

Plasma Rico em Plaquetas PRP - Lisado Plaquetário ??!

Qual a realidade??

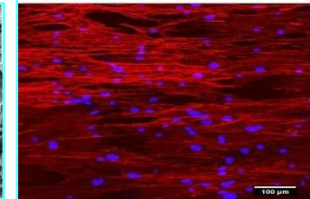
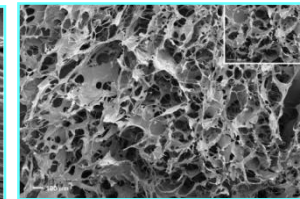
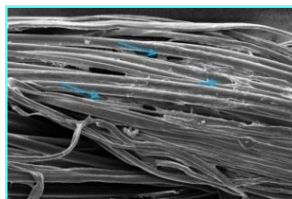
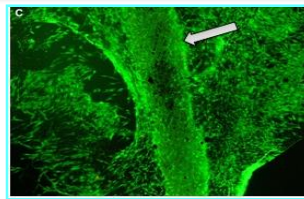
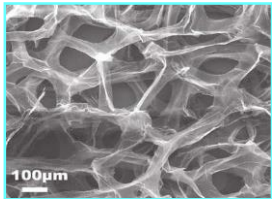
Abordagem de uma Universidade Pública



Ângela Cristina Malheiros Luzo
MD PhD

Grupo Interdisciplinar de Medicina Regenerativa da UNICAMP

GRUPO INTERDISCIPLINAR DE MEDICINA REGENERATIVA DA UNICAMP



- Hemocentro
- Instituto de Biologia
- Engenharia Mecânica
- Gastrocirurgia (Tx Fígado, Coloproctologia)

- Otorrinolaringologia
- Engenharia Química
- Oftalmologia
- Institutos de Química e de Física

- CTI Renato Archer
- CEMIB
- Endocrinologia
- Reumatologia
- Cirurgia Plástica

- Ortopedia
- Neurocirurgia
- Cirurgia Pediátrica
- Anatomia Patológica
- Urologia

PRP: Conceitos e aplicações

Definição

PRP ou Lisado Plaquetário

produto hemoterápico

concentrado de plaquetas

*[] 2 a 3 x maior que o normal
pequena quantidade de plasma*

PRP: Conceitos e aplicações

O quê faz?

- Libera fatores estimulantes de crescimento, quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão...

Utilização???

- Regeneração tissular?
 - ↓ Apoptose celular
 - ↑ Viabilidade celular
- Neo angiogenese?
- Imunomodulação?
- Estimula diferenciação para osso, cartilagem?

PRP → Conceitos e Aplicações

Lisado Plaquetário → PRP

Meinrad Gawaz and Sebastian Vogel, BLOOD, 10 October 2013

Reparação tissular

HGF-SDF1
fibroblastos neutrófilos
Macrófagos
eliminação debrí celular
SMC, MSCs

Angiogenesis

CXCR4 (*homing*)
CD34+ *recruta*

Apoptosis

TNF Alfa ?
Faz-L, Cd40L,

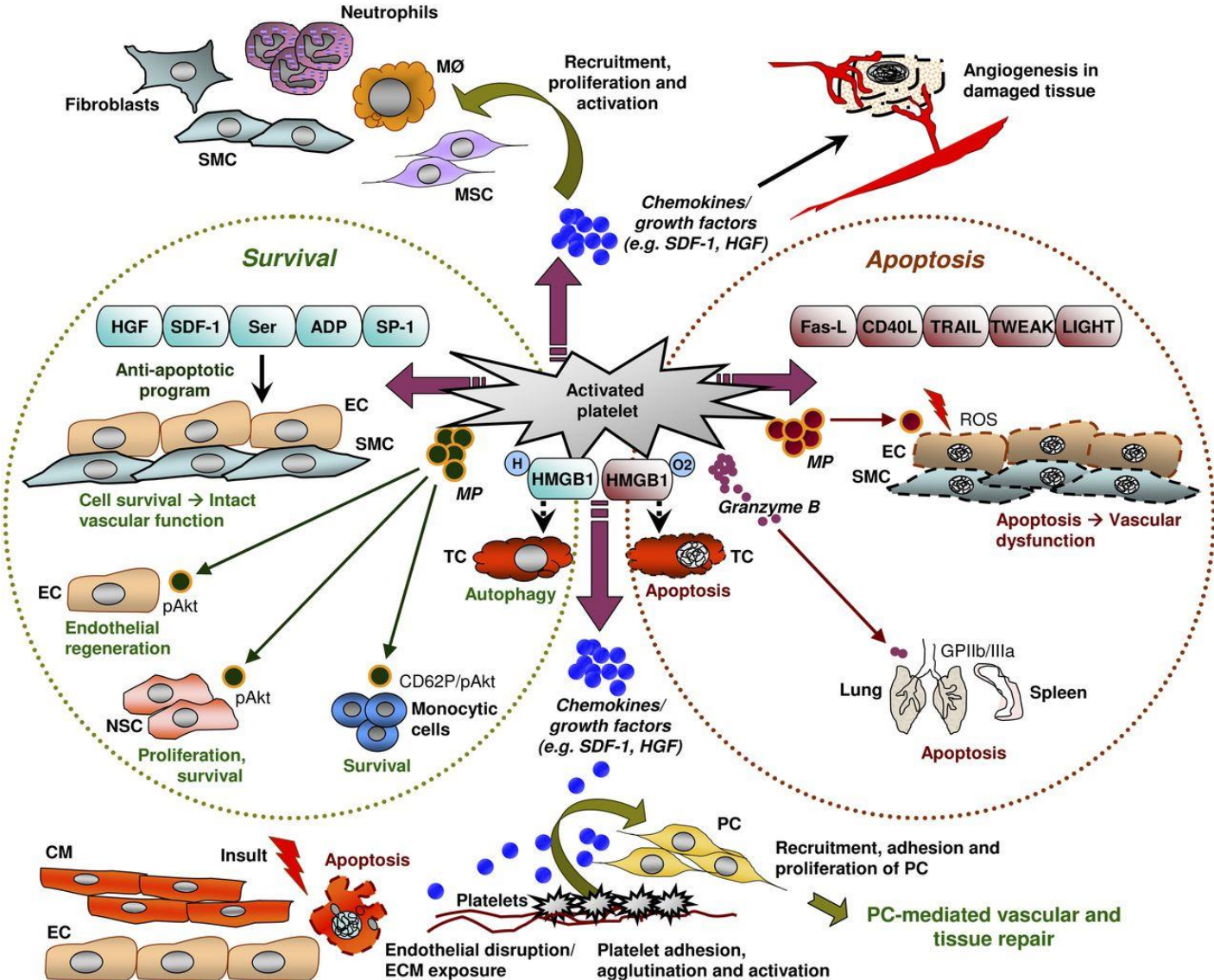
Trail Tweak Light (*secretados*)

