Feliz Gómez, Universidad del Zulia, Venezuela. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: carem.prieto@ucacue.edu.ec. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7752-932X>

<sup>6</sup> Especialista en Medicina Interna. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: spinossa\_2@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4733-8722>

<sup>7</sup> PhD. Medicina e Investigación Traslacional. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: dr.fabricioguerro@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9909-3689>

<sup>8</sup> Máster en Investigación médica clínica y experimental. Universidad Católica de Cuenca, Ecuador. Email: drakarlaaspiazú@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6016-4109>

\* Autor de correspondencia

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de preparados celulares como el plasma rico en plaquetas (PRP) ha descrito tener utilidad como una terapia coadyuvante para contrarrestar los procesos celulares de envejecimiento y regeneración tisular lo que ha conducido su uso en múltiples ramas de la biología, medicina, odontología, y ciencias afines. Esto se debe principalmente al hecho de que las plaquetas son una abundante fuente de factores de crecimiento (FCs) y otras moléculas de señalización que regulan respuestas biológicas en procesos claves durante el proceso de la reparación celular en respuesta al daño tisular y vascular (1) (2).

Las plaquetas contienen tres tipos de gránulos secretores: los gránulos  $\alpha$ , gránulos densos, y lisosomas. Estos gránulos secretan sustancias importantes en la formación del tapón plaquetario y el coagulo hemático durante la hemostasia, con la finalidad del cese del sangrado y la regeneración tisular del tejido dañado. Los gránulos  $\alpha$  son los más predominantes debido a su mayor número (50 a 80 por plaqueta), estos contienen en su interior una importante cantidad de FCs (2) (3).

Los FCs en el PRP promueven cuatro acciones principales en el medio donde son administrados como la proliferación, migración, diferenciación y angiogénesis (3). Su mecanismo de acción inicia al unirse a receptores específicos en varios tipos de célula, esta unión activa una cascada de señalización de segundos mensajeros que conlleva a la expresión de una secuencia de genes que regulan una función específica (4). Entre los factores de crecimiento plaquetarios se encuentran el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) entre otros (1) (2) (5).

El PDGF posee 4 isoformas conocidas: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB. Es un promotor de la quimiotaxis y mitosis de las células mesenquimales y fibroblastos. Facilita la formación del colágeno tipo I y la proliferación de células adiposas y fibroblastos dérmicos.

Mediante un mecanismo indirecto de quimiotaxis promueve a la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) a través de los macrófagos (1) (5).

Por su parte, el VEGF es un mediador angiogénico, interviene durante las etapas embrionarias y postnatal. Induce la angiogénesis a través de la quimiotaxis de las células endoteliales e inhibe su apoptosis, presenta 5 isoformas, la más abundante en las plaquetas es la VEGF-A. Es producido además por otras células como los macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas en estado de hipoxia (1) (5).

El EGF actúa en la quimiotaxis, diferenciación y proliferación de las células mesenquimales, fibroblastos y las células epiteliales, osteoblastos, células musculares lisas. Se le atribuye la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación celular en procesos de epitelización de la epidermis epitelio corneal, pulmonar y tráquea, durante la reparación tisular (5).

El uso del PRP se ha extendido a través de diversas ramas de la medicina, no solo por su alta concentración de FCs, sino también por ser un procedimiento mínimamente invasivo, fácil y de bajo costo (1) (3.) Generalmente es obtenido mediante centrifugación diferencial de la sangre del propio paciente (autóloga). El PRP se define como una fracción plasmática que posee una concentración de plaquetas 2 a 5 veces superior al número de plaquetas en sangre periférica (5). Para que los FCs sean liberados al medio extracelular, las plaquetas dependen de una serie de procesos metabólicos intracelulares y agonistas que promueven la activación plaquetaria con la consecuente secreción de estos dichos factores (6).

En condiciones fisiológicas la activación plaquetaria influye en el cese de sangrado y reparación de los vasos sanguíneos lesionados, pero la alteración de este proceso puede conllevar a un estado patológico como la trombosis, formando coágulos (trombos) en vasos sanguíneos intactos. Los agentes antiplaquetarios como la Aspirina (Ácido acetil salicílico-AAS) y las tienopiridinas (Clopidogrel /Ticlopidinas) son fármacos

utilizados universalmente en el tratamiento de pacientes con tendencia a formar trombos por diversas causas de origen metabólico, así como cardiopatías congénitas y/o adquiridas, enfermedad cerebrovascular entre otras. Los agentes antiplaquetarios reducen el riesgo a eventos cardiovasculares, sin embargo, sus mecanismos de acción al inhibir la activación y agregación plaquetaria podrían interferir en la secreción de los FCs y las propiedades reconocidas del PRP (5) (7).

El AAS es un ácido inorgánico, ingerido vía oral inhibe irreversiblemente la enzima ciclooxigenasa 1 (COX-1) al inactivar el sitio activo de la enzima mediante la adición de un residuo acetilo. La COX-1 es la encargada de transformar el ácido araquidónico en Tromboxano A2 (TXA2) que induce la secreción de sustancias proagregantes como el difosfato de adenosina (ADP) proveniente de los gránulos densos plaquetarios, al ser inhibida es inhibida la producción de TXA2 y. Dosis bajas de 30-325 mg por día del AAS vía oral producen su efecto antiagregante en la COX-1 (8) (9).

