



VNIVERSITATĪ VALÈNCIA

Facultad de Medicina

Departamento de Patología

**Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual.**

Tesis Doctoral presentada por:  
**Jose María García Sánchez**

Dirigida por:  
**Dra. Pilar Sepúlveda Sanchís**  
**Dr. Vicente Mirabet Lis**

Valencia, Mayo 2019



**Dña. Pilar Sepúlveda Sanchís**, Investigadora Principal de la Unidad de Regeneración y Trasplante Cardíaco del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe y **D. Vicente Mirabet Lis**, Biólogo Adjunto del Dpto. de Banco de Tejidos y Células del Centro de Transfusión de Comunidad Valenciana.

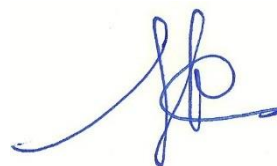
**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria, titulada «Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual», corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. Jose María García Sánchez, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 10 de Mayo de 2019.



Fdo. Pilar Sepúlveda Sanchís



Fdo. Vicente Mirabet Lis



## **Agradecimientos**

Siempre existe una meta después de un largo camino de esfuerzo y dedicación, aunque es difícil llegar sin el apoyo de grandes personas e inmejorables profesionales. Por ello, ahora que ya estoy llegando, solo tengo palabras de agradecimiento para el gran equipo que me ha rodeado todo este tiempo.

A mis directores y tutora de tesis, Dra. Pilar Sepúlveda Sanchís, Dr. Vicente Mirabet Lis y Dra. Amparo Ruiz Saurí, por haberme llevado con el suficiente tino hasta conseguir que este trabajo sea una realidad; gracias por el tiempo que dedicaron a enseñarme a pensar con rigor, a reorientar mis inicios y desarrollos, así como por el ánimo y confianza que siempre me dieron.

A mi familia, por la ilusión y el interés con que me escuchaban cuando les hablaba de estas cosas mías; siempre encontré en ellos palabras de comprensión y ánimo en los momentos de incertidumbre y duda.

A mi novia Laura, cuya fortaleza y tesón han contribuido en gran manera a llevar a cabo este proyecto; con paciencia infinita ha demostrado que no existe barrera que no se pueda superar.

Y finalmente, quiero dar las gracias a todos los que han hecho posible este trabajo: investigadores y miembros del Instituto de Investigación Sanitaria la Fe, médicos y enfermeras del servicio de Cirugía Plástica y Quemados y, en especial, a María Dolores Pérez del Caz, Arantxa Pérez Plaza y Cristhian Klenner Muñoz, cuya amistad y apoyo incondicional han marcado el inicio de mi carrera profesional.

A todos, agradecido quedo.



## Abreviaturas

ACD	Ácido cítrico-Citrato-Dextrosa
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BPC	Buenas Prácticas Clínicas
CLP	Capa leuco-plaquetaria
CTAD	Citrato-teofilina-adenosina-dipiridamol
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EVA	Escala visual analógica
FC	Fuerza centrífuga
FCR	Fuerza centrífuga relativa
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GR	Glóbulos rojos
HCT	Hematocrito
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IPPA	Injerto de piel parcial autólogo
LP-PRP	Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos
LR-PRP	Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos
MCV	Volumen corpuscular medio
ml	Mililitros
MPV	Volumen plaquetario medio
NAT	Amplificación genómica del ácido nucleico
OR	<i>Odds ratio</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PDW	Amplitud de distribución de tamaño plaquetario
pg	Picogramos
PL	Plasma
P-LCR	Plaquetocrito
POSAS	Escala de evaluación objetiva de paciente y observador
PPP	Plasma pobre en plaquetas
pq	Plaquetas
PRGF	Plasma rico en factores de crecimiento
PRP	Plasma rico en plaquetas
RAF	Rotor de ángulo fijo
RAV	Rotor de ángulo variable o basculante
RBC	Recuento de glóbulos rojos
PRPGF	Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento
SCTQ	Superficie corporal total quemada
ST	Sangre total
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VSS	Escala de cicatrización Vancouver
WBC	Recuento de glóbulos blancos





## Índice

Resumen .....	15
Introducción.....	19
1. Situación actual y justificación del estudio .....	21
2. Plaquetas.....	23
3. Mecanismo de reparación tisular.....	25
4. Plasma rico en plaquetas.....	26
4.1. Contenido .....	26
4.2. Métodos de obtención .....	27
4.3. Terminología .....	28
4.4. Utilización clínica .....	30
Objetivos.....	39
1. Objetivo principal .....	41
2. Objetivos secundarios.....	41
Material y métodos .....	43
1. Estudios preclínicos.....	45
1.1. Protocolo de coagulación .....	45
2. Variables del estudio .....	45
2.1. Selección de sujetos .....	45
2.2. Recurso terapéutico.....	47
2.3. Criterio de valoración principal.....	47
2.4. Criterios de valoración secundarios .....	47
3. Diseño del estudio .....	50