Sinalização parácrina
Células tronco neurais
fosforilação da via Akt

Secreção de HMGB1

(High Mobility Group Box1)

Ativa resposta imune
Regula apoptose celular



PRP: Conceitos e aplicações

Utilização na prática clínica?

(Primeira citação → 1987 → cirurgia cardíaca

“Ferra ri M, Zia S, Valbonesi M, A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. Int J Artif Organs 1987, 10:47-50”

CFM....

ANVISA....

PRP: Conceitos e aplicações

Resoluções CFM e ANVISA

CFM → Parecer nº. 20/2011 do datado de 12 de julho de 2011 *O uso do PRP em procedimentos **não** hemoterápicos é considerado experimental, sem nível de evidência, sem comprovação da real utilidade e ou uso definitivo.*

Anvisa → A produção e uso do PRP no âmbito da Hemoterapia, (RDC da Anvisa nº 57/2010, Portaria Ministerial nº 1353/2011.

I Fórum de Hematologia e Hemoterapia do Conselho Federal de Medicina (CFM)

9 de abril, 2013 em SP, 93 participantes, *especialistas, pesquisadores e gestores...*

CFM → Resolução nº 2.128, de 2015, ratificando o entendimento contido no Parecer CFM nº 20, de 2011.

CFM e ANVISA mantiveram pareceres anteriores e deliberaram:

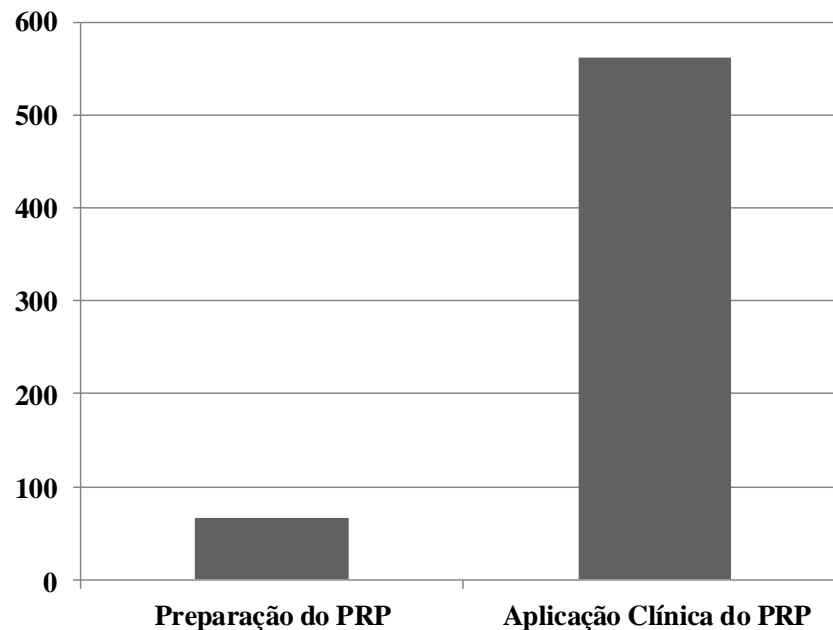
“O PRP é uma prática experimental e não pode ser cobrado do paciente”

artigo 22 do código: “ **É vedado** ao médico **deixar de obter consentimento do paciente ou de seu representante legal** após esclarecê-lo sobre o procedimento a ser realizado, salvo em caso de risco iminente de morte.”