El Clopidogrel bajo dosis oral requiere la oxidación de la isoforma CYP2C19 de la enzima citocromo P450-1a del hígado para generar su metabolito activo el cual bloquea de manera selectiva e irreversiblemente al P2Y1 y P2Y12 que son receptores plaquetarios del difosfato de ADP, de esta manera inhibe la agregación plaquetaria. Con dosis repetidas de 50 a 100 mg, la inhibición de la agregación plaquetaria alcanza su nivel máximo a los 3-7 días, en condiciones fisiológicas en un 40-60% (8) (10).

En la actualidad existen pocos estudios, que permitan realizar un consenso sobre el uso del PRP en individuos tratados con agentes antiplaquetarios, la variabilidad de los hallazgos preliminares aún no compensa lo suficiente para permitir una comprensión profunda del efecto farmacológico de los agentes antiplaquetarios como AAS y Clopidogrel en la secreción de los FCs en el PRP, por lo que son necesarios más investigaciones que permitan contribuir en estos aspectos considerando las propiedades y utilidades de preparados plaquetarios como el PRP (5) (11) (12).

El presente estudio tiene como objetivo medir los niveles de los factores de crecimiento PDGF, VEGF y EGF en el plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas (PPP) de individuos sanos antes y después de 7 días bajo el tratamiento con AAS y Clopidogrel, esto con la finalidad de aportar al conocimiento de sí el uso profiláctico de dichos fármacos pudiera modificar de manera importante los niveles de estos FCs en el PRP.

### **METODOLOGÍA**

Este es un estudio de tipo descriptivo con un diseño experimental de carácter longitudinal (13) que tuvo lugar en la sección de Hematología del Instituto de Investigaciones Clínicas (IIC) "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia (L.U.Z) en el periodo comprendido desde enero de 2017 a octubre de 2019. La población objeto de estudio estuvo conformada por todos los adultos de ambos sexos, aparentemente sanos que acudieron al IIC "Dr. Américo Negrette". La población fue de carácter finita, es decir, menos de cien mil individuos. Para seleccionar a los participantes de la muestra de estudio se utilizó la técnica de muestreo no probabilístico intencional u opinático (13).

Los participantes seleccionados fueron adultos entre 18-50 años de sexo masculino y femenino que desearon participar en el estudio, sin enfermedades clínica de base conocida, aparentemente sanos, en ayunas y con resultados normales en el estudio de agregación plaquetaria antes del tratamiento con el agente antiplaquetario respectivo y que acataron de manera estricta el tratamiento indicado. Fueron excluidos aquellos que habían ingerido previamente agentes antiplaquetarios y/o consumido bebidas alcohólicas 11 días antes del estudio o que estuvieran recibiendo cualquier tipo de tratamiento o medicación.

Para disminuir el sesgo de la muestra la técnica que se utilizó en el muestreo correspondió los 20 primeros participantes (13 del sexo femenino y 7 del sexo masculino) que cumplieron con todos los criterios de selección. Todos los individuos fueron sometidos a un examen clínico y de

laboratorio exhaustivo, con el fin de descartar enfermedades sistémicas. Los participantes se distribuyeron de la siguiente manera: el grupo A (conformado por 20 individuos sin tratamiento con agentes antiplaquetarios, como grupo control), estos mismos conformaron el grupo B, el grupo B se dividió en dos subgrupos: B1 (10 individuos que recibieron una dosis diaria de 100 mg de AAS durante 7 días) y B2 (10 individuos quienes recibieron una dosis diaria de 75 mg de Clopidogrel durante 7 días).

A todos los individuos incluidos en este estudio se les requirió un consentimiento informado por escrito antes de ser incluidos en el estudio y se les identificó a través de números; se contó con la aprobación del Comité de ética del IIC "Dr. Américo Negrette" de la Facultad de Medicina de L.U.Z. Se procedió de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de 1975, actualizada en el 2013 (14), en la 64 Asamblea Médica Mundial General en Fortaleza, Brasil, y las recomendaciones por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS) en el 2002 (15).

