

Molecular profiling of platelet rich plasma (PRP) and platelet secretomes

Association with regenerative capacity in vitro

Andrea Acebes Huerta

PlaBiTe and ISPA, Oviedo

Hypothesis and Objective

The use and demand of platelet-based bioproducts in regenerative medicine is steadily increasing. Platelet-rich plasma (PRP) is the most popular platelet-based bioproduct and its therapeutic application constitutes a relatively new approach in several clinical fields. However, the therapeutic outcome of PRP remains highly controversial, as most studies fail to characterize the product properly, which is also not helped by the fact that there is no consensus on PRP preparation, post-production processing and application methods. Adding to this, in most territories, PRP use is only allowed in an autologous manner.

Our objective was to characterize PRP and related subfractions at the molecular and functional level, to be able to develop novel platelet-derived bioproducts that could overcome the current limitations of PRP-based therapies.

Methodology

Sample preparation: We used PRP produced in a closed system using the equipment of a certified blood bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias), from independent healthy donors (interrupted blood donations, *i.e.* discard material). PRP related subfractions were obtained by differential centrifugation: Plasma-free Platelet Lysate (PFP-L) and Platelet Poor Plasma (PPP). The method to obtain Platelet Secretomes (PLT-S) is protected by international patent application (PCT/IB2022/057936). The agonists used to induce platelet cargo release were: TRAP6, convulxin, aggretin A, phorbol 12-myristate 13-acetate or collagen.

Caracterización Molecular del plasma rico en plaquetas (PRP) y secretomas de plaquetas

Asociación con la capacidad regenerativa in vitro

Hipótesis y objetivos

La demanda de bioproductos derivados de plaquetas en medicina regenerativa aumenta constantemente. El Plasma-Rico en Plaquetas (PRP) es el bioproducto más popular y su aplicación terapéutica constituye un enfoque relativamente nuevo en multitud de campos clínicos. Sin embargo, el resultado terapéutico del PRP sigue siendo muy controvertido, ya que la mayoría de los estudios no caracterizan el producto adecuadamente, lo que tampoco ayuda por el hecho de que no existe consenso sobre la preparación del PRP, el procesamiento posterior y los métodos de aplicación. Además, en la mayoría de los territorios el uso de PRP solo está permitido de manera autóloga.

Nuestro objetivo fue caracterizar el PRP y subfracciones relacionadas a nivel molecular y funcional, para poder desarrollar nuevos bioproductos derivados de plaquetas capaces de superar las limitaciones actuales de las terapias basadas en PRP.

Metodología

Preparación de las muestras: Se utilizó PRP producido en sistema cerrado utilizando la infraestructura de un banco de sangre certificado (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias), procedente de donantes sanos independientes (donaciones interrumpidas, *i.e.* material de descarte). Las subfracciones del PRP se obtuvieron mediante centrifugación diferencial: Lisado de Plaquetas Libre de Plasma (PFP-L) y Plasma-Pobre en Plaquetas (PPP). El método para obtener Secretomas de Plaquetas (PLT-S) está protegido mediante solicitud de patente internacional (PCT/IB2022/057936). Los agonistas utilizados para inducir la liberación del cargo plaquetario fueron: TRAP6, convulxina, agretina A, forbol 12-miristato 13-acetato o colágeno.

Molecular and functional characterization: 37 molecules were measured in bioproducts and related subfractions by using multiplex technology (Human Procartaplex; Invitrogen). The regenerative potential of bioproducts was evaluated *in vitro* by scratch wound closure assays using fibroblast cell cultures. Cell-free gaps were monitored for 48 hours using a time-lapse microscopy Zeiss AxioObserver Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) and the microphotographs were analyzed with ImageJ.

Results

The molecular and functional capacity of PRP and related subfractions revealed that the bioproducts that exert the most potent regenerative effect are those containing platelet-derived cargo. Therefore, we developed a method to obtain Platelet Secretomes (PLT-S), whose composition consists exclusively in the platelet granule cargo, highly enriched in growth factors and bioactive molecules, and subsequently free of plasma and unwanted cellular/platelet components. The comparison of the molecular profile between bioproducts containing platelet-derived cargo (PRP, PFP-L and PLT-S) revealed, as anticipated, that the PLT-S was the most enriched in growth factors and bioactive molecules. Interestingly, the potential to induce cell proliferation and/or migration shown by PLT-S was superior to that exerted by the rest of PRP-based bioproducts, which correlates with the enrichment of the bioproduct in platelet-derived cargo.

Conclusions

A better understanding of the nature and the active components of platelet-based bioproducts is crucial to optimize and standardize production methods as to improve the clinical benefit of the therapy. Given its characteristics, PLT-S represents a promising option to explore novel applications in regenerative medicine and other clinical fields: it would allow allogeneic use and the production method could be optimized to minimize batch-to-batch variation, or to incorporate post-processing steps to allow nanoencapsulation (targeted delivery) or storage with off-the-shelf purposes.

Caracterización molecular y funcional: Se midieron 37 moléculas en los distintos bioproductos y subfracciones mediante el uso de tecnología multiplex (Human Procartaplex; Invitrogen). El potencial regenerativo de los bioproductos se evaluó *in vitro* mediante ensayos de cierre de herida utilizando cultivos de fibroblastos humanos. Las células se monitorizaron durante 48 horas empleando microscopía Time-Lapse Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Alemania) y las microfotografías se analizaron con ImageJ.

Resultados

El perfil molecular y la capacidad funcional del PRP y subfracciones relacionadas reveló que los bioproductos que ejercen el efecto regenerativo más potente son aquellos que contienen cargo derivado de plaquetas. En este sentido, desarrollamos un método para la obtención de Secretomas de Plaquetas (PLT-S), cuya composición consiste exclusivamente en el contenido de los gránulos citoplasmáticos de las plaquetas, altamente enriquecido en factores de crecimiento y moléculas bioactivas, libre de plasma y componentes celulares/plaquetarios no deseados. La comparación del perfil molecular entre bioproductos que contienen factores plaquetarios (PRP, PFP-L y PLT-S) reveló, tal y como se anticipaba, que el PLT-S era el bioproducto más enriquecido, mostrando un gran potencial para inducir proliferación y/o migración celular, superior al ejercido por el resto de bioproductos basados en PRP.

Conclusiones

Comprender mejor la naturaleza y los componentes activos de los bioproductos derivados de plaquetas es crucial para optimizar y estandarizar los métodos de producción y mejorar el beneficio clínico de la terapia. Dadas sus características, PLT-S representa una opción prometedora para explorar nuevas aplicaciones en medicina regenerativa y otros campos clínicos: permitiría el uso alogénico y el método de producción podría optimizarse para minimizar la variación entre lotes, para permitir la nanoencapsulación o el almacenamiento con disponibilidad inmediata en la clínica.