PRP: Conceitos e aplicações

Número de estudos

Preparação do PRP x Aplicação clínica



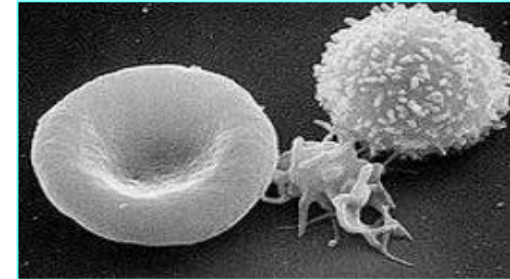
Diferentes métodos de preparação - dificuldade de comparação, controle e reprodutibilidade dos resultados clínicos

PRP – Conceito e aplicações

Plaquetas



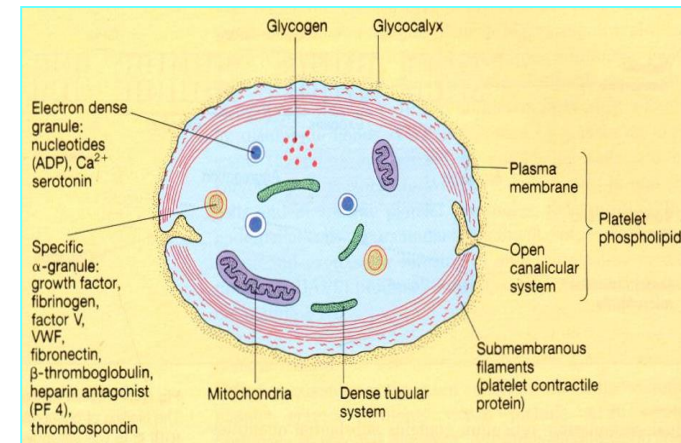
Fragmentos celulares *(anucleada mitocôndria, miofibrilas)*



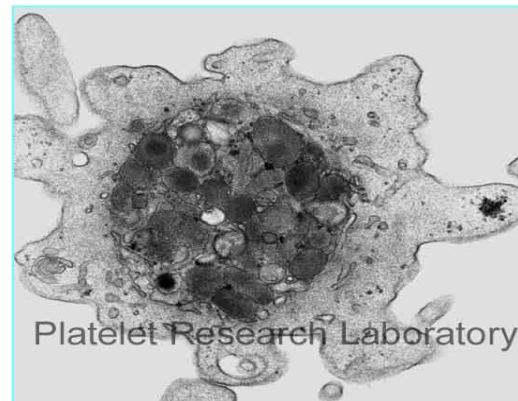
www.reserachgate.net

Alfa grânulos-Fatores Liberados

- Insulin growth factor (*osteogenesis*)
- PDGF (*angiogenesis, proliferação celular, produção de colágeno*)
- VEGF (*angiogenesis*)
- HGF (*viabilidade, proliferação celular, regeneração*)
- TGF- β (*regeneração, neogenesis e proliferação de células epiteliais e vasculares*)
- EGF (*regeneração, neogenesis e proliferação de células epiteliais e vasculares*)
- FGF (*regeneração tissular proliferação celular, produção de colágeno e ácido hialurônico*)
- TNF alfa (*pró-inflamatória, osteogenesis*)
- Interleucinas: 4, 8, 13, 17 (*pró-inflamatórias*)
- Interferon alfa



www.bloodjournal.org



Platelet Research Laboratory

www.platelet-research.org

PRP: Conceitos e aplicações

PRP
↓

Normatização do processo!?

Como estudar as variáveis?

- Há interferência das fibras da rede de fibrina??

- Como tornar mais lenta a liberação dos fatores??