A cada participante antes del tratamiento (Grupo A: Control) en ayunas con previa asepsia de la zona se le extrajeron 16 ml de sangre venosa antecubital mediante la punción venosa utilizando mariposas N° 21 empleando la técnica de la doble jeringa para evitar la activación de las plaquetas (16):

- I. Los 2,5 de sangre de la primera jeringa se dispensaron en tubos de vidrio con EDTA para la hematología completa recogiendo los datos concernientes a plaquetas y glóbulos blancos, para lo cual se empleó un contador automatizado de células sanguíneas (Beckman Coulter AC-T, USA); considerándose valores normales para plaquetas entre 150.000 y 450.000 x mm<sup>3</sup> en sangre periférica (17).
- II. Los 13,5 ml de sangre venosa de la segunda jeringa, se distribuyeron en dos tubos:
  - a. 4,5 ml se dispensaron en un tubo plástico que contenía 0,5 ml de anticoagulante citrato de sodio al 3,8% el cual se centrifugo por 10 minutos a 800 rpm

(180G) a temperatura ambiente para obtener PRP; luego el remanente de cada muestra se centrifugo 20 minutos a 4500 rpm (revoluciones por minuto) en una centrifuga refrigerada (Sorvall) para obtener PPP (plasma pobre en plaquetas). Se ajustó la concentración de las plaquetas del PRP a 250.000 x mm<sup>3</sup> con el PPP para realizar la agregación plaquetaria (solo antes del tratamiento con los agentes antiplaquetarios), se procedió según el método turbidimétrico de Born empleando un agregometro Chrono-Log (Corp-Haverton, PA, USA) (18). El resultado obtenido expresado en % permitió descartar anomalías en las funciones plaquetarias que podrían incidir a una disminución estadística de los FCs medidos a causa de un PRP con plaquetas fisiológicamente anormales.

- b. Los 9 ml restantes de sangre se colocaron en otro tubo de plástico que contenía 1 ml de citrato de sodio al 3.8%. Luego de 20 minutos de reposo, la muestra fue centrifugada por 7 minutos a 1400 rpm (267 G), siguiendo la técnica del método de única centrifugación de Anitua et al (19), para la obtención del PRP. Del volumen total del PRP obtenido se extrajeron 0,5 ml que se sometieron a una segunda centrifugación por 10 minutos a 3500 rpm con la finalidad de obtener un verdadero PPP cuya concentración de plaquetas fue determinada mediante recuento automatizado empleando el contador automático de células (Beckman Coulter AC-T, USA), corroborando que el producto plasmático tuviera un conteo de plaquetas inferior a 2.000 plaquetas x mm<sup>3</sup>. Del PRP obtenido de la primera centrifugación se tomó el resto con un pipeteado meticuloso y con una punta distinta, hasta la zona por encima de la fracción roja, representando el PRP; el cual se utilizó para el recuento de plaquetas (para confirmar la obtención de un verdadero PRP) el resto del PRP al igual que el PPP se distribuyeron en alícuotas en

tubos plásticos Eppendorf a -70 °C, en un ultracongelador vertical (Forma Scientific U95-18), lugar donde se conservaron hasta el análisis correspondiente de cada factor de crecimiento.

Posteriormente a cada sujeto se le instruyó consumir la dosis correspondiente al agente antiplaquetario respectivo (el grupo B1: 100 mg de AAS; grupo B2: 75 mg de Clopidogrel) durante 7 días en ayunas. Al cabo de los cuales se realizó la extracción sanguínea de 16 ml de sangre venosa antecubital en ayunas siguiendo el procedimiento mencionado en los puntos 1 y 2 (a y b) mencionados anteriormente. Se hizo un seguimiento de los participantes para confirmar que cumplieran el consumo de los agentes antiplaquetarios indicados y que no presentaran efectos adversos durante el periodo del tratamiento.

Los niveles de PDGF, VEGF y EGF se midieron en las muestras y estándares comerciales empleando el método de ELISA indirecto utilizando un equipo lector de ELISA Multiskan Ex (marca Electron Corporation, USA). Los kits comerciales para la determinación del PDGF (PDGF-BB) y EGF fueron suministrados por ABCAM (ABCAM INC, 1 Kendall Square, Ste B2304 Cambridge MA 02139-1517 USA) con número de lote: GR92691-1 para el PDGF y GR:110762-1 para el EGF. El kit comercial para el VEGF-A fue suministrado por

Thermo Scientific Pierce Biotechnology, 3747 N. Meridian Road, PO Box 117, Rockford IL61105, USA) con número de lote: ME 177706. Todos los ensayos fueron llevados a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (20–22).

Para la tabulación y análisis de los resultados se empleó el software estadístico SPSS versión 17 para Windows. Los datos se muestran en tablas en valores absolutos y porcentuales, así como media aritmética +/- 1 desviación estándar (DS) y rango. Debido al tamaño de la población de estudio que es menor a 30 individuos se utilizó la prueba t de Student para datos pareados con la finalidad de comparar las variables en el estudio. El intervalo de confianza fue de 95% con una significancia de  $p < 0,05$  como la menor probabilidad estadística (23).

### RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los valores estadísticos descriptivos promedio, desviación estándar y rango del recuento plaquetario en el PRP de los individuos sanos antes y después del tratamiento con AAS y Clopidogrel. Se evidenció que los valores del recuento plaquetario no presentaron una disminución estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) tanto para el grupo tratado con AAS como el grupo de Clopidogrel con respecto al grupo control (antes del tratamiento antiplaquetario).