3.1.	Enmascaramiento .....	50
3.2.	Aleatorización .....	50
3.3.	Descripción del tratamiento .....	51
3.4.	Cuantificación factores de crecimiento .....	58
3.5.	Conservación de muestras .....	58
3.6.	Cronograma del estudio .....	59
3.7.	Evaluaciones.....	61
4.	Análisis estadístico .....	62
5.	Principios éticos y autorización .....	63
6.	Revisión bibliográfica .....	63
	Resultados.....	65
1.	Análisis crítico de la literatura publicada .....	67
1.1.	Centrifugación.....	67
1.2.	Activación plaquetaria.....	77
1.3.	Temperatura .....	78
1.4.	Coagulación.....	79
1.5.	Congelación-descongelación.....	82
1.6.	Leucocitos .....	83
1.7.	Concentración plaquetaria y de factores de crecimiento.....	83
1.8.	Edad.....	85
1.9.	Pauta de aplicación.....	85
1.10.	Fármacos.....	85
1.11.	El paciente quemado.....	88

1.12.	Uso clínico del PRP .....	89
2.	Análisis descriptivo .....	93
3.	Coste .....	98
3.1.	Material utilizado para obtención y aplicación de PRP y PRGF de forma manual .....	98
3.2.	Otras formas de tratamiento .....	98
3.3.	Comparación coste de tratamientos.....	99
4.	Laboratorio .....	99
4.1.	¿Existe relación entre el número de plaquetas en el PRP (plaquetas plasma) y el factor de concentración plaquetaria?.....	99
4.2.	¿Existe correlación entre la concentración de plaquetas y los factores de crecimiento? .....	100
4.3.	¿Existe relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y los factores de crecimiento cuantificados en las muestras?.....	103
4.4.	Relación entre las variables edad, SCTQ, plaquetas antes de la intervención, plaquetas en el momento de la intervención, hematocrito antes de la intervención y hematocrito en el momento de la intervención con plaquetas plasma, factor de concentración plaquetaria, factor PDGF, factor TGF- $\beta$ , factor EGF, factor VEGF y factor FGF. ....	106
5.	Paciente.....	107
5.1.	Porcentaje de cicatrización de cada zona de tratamiento en cada paciente en función del tiempo.....	107
5.2.	Evolución de la cicatrización en función del tratamiento empleado.....	108
5.3.	Estimación de los efectos de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual en cada visita de evaluación .....	109
5.4.	Dolor.....	110

5.5. Tasa de infección.....	113
5.6. Calidad de cicatrización .....	113
Discusión .....	117
1. ¿Por qué hay tantas dificultades para analizar comparativamente los resultados clínicos aportados por grupos diferentes?.....	119
2. Umbral terapéutico PRP .....	121
3. Papel de las vesículas extracelulares y la relación entre la concentración plaquetaria y la de factores de crecimiento.....	126
4. Sobre la presencia de los glóbulos blancos .....	129
5. Sobre la liberación de factores desde el coágulo .....	130
6. Sobre el lisado plaquetario .....	131
7. Papel del PRP en la reparación cutánea.....	133
7.1. PRP en el paciente quemado .....	136
7.2. Papel del PRP y PRGF en la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados: tiempo y calidad de la cicatrización .....	139
8. Dolor.....	141
9. Infección .....	141
10. Coste .....	142
11. Limitaciones.....	143
Conclusiones.....	145
Referencias bibliográficas .....	149

Anexos.....	179
1. Listado de Tablas.....	181
2. Listado de Figuras .....	183
3. Dictamen del comité de ética de la investigación con medicamentos.....	186
4. Autorización del ensayo clínico por la AEMPS.....	190
5. Resolución de ayudas económicas .....	192



# Resumen





La técnica más empleada para la restauración de la barrera cutánea en los pacientes quemados es el injerto de piel autólogo de espesor parcial. Su obtención conlleva generar un área cruenta a nivel de otra localización cutánea del mismo paciente, conocida como zona donante. Esta área cura generalmente en un período de entre 7 y 14 días mediante un proceso de cicatrización dirigida. Cuando existen grandes defectos que requieren cobertura, como es el caso de los grandes quemados en los que la extensión de la quemadura limita la disponibilidad de área donante, pueden ser necesarias varias tomas de la misma zona. Por lo tanto, la opción terapéutica global en este tipo de pacientes va a depender de su velocidad de curación.

El manejo adecuado de las heridas del área donante es de especial importancia para la reducción del tiempo de epitelización y la prevención de morbilidad, resultante del retraso en la cicatrización, las infecciones y su conversión en herida de espesor total.

El material de cobertura ideal para el manejo de la zona donante aún no se ha desarrollado y existe una amplia variabilidad en la actualidad. En nuestra institución, los estándares de manejo se basan en la utilización de apósitos tipo hidrofibra, alginato, hidrocoloide o gasas parafinadas.

Por otra parte, la utilización de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo y sus derivados, como el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), en el tratamiento de las heridas es una de las opciones terapéuticas en investigación en los últimos años. Son conocidas sus propiedades de estimulación angiogénica, de proliferación de fibroblastos y su efecto hemostático. Si bien hay algunos estudios que prueban la eficacia de su utilización en el tratamiento de heridas crónicas (como las úlceras diabéticas) y heridas agudas (como las quirúrgicas), su uso no está exento de cierta controversia. En cuanto a la aplicación en el paciente quemado y, más concretamente, el manejo de las zonas donantes, apenas si se dispone de información.

Por todo ello, se ha llevado a cabo un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego sobre el tratamiento de las zonas donante de injerto de piel parcial autólogo (IPPA) en el paciente quemado, con