PRP- Preparo

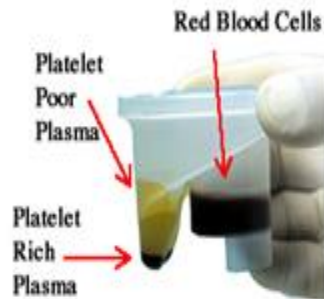
Centrífugas



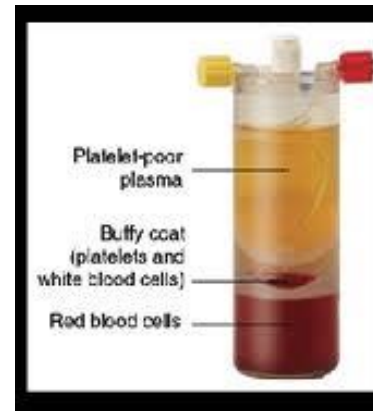
www.biosafe.com



www.emcite.com



www.revolutionhealth.org



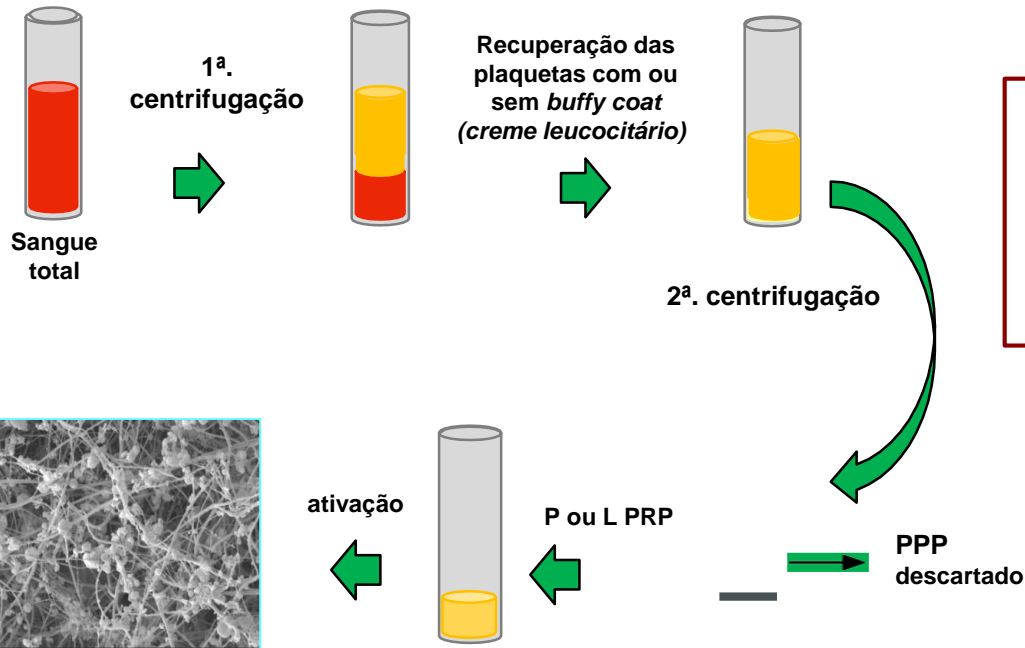
www.badbacks.com.au
device (GPS III, Biomet, Warsaw, IN)

“Bloody” treatment holds promise
September 13, 2013, Michel Hall

“Clinically, however, minimal evidence exists to support this theory and more research must be performed.”

PRP- Preparo

Centrifugação - Cuidados



Temperatura ambiente, sem freio
1 ou 2 centrifugações
↓
Pellet → necessidade de homogeneização
G > 800G: compromete integridade das plaquetas

Ativação rede de fibrina

PRP -Unicamp

Projetos desenvolvidos com PRP

Caracterização básica do PRP/Lisado plaquetário

- Prediction and Modulation of Platelet Recovery by Discontinuous Centrifugation of Whole Blood for the Preparation of Pure Platelet-Rich Plasma. Perez A et al. BioResearch Open Access, August, 2013
- Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma Perez A et al., ISRN Hematol. 2014
- Fibrin network architectures in pure platelet-rich plasma as characterized by fiber radius and correlated with clotting time. Peres A et al, J Mater Sci: Mater Med 2014.
- Performance of PRP Associated with Porous Chitosan as a Composite Scaffold for Regenerative Medicine. Shimojo A, et al. Scientific World Journal, 2015,
- In Vitro Performance of Injectable Chitosan-Tripolyphosphate Scaffolds Combined with Platelet-Rich Plasma. Shimojo A et al, Tissue Eng Regen Med 2016;13(1):21-30.

PRP -Unicamp

Projetos desenvolvidos com PRP

Caracterização básica do PRP/Lisado plaquetário

- Anticoagulant effects on Pure Platelet-Rich Plasma. The Journal of the Mississippi Academy of Sciences · April 2017
- Distribution, recovery and concentration of platelets and leukocytes in L-PRP prepared by centrifugation. Melo B et al, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017.
- Assessment of the Impact of the Architectures of Fibrin Scaffolds on the Quality of Pure Platelet-Rich Plasma. Perez A et al. Submetido ao Journal of Material Science: Materials in Medicine
- Impact of Hyaluronic Acid Microparticles on the Quality of a Cell-Seeded Fibrin Scaffold derived from Pure Platelet-Rich Plasma. Perez A et al.
- Platelet-Rich Plasma and hyaluronic acid association: The importance of the gel matrix structure. Shimoji A et al.

Terapia Celular → Medicina Regenerativa

Lisado Plaquetário → PRP

Meinrad Gawaz and Sebastian Vogel, BLOOD, 10 october 2013

Reparação tissular

HGF-SDF1
 fibroblastos neutrófilos
 Macrófagos
 eliminação de debris celular
 SMC, MSCs