Tabla 1. Recuento plaquetario en el PRP de individuos sanos antes y después del tratamiento con AAS y Clopidogrel

Plaquetas 10 <sup>3</sup> x µL	Promedio + Desviación Estándar (rango)					
	AAS (n=10)			Clopidogrel (n=10)		
	Antes	Después	p	Antes	Después	p
PRP (n=20)	486,5 ± 129,5 (355,0 – 718,0)	449,2 ± 85,51 (340,0 - 577,0)	NS	565,2 ± DS 150,4 (379,0 – 784,0)	592,9 ± DS 203,4 (260,0 – 890,0)	NS

PRP: Plasma rico en plaquetas, AAS: Ácido acetil salicílico, (n=): Número de individuos estudiados, p: significancia, NS: no significativo ( $p > 0,05$ )

En la Tabla 2 se muestra una comparación del promedio de los niveles de los factores de crecimiento PDGF-BB, VEGF-A y EGF en el PRP y PPP de individuos sanos estudiados antes (control) y después del tratamiento con AAS. Los niveles de PDGF-BB presentaron solo una disminución estadísticamente significativa en el PPP ( $p < 0,05$ ), pero no en el PRP ( $p > 0,05$ ). Se

observó una ligera disminución del VEGF en el PPP y un aumento en el PRP, pero, al comparar los valores antes y después del tratamiento no se observaron diferencias estadísticamente significativas para el PPP y PRP ( $p > 0,05$ ). Hubo disminución significativa en los niveles del EGF luego de recibir AAS tanto en el PPP ( $p < 0,05$ ) como en el PRP ( $p < 0,043$ ).

Tabla 2. Niveles de los factores de crecimiento en el PPP y PRP antes y después del tratamiento con AAS.

Factor de Crecimiento	PPP (n=10)			PRP (n=10)		
	Antes	Después	p	Antes	Después	p
PDGF-BB (ng/mL)	1,95 + 0,65* (1,74 - 2,04)	1,71 + 0,22 <sup>a</sup> (1,20 - 1,97)	< 0,05	1,98 + 0,22 (1,50 - 2,32)	1,97 + 0,35 (1,72 - 2,77)	NS
VEGF-A(pg/ mL)	681,393 + 133,8 (596,9 - 994,9)	549,56 + 237,1 (360,2 - 1111,5)	NS	800,972 + 192,29 (506,0 - 1005,1)	916,57 + 383,9 (507,7 - 1728,4)	NS
EGF(pg/mL)	188,740 ± 21,81 (157,7 - 226,5)	150,980 ± 22,84 <sup>b</sup> (122,8 - 194,5)	< 0,05	181,980 ± 21,0 (155,4 - 212,9)	158,060 ± 16,13 <sup>c</sup> (127,8 - 179,0)	< 0,043

PDGF-BB: Factor de crecimiento derivado de Plaquetas BB, VEGF-A: Factor de crecimiento endotelial vascular A, EGF: Factor de crecimiento epidérmico, PPP: Plasma pobre en plaquetas, PRP: Plasma rico en plaquetas, (n=): Número de individuos estudiados, p: Significancia, NS: No significativo (p <0,05) \*Promedio + Desviación Estándar (rango), <sup>a</sup>: Diferente con respecto a su control (Antes) p <0,05, <sup>b</sup>: Diferente con respecto a su control (Antes) (p <0,05), <sup>c</sup>: Diferente con respecto a su control (Antes) (p <0,043)

La Tabla 3 muestra una comparación del promedio de los niveles de los factores de crecimiento PDGF-BB, VEGF-A, EGF en el PPP y PRP de los individuos sanos antes y después del tratamiento con Clopidogrel. Se observó una marcada y significativa disminución en los niveles del PDGF-BB después del tratamiento

con Clopidogrel tanto para el PPP (p <0,009) y en el PRP (<0,001). El VEGF-A presentó niveles significativamente bajos en el PPP (p <0,001) y PRP (p < 0,01) con respecto a su control, de igual manera en el EGF cuyos niveles disminuyeron significativamente en el PPP (p <0,04) y el PRP (p <0,018).

Tabla 3. Niveles de los factores de crecimiento en el PPP y PRP antes y después del tratamiento con Clopidogrel.

Factor de Crecimiento	PPP (n=10)			PRP (n=10)		
	Antes	Después	p	Antes	Después	p
PDGF-BB (ng/mL)	2,02 + 0,21* (1,83 - 2,57)	1,81+0,16 <sup>a</sup> (1,69-1,93)	< 0,009	2,28 + 160,87 (1,94 - 2,82)	1,88 + 0,52 <sup>b</sup> (1,79 - 1,91)	<0,0001
VEGF-A(pg/ mL)	692,313 + 78,28 (590,0 - 841,5)	448,708 + 130,7 <sup>c</sup> (349,91- 665, 52)	< 0,001	856,942 + 160,87 (686,1 -1190,4)	650,76 + 107,29 <sup>d</sup> (452,8- 799,3)	< 0,01
EGF(pg/mL)	234,970 ± 80,73 (139,6 - 372,7)	147,800 ±24,24 <sup>e</sup> (128,0 - 210,2)	< 0,04	214,520 ±69,608 (142,8 - 359,6)	148,540 ±12,322 <sup>f</sup> (134,1 - 172,4)	< 0,018