Angiogenesis

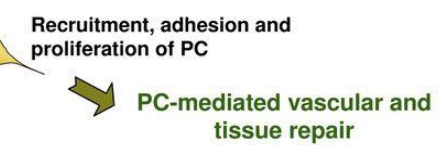
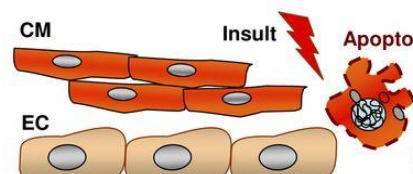
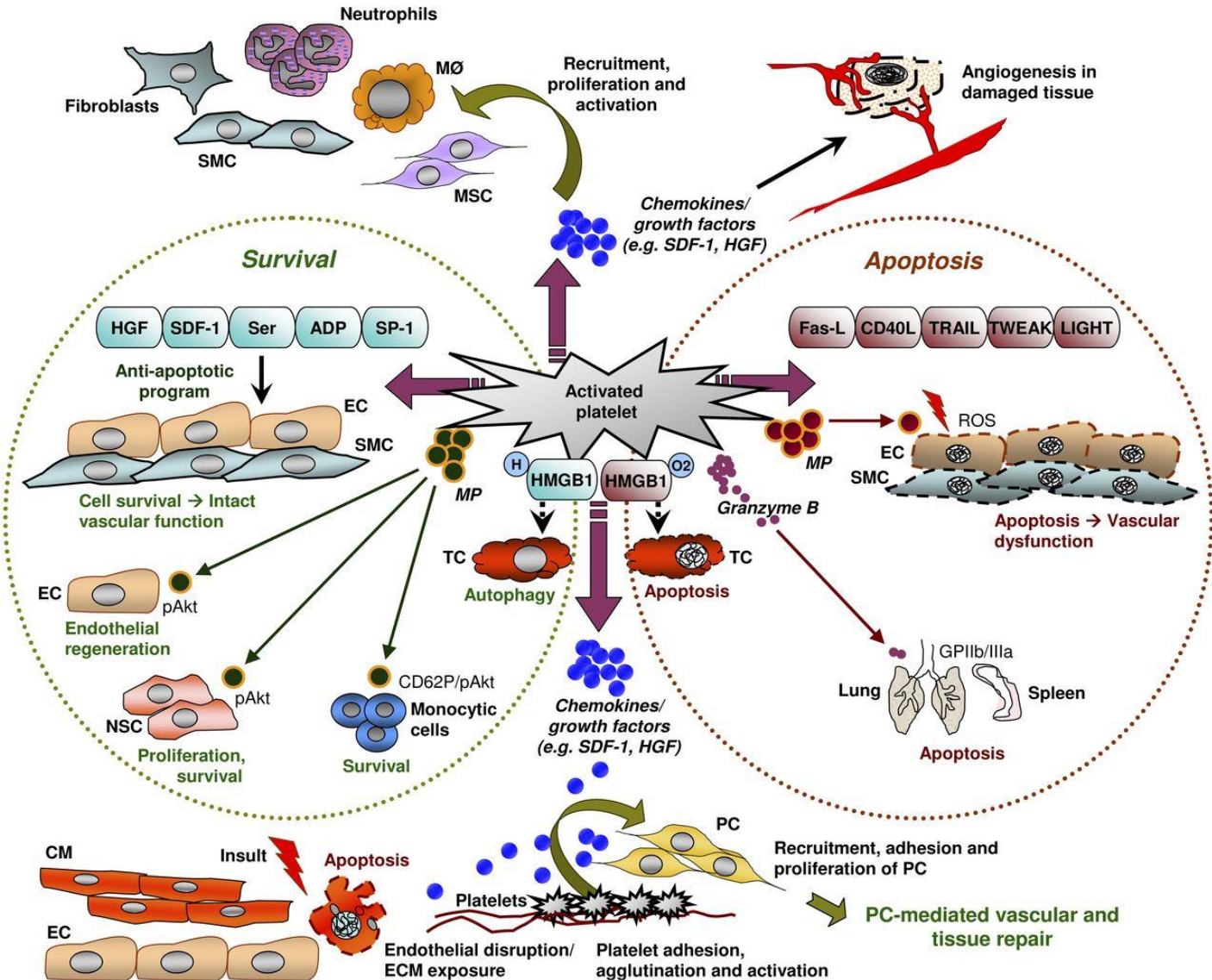
CXCR4 (*homing*)
 CD34+ *recruta*

Apoptosis

TNF Alfa ?
 Faz-L, Cd40L,
 Trail Tweak Light (*secretados*)
 Sinalização parácrina
 Células tronco neurais
 fosforilação da via Akt

Secreção de HMGB1

(High Mobility Group Box1)
 Ativa resposta imune
 Regula apoptose celular



PRP -Unicamp

Projetos desenvolvidos com PRP

Projetos pré-clínicos

Ação imunomoduladora

- Effects of Intravesical Therapy with Platelet-Rich Plasma (PRP) and Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. Paro L *et al*, Tissue and Cell, 2018.

“o PRP xeno, não causou efeito adverso, imunomodulando os animais através do aumento da produção de interferon o IFN que exerce ação antitumoral por indução de TRAIL, potente indutor de morte celular tumoral, sendo que o IFN γ é responsável pela estimulação de vias antiproliferativas e antitumorais em macrófagos e células tumorais. A associação com BCG desencadeou melhor resposta de inibição do crescimento tumoral, quando comparada com a terapêutica de BCG e PRP isolados.”