PDGFBB: Factor de crecimiento derivado de Plaquetas BB, VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular A, EGF: Factor de crecimiento epidérmico, PPP: Plasma pobre en plaquetas, PRP: Plasma rico en plaquetas, (n=): Número de individuos estudiados, p: Significancia, NS: No significativo (p <0,05), \*Promedio + Desviación Estándar (rango), <sup>a</sup>: Diferente respecto a su control (Antes) (p <0,009), <sup>b</sup>: Diferente respecto a su control (Antes) (p <0,0001), <sup>c</sup>: Diferente respecto a su control (p <0,001), <sup>d</sup>: Diferente respecto a su control (0,01), <sup>e</sup>: Diferente respecto a su control (Antes) (p <0,04), <sup>f</sup>: Diferente respecto a su control (Antes) (p <0,018).

## DISCUSIÓN

El concepto y descripción del PRP inició en el campo de la hematología donde fue utilizado inicialmente en el tratamiento de la trombocitopenia, posteriormente su uso y estudio en otros campos permitió descubrir sus propiedades promotoras de la regeneración tisular del PRP en la cual los FCs de crecimiento tienen un papel importante (1-3). Debido a la falta de consenso respecto a la administración del PRP en individuos que consumen agentes antiplaquetarios, los cuales podrían influir en los FCs contenidos en los gránulos  $\alpha$  plaquetarios, es necesario evaluar los efectos inducidos por agentes antiplaquetarios como AAS y Clopidogrel sobre los FCs plaquetarios más estudiados como

el PDGF, VEGF, y EGF (2) (4) (5).

Los resultados de los participantes antes del consumo de los agentes antiplaquetarios reportaron un recuento promedio plaquetario en sangre periférica de  $258,6 + 54,46 \times 10^3 \times \mu\text{L}$  que se encontró dentro de los rangos de referencia (17). El conteo plaquetario en el PRP antes del tratamiento representó un incremento de 1,88 a 1,98 cuando se comparó con el recuento en sangre periférica, esto concuerda con las cifras plaquetarias esperadas en el PRP del protocolo de Anitua et al (19), y la definición emitida en la literatura científica (1) (24).

Resultados similares con respecto al conteo plaquetario del PRP fueron presentados en un estudio publicado en la revista "Archivo

Venezolano de Farmacología y Terapéutica” (5), en el 2016 donde se hizo el recuento plaquetario en el PRP a los 32 sujetos sanos que participaron en esa investigación, el método de obtención fue igualmente a través del protocolo de centrifugación única de Anitua. En el 2017, Fitzpatrick et al (25), reportaron cifras plaquetarias similares en el PRP de sujetos sanos obtenido mediante el kit comercial ACP, los cuales compararon las cifras plaquetarias en el PRP obtenido por varios kits comerciales de separación celular, otros kits reportaron recuentos superiores lo cual podría deberse a un mayor tiempo de centrifugación.

Después de 7 días del tratamiento con AAS y Clopidogrel, no se observó una disminución estadísticamente significativa en el recuento plaquetario al compararlo con el del PRP antes del tratamiento (basal) (Tabla 1). Estos datos indican que las dosis suministradas de AAS y Clopidogrel no afectaron significativamente el número de plaquetas en el PRP de los individuos sanos. Este hallazgo coincide con el publicado por González et al (5), los cuales no observaron una disminución significativa en el recuento plaquetario del PRP de 32 sujetos sanos 24 horas después de ingerir una dosis única de AAS y Clopidogrel. Asumieron que el efecto de los agentes antiplaquetarios en una dosis única no parecía afectar el recuento plaquetario lo que podía deberse a que el recambio plaquetario es entre 7 a 10 días.

A diferencia de González et al (5), en el presente estudio se determinó el recuento plaquetario bajo un tratamiento de 7 días (periodo aproximado de la vida plaquetaria), la no significancia estadística observada podría atribuirse principalmente a que el principal efecto de los agentes antiplaquetarios es sobre la función plaquetaria, no el número de plaquetas. En cuanto al aumento o disminución no significativa observada en el conteo plaquetario después del tratamiento con los agentes antiplaquetarios en el PRP postratamiento en comparación al PRP basal de ambos grupos, y entre ellos, esto puede deberse a variaciones fisiológicas del número de las plaquetas entre los individuos sanos evaluados en este estudio. Cada

individuo tiene una tasa de producción celular y síntesis de FCs de acuerdo a las necesidades y estado de su organismo con la finalidad de una respuesta biológica apropiada en condiciones fisiológicas (1) (5) (17), es importante acotar que los individuos de este trabajo fueron sometidos a la misma evaluación clínica para confirmar su estado de salud.

Al comparar los niveles de los FCs en el PRP y PPP antes y después de 7 días del tratamiento con AAS se observó una disminución del PDGF-BB y EGF después del tratamiento. El EGF reveló niveles significativamente bajos en ambos subproductos plaquetarios (PRP y PPP) mientras que el PDGF-BB solo en el PPP, por lo que el AAS pareció influir en la secreción de estos factores, en especial en el EGF. En cambio, el VEGF-A no reveló una disminución significativa en el PPP ni PRP.

González et al (5) que incluyeron la determinación de los niveles de los FCs en el PRP en sujetos sanos (entre 18-50 años) antes y después del consumo de una dosis única con AAS y Clopidogrel, después de 24 horas de haber ingerido el AAS reportaron solo una disminución del PDGF-BB en el PPP, pero no en el PRP. En cambio, los niveles del EGF y VEGF-A presentaron aumentos no significativos, lo cual podría deberse a fluctuaciones fisiológicas o un menor efecto del mecanismo propio del fármaco bajo dosis única ya que a diferencia del estudio aquí realizado donde se evaluó el efecto del AAS después de 7 días sí se observó una disminución significativa en los niveles del EGF, más no del VEGF-A lo cual es un resultado coincidente con González et al (5) respecto a este factor.

En el 2018, Tian et al (12), midieron los efectos de ciertos factores como la edad, diabetes mellitus y el consumo de agentes antiplaquetarios sobre los FCs en el PRP activado con trombina y gluconato de calcio, con respecto al grupo formado por 10 pacientes (>45 años) con enfermedades cardiacas que consumieron AAS y/o Clopidogrel durante más de 3 meses se observó una disminución del PDGF-AB, EGF y VEGF-A en comparación al grupo control (pacientes sanos, menores de 45 años, sin medicación), la cual solo presentó diferencias

significativa para el PDGF-AB entre ambos grupos.

En contraste, Anitua et al (26), no encontró diferencias significativas en los niveles del PDGF-AB y VEGF en el PRP activado con cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) de 3 pacientes (entre 55-85 años) que consumieron AAS durante al menos un año en comparación a pacientes sanos sin medicación. Es importante resaltar que Anitua et al (26) y Tian et al (12) utilizaron activadores plaquetarios en el PRP que pudieron influir en el proceso de secreción de los FCs en los individuos tratados con AAS. La Trombina y  $\text{CaCl}_2$  podrían activar mecanismos alternos a la activación plaquetaria los cuales no dependen del  $\text{TXA}_2$  proveniente de la COX-1 plaquetaria. Con respecto a la trombina, esta activación podría ser mediada por receptores como el PAR-1 acoplado a proteína G que mediante la fosforilación de proteínas intracelulares participarían en la activación de manera alterna (6) (27). En años recientes se ha postulado que el calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en elevadas concentraciones extracelulares podría infiltrarse intracelularmente y activar una serie de eventos celulares que en conjunto con el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular podrían influir en la activación y secreción de los gránulos plaquetarios (6) (26) (28).

Esto podría explicar la razón por la cual la secreción de los FCs en el PRP activado con Trombina y/o  $\text{CaCl}_2$  no se vio afectada en su totalidad en los individuos que consumieron AAS (27,28), a diferencia de la presente investigación donde no se utilizó ninguna sustancia activadora en el PRP. Debe considerarse que otras células como los monocitos y macrófagos son fuentes no plaquetarias de  $\text{TXA}_2$  que pudieran influir también en el proceso de activación (6) (26-28). En relación a la liberación del VEGF-A, cuyo comportamiento reportado por los autores anteriormente mencionados, (5) (12) (26) no presentó disminución significativa, parece confirmar que el AAS podría no incidir en el proceso de secreción del VEGF-A, sin embargo, factores como el protocolo de centrifugación, cinética de la liberación del FCs, y la presencia de células secretoras de este FCs en el PRP como los leucocitos podrían influir en su patrón de

secreción. (1) (5) (29).

Es importante destacar que existen pocos estudios donde se evaluó el efecto de agentes antiplaquetarios como el AAS en los niveles del EGF, aspecto que dificulta contrastar los hallazgos de este estudio el cual mostró una tendencia diferente para investigadores como González et al (5) y Tian et al (12). Se requieren estudios más profundos que permitan comprender la interacción del consumo de AAS, así como los mecanismos celulares de señalización implicados en la secreción de los FC plaquetarios.

En el grupo tratado con Clopidogrel, los niveles de los tres FCs presentaron una disminución significativa tanto en el PPP como el PRP con respecto a los valores obtenidos previo al consumo de dicho fármaco. Al comparar los hallazgos obtenidos con los resultados del grupo tratado con AAS (Tabla 2) se nota un marcado y significativo descenso de los FCs en ambos subproductos plaquetarios (PPP y PRP) por lo que el Clopidogrel parece haber tenido un mayor nivel de afectación en los niveles de los FCs que el AAS.

Con respecto al PDGF-BB los hallazgos concuerdan por los reportados por González et al (5) donde los individuos sanos que consumieron una dosis única de Clopidogrel, al medir sus niveles 24 horas después presentaron una disminución significativa del PDGF-BB en el PPP y PRP con respecto a los valores pretratamiento. Sin embargo, no se encontraron alteraciones significativas en los niveles de VEGF y EGF postratamiento. Por otro lado, una publicación en la revista "Journal of Dentist" (11), reportó una disminución del PDGF-BB y VEGF en el PRP y PPP de individuos sanos posterior a 24 horas del tratamiento con una dosis única de Clopidogrel, estos atribuyeron dicho fenómeno al mecanismo farmacológico que podría haber incidido en el patrón de secreción.