Regeneração neuronal

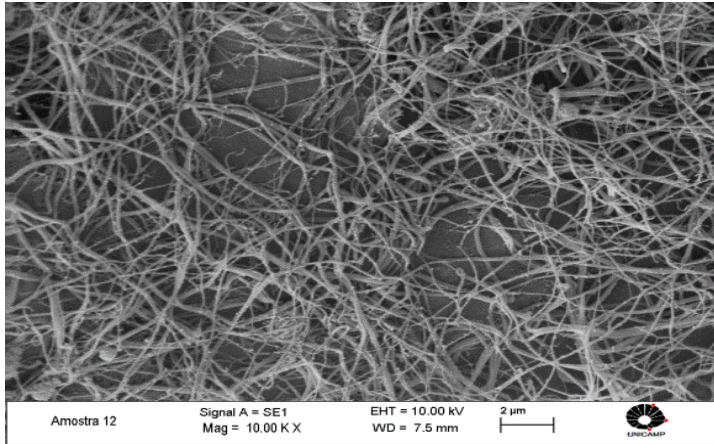
- Recovery of sensory-motor integration after dorsal rhizotomy and repair with platelet-rich plasma (PRP). Neuroscience 2017.

“Rizotomia dorsal leva a graves alterações de sensibilidade no membro lesionado, bem como a perda do controle motor. A utilização do PRP possibilitou a regeneração das aferências, promovendo restauração de circuitos próprio-medulares. Houve diminuição da reação de micróglia”

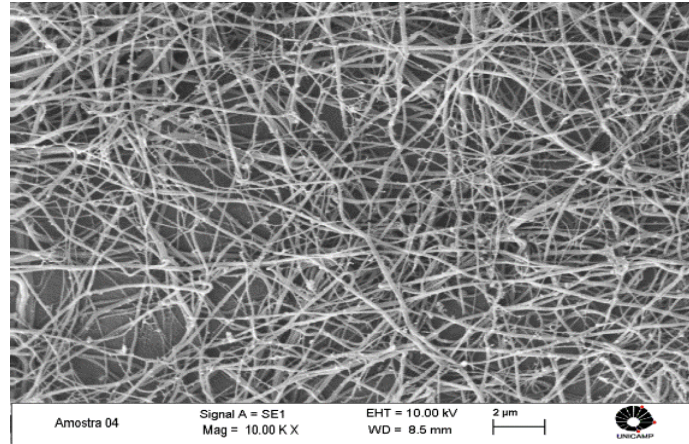
Experimentação básica

PRP e MSCs

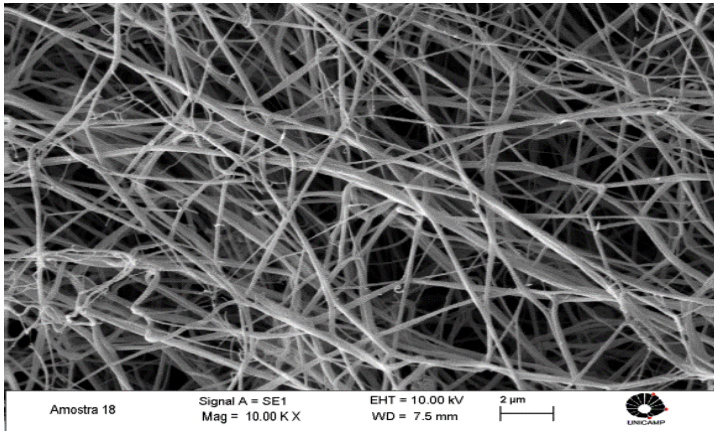
PRP ativado → Rede de fibrina + Acido Hialurônico e MSCs



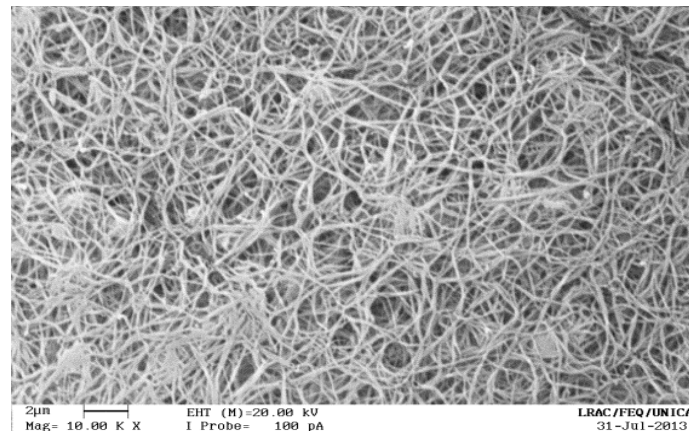
Fibrin/HAM (1/1) v/v



Fibrin/HAM (3/1) v/v



Fibrin v/v



Fibrin/fluid HA (1/1) v/v

Fibras finas



Liberação de Fatores de crescimento

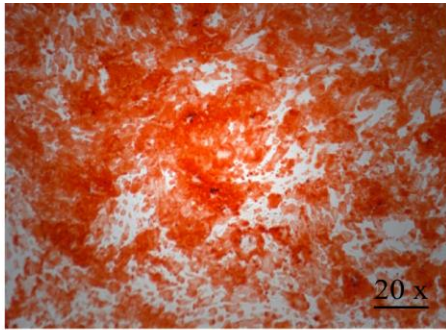


↑proliferação celular (MSCs)

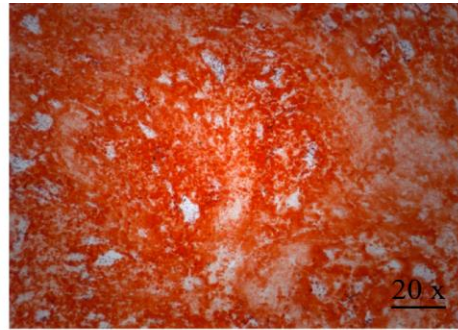
MEV dos scaffolds nas diferentes proporções de fibrina e ácido hialurônico

Experimentação básica

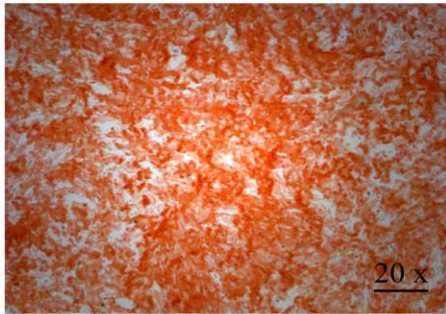
PRP e TA-MSCs Diferenciação osteogênica



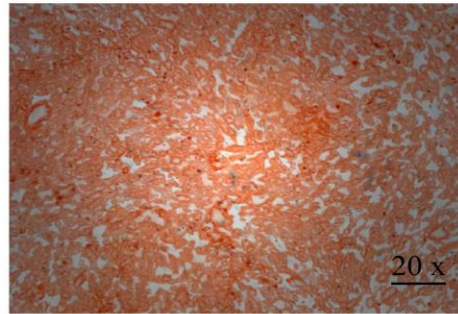
A)



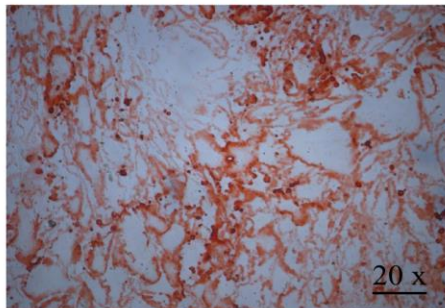
B)



C)



D)



E)

A) PRP 1 centrifugação
(PRP1a.C) concentrado à 2%

B) PRP 1.C 10% em relação ao meio

C) PRP preparado por 2 centrifugações (PRP2a.C) concentrado à 2%.

D) PRP preparado por 2 centrifugações (PRP2a.C) 10% em relação ao meio;

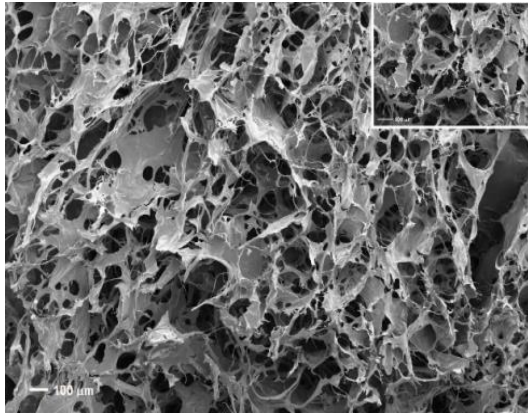
E) Controle Soro Fetal Bovino à 10%.

Experimentação básica

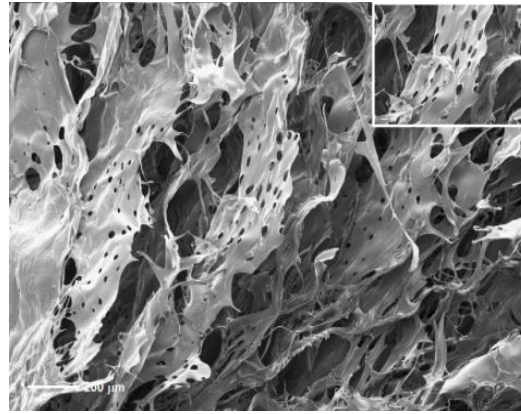
Esponjas de ácido hialurônico “*auto crosslinked*” (ACP)

Liberção de F. de crescimento → ↑ *proliferação celular* (MSCs)

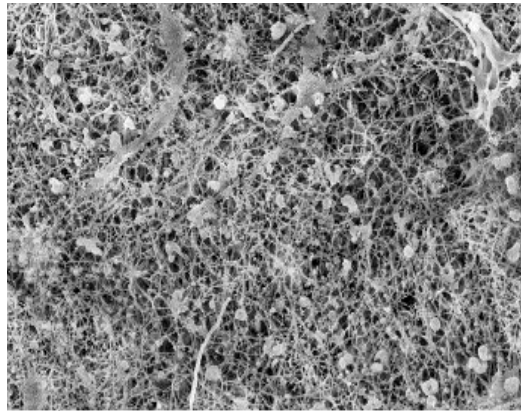
Platelet-rich plasma associated to microparticles or sponges of auto-crosslinked hyaluronic acid improves the proliferation and differentiation of h-AdMSCs. Andréa Arruda Martins Shimojo, Isabela Brissac, Sofia Galdames, Amanda Gomes Marcelino Perez, Angela Cristina Malheiros Luzo, William Dias Belangero, and Maria Helena Andrade Santana. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine



MEV, ACP sponge



MEV, ACP non-sponge



MEV, microscopic ACP scaffolds after 5 days in h-AdMSCs. culture

A estrutura das esponjas de ACP foram atóxicas, apresentaram melhores propriedades mecânicas, aumentando a viscoelasticidade liberando os fatores de crescimento continuamente por 10 horas (*relacionada com o tempo de degradação do scaffold*). Houve maior proliferação das TA MSCs e diferenciação para linhagem osteogênica.

Experimentação Básica

A Hyaluronic acid-based hydrogels for cartilage regeneration: capability for proliferation of mesenchymal stem cells stimulated by platelet-rich plasma in 3D culture. Andréa M. Shimojo, Bruna A G de Melo, Carla G. França, Daniel P. Sacomani, Ângela C. Luzo, Maria Helena Santana. Innovative Material Science & Nanotechnology Conference, Valencia Espanha, 2018.

HA Scaffolds

- Fluid HA
- Autocrosslinked Microparticles
- Thermosensitive Plain Hydrogel
- Crosslinked with ADH
- Thermosensitive Nanoparticles Crosslinked with ADH

PRP

- P-PRP
- L-PRP

Activation

Association Strategies

- Short or Long Time Mixture
- (Activation) + Seeded Cells
- HA Microparticles + PRP (Activation) + Seeded Cells
- Thermosensitive HA (Plain or Nano Particles) + PRP (Activation) + Seeded Cells in liquid phase

Promising strategies

Safe strategies, easy to standardization for clinical applications.

Improved physicochemical and mechanical properties leading to a large surface area for the MSCs adhesion and proliferation.

Thermosensitive hydrogels allow self-molding ,may incorporate cells, PRP, its nanoparticles may carry other active compounds.

Aplicação clínica

PRP –Uso clínico

Projeto Clínico fase 1


Ação do lisado plaquetário (PRP) na cicatrização de úlceras em pé diabético

Aluno: Guilherme Martins Neri. bolsa PIBIC 2018.

Co-orientação: Professora Maria Cândida Ribeiro Parisi

Tratamento compassivo

Paciente FLG, sexo masculino, portador de Diabetes Tipo 2, transplantado renal desde 2003, coronariopata e cardiopata, apresentando quadro de úlceras crônicas em membro inferior E (perna) há 10 meses, de etiologia mista (venosa e vascular-microangiopática), sem indicação de revascularização cirúrgica, com quadro de dor local intensa (E.V.A. 10/10), em terapia analgésica com derivado opioide, 4 comprimidos/dia com resposta parcial, e sem resposta à terapia tópica convencional em todo este período. foi solicitado a autorização para tratamento compassivo com prp à coordenação de assistência do HC UNICAMP em 28 de junho de 2018 e após autorização foi encaminhado para o CEP DA Universidade



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 05 de julho de 2018.

Of. CEP/PRP/Nº 156/2018

Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo
Diretora Médica do Serviço de Transfusão e do Laboratório de Processamento Celular
Hemocentro Campinas
Unicamp

REF.: Uso compassivo com plasma rico em plaquetas (PRP).


Prezada Senhora,

O uso compassivo não é pesquisa, mas situação de assistência cuja gravidade e falta de opções terapêuticas justificam os riscos de um procedimento. Não pode, portando gerar dados relativos à eficácia, segurança ou tolerabilidade. São situações dramáticas e que devem ser conduzidos com todos os cuidados éticos e de esclarecimento da família e paciente.

Diante disso, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas tomou ciência da utilização do tratamento das úlceras com o biocurativo produzido de lisado plaquetário a partir de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) do próprio paciente.

Ressaltamos, que esse procedimento conta com a ciência da Profa. Dra. Maria Cândida Ribeiro Parisi, Chefe do Ambulatório de Pé Diabético Hospital de Clínicas da UNICAMP e do Prof. Dr. Plínio Trabasso, Coordenador de Assistência do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Atenciosamente,


Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
13083-887 Campinas – SP
☎ <http://www.prp.unicamp.br/index.php/comite-de-etica-em-pesquisa>

Fone/Fax (019) 3521-8936
Fone/Fax (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

PRP –Uso clínico

Tratamento compassivo fotos iniciais

1ª. Semana
(pré tratamento)



PRP –Uso clínico

Tratamento compassivo fotos iniciais

2^a. Semana
(pós 1 semana de tratamento)



3^a. Semana
(pós 2^a. semana de tratamento)



4^a. Semana
(pós 3^a. semana de tratamento)



PRP –Uso clínico

Tratamiento compasivo fotos

5^a. semana
(4^a. semana de tratamiento)



PRP – Uso clínico

Plasma Rico em Plaquetas
PRP - Lisado Plaquetário



Abordagem de uma Universidade Pública



Padronização do processo

Experimentação básica

Ensaio pré-clínicos

Ensaio clínicos aprovados pelo CEP

Obrigada!



Contato: luzo@unicamp.br