Smith et al (30) midieron el PDGF-BB y TGF- $\beta$  en el PRP activado con trombina calcificada en pacientes que consumieron AAS y Clopidogrel en un periodo menor de 5 días previo a un procedimiento operatorio cardiovascular, los participantes no reportaron una disminución



del PDGF-BB en comparación con el grupo de pacientes sin medicación antiplaquetaria conocida pero sí una ligera disminución no significativa del TGF-  $\beta$ . Resultados diferentes a los publicados por Tian et al (12) que sí revelaron una disminución en el PDGF-AB, VEGF, y EGF la cual solo fue significativa en el PDGF-AB en el PRP de participantes que consumieron AAS y/o Clopidogrel por más de 3 meses, su disminución podría deberse a la terapia combinada que pudo generar una interacción de ambos fármacos aunado al tiempo más prolongado.

El Clopidogrel bloquea los receptores P2Y1 y P2Y12 para el ADP que actúan de modo sinérgico en la activación plaquetaria, el P2Y1 en la activación inicial irreversible y el P2Y12 en la activación prolongada a través de una serie de mecanismos de señalización conjunto con otros ligandos influyen en la secreción de  $Ca^{+2}$  intracelular al medio exterior y la liberación de los gránulos plaquetarios (6,7). Además, este fármaco interfiere con los receptores del fibrinógeno (complejo glicoproteico GIIbIIIa) el cual se encuentra en un 30% de la membrana externa de los gránulos  $\alpha$  (26), estos receptores moleculares se orientan al lado externo durante el proceso de activación, por lo que el Clopidogrel podría amplificar su inhibición a otras vías de la agregación plaquetaria que pudieran alterar la secreción de los FCs.

### CONCLUSIONES

Este estudio mostró una marcada disminución de los FCs en el PRP de los individuos tratados con Clopidogrel, se reveló un menor grado de afectación después del tratamiento con AAS. No se debe caer en el falso entendimiento de que los agentes antiplaquetarios puedan afectar las propiedades del PRP, sin embargo, es necesario evaluar la respuesta de la terapia del PRP en los individuos que consuman dichos fármacos. Se debe tomar en cuenta que la falta de estandarización entre los diferentes kits comerciales para la medición de los FCs, déficit en material referencial sobre la preparación del PRP y guías procedimentales validadas a nivel internacional o por organizaciones médicas oficiales, hacen difícil la comparación de estos

resultados con los reportados en la literatura científica. Es importante resaltar que no existen valores referenciales ni rangos terapéuticos de los factores de crecimiento, la información de los mecanismos de señalización celular implicados en la liberación de los FCs o sí los agentes antiplaquetarios podrían intervenir e incidir fases específicas en estas rutas no han sido descritas en su totalidad.

Son necesarios estudios futuros con mayor un número de individuos y un diseño que permita contribuir a la comprensión de los mecanismos de señalización implicados en las propiedades regenerativas del PRP y sí fármacos como AAS y Clopidogrel podrían influir en los mismos. Así como más ensayos clínicos controlados aleatorizados que permitan validar las indicaciones clínicas de los FCs conduciendo así al establecimiento de rangos terapéuticos y de referencia de acuerdo a cada campo de aplicación, todo esto con la finalidad de optimizar la terapéutica mediante el PRP para garantizar una mejoría comprobada en la condición médica en la cual sea aplicado.

Este estudio fue financiado por el FONACIT (Fondo Nacional para la Ciencia y Tecnología) quien suministró los materiales y kits necesarios para su realización. Se contó con la colaboración del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia (LUZ) en cuyos laboratorios se llevó a cabo el análisis de las muestras recolectadas. Agradecimiento especial al Dr. Jesús Quintero por sus aportes en el análisis estadístico de los resultados.

### REFERENCIAS

1. Rodríguez Flores J., Palomar Gallego MA., Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac.* 201;34(1):8-17.
2. Jayaram P., Yeh P., Patel SJ., Cela R., Shybut TB., Grol MW., et al. Effects of Aspirin on Growth Factor Release from Freshly Isolated Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma in Healthy Men: A Prospective

- Fixed-Sequence Controlled Laboratory Study. *Am J Sports Med.* 2019;47(5):1223-9. doi: 10.1177/0363546519827294.
3. Alves R., Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord.* 2018;4(1):18-24. DOI: 10.1159/000477353
  4. Ocampo BRY., González MGM. Tratamiento de periodontitis agresiva localizada con plasma rico en plaquetas y aloinjerto óseo. Un caso clínico. *Rev Odontológica Mex].* 2015;19(2):106-114. DOI: 10.1016/j.rodex.2015.05.006
  5. González M., Arteaga-Vizcaíno M., Ruiz A., Estevez J., Quintero J., Quintero M., et al. Factores de crecimiento en el plasma rico en plaquetas (PRP) de sujetos tratados con antiagregantes plaquetarios. *Arch Venez Farmacol Ter.* 2016;35(4):114-21.
  6. Frey C., Yeh PC., Jayaram P. Effects of Antiplatelet and Nonsteroidal Anti-inflammatory Medications on Platelet-Rich Plasma: A Systematic Review. *Orthop J Sports Med.* 2020;8(4):2325967120912841. DOI: 10.1177/2325967120912841
  7. López Farré A., Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol.* 2013; 13:2-7. DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70073-6
  8. González M., Vizcaíno MA., Ruiz A., Briceño O., Quintero M., Estévez J., et al. Niveles de EGF y VEGF en el plasma rico en plaquetas antes y después de antiagregantes plaquetarios. *Revista Colombiana de Hematología y Oncología.* 2016;3(2):24-31. DOI: <https://doi.org/10.51643/RevColHemOnc>
  9. Brunton LL., Chabner BA., Knollmann BC. Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica. Decimotercera edición. Ciudad de México, México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 2019.
  10. Katzung BG., Masters SB., Trevor AJ. Farmacología básica y clínica. 12a. edición. México D.F.: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 2013.
  11. González M., Arteaga-Vizcaíno M., Ruiz A., Briceño O., Quintero M., Atencio R., et al. PDGF and VEGF Levels in Platelet-Rich Plasma. *J Dent.* 2013; 1:16-23. DOI:10.12974/2311-8695.2013.01.01.3
  12. Tian J., Lei XX., Xuan L., Tang JB., Cheng B. The effects of aging, diabetes mellitus, and antiplatelet drugs on growth factors and anti-aging proteins in platelet-rich plasma. *Platelets.* 2019; 30(6):773-92. DOI: 10.1080/09537104.2018.1514110
  13. Arias-Odón F. El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica. 6a EDICIÓN. 2012. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme
  14. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191-4. DOI: 10.1001/jama.2013.281053
  15. Guidelines for preparing core clinical-safety information on drugs: report of CIOMS Working Group III. Geneva: CIOMS; 1995. 69 p.
  16. Symansky MR., Fox HA. Umbilical vessel catheterization: indications, management, and evaluation of the technique. *J Pediatr.* 1972;80(5):820-6.
  17. Ware JA, Collier BS. Platelet morphology, biochemistry, and function. In Williams Hematology. 5ta edición, p. 1116-1201. New York: Mc Graw Hill. 1995
  18. Born GV., Cross MJ. The Aggregation of Blood Platelets. *J Physiol.* 1963; 168:178-95.
  19. Anitua Aldecoa E. La utilización de los factores de crecimiento plasmáticos en cirugía oral, maxilofacial y periodoncia [P.R.G.F.]. *RCOE Rev Ilustre Cons Gen Col Odontól Estomatól Esp.* 2001;305-315.
  20. Human PDGF AA ELISA Kit (ab100622) | Abcam [Internet]. Disponible en: <https://www.abcam.com/human-pdgf-aa-elisa-kit-ab100622.html>
  21. Human EGF ELISA Kit (ab217772) |

- Abcam [Internet]. Disponible en: <https://www.abcam.com/human-egf-elisa-kit-ab217772.html>
22. VEGF-A Human ELISA Kit - Invitrogen [Internet].. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/elisa/product/VEGF-A-Human-ELISA-Kit/BMS277-2>
  23. Levin RI., Rubin D. Estadística para Administración y Economía. 7ma edición. México: Pearson Education. 2010.
  24. Castro-Piedra SE., Arias-Varela KA. Actualización en plasma rico en plaquetas. Acta Médica Costarric. 2019;61(4):142-151.
  25. Fitzpatrick J., Bulsara MK., McCrory PR., Richardson MD., Zheng MH. Analysis of Platelet-Rich Plasma Extraction: Variations in Platelet and Blood Components Between 4 Common Commercial Kits. *Orthop Journal Sports Med.* 2017;5(1):2325967116675272. DOI: 10.1177/2325967116675272
  26. Anitua E., Troya M., Zalduendo MM., Orive G. The effect of different drugs on the preparation and biological outcomes of plasma rich in growth factors. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges.* 2014;196(6):423-9.
  27. Hematología SA de. Hematología: Volumen 21 - Número Educacional - Fisiología de la Hemostasia Normal. Sociedad Argentina de Hematología; 2017. 107 p.
  28. Badimon L., Vilahur G. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetarios. *Rev Esp Cardiol.* 2013; 13:8-15. DOI: 10.1016/S1131-3587(13)70074-8
  29. Toyoda T., Isobe K., Tsujino T., Koyata Y., Ohyagi F., Watanabe T., et al. Direct activation of platelets by addition of CaCl<sub>2</sub> leads coagulation of platelet-rich plasma. *International Journal Implant Dent.* 2018;4(1):23.
  30. Smith CW., Binford RS., Holt DW., Webb DP. Quality assessment of platelet rich plasma during anti-platelet therapy. *Perfusion.* 2007;22(1):41-50. DOI: 10.1177/0267659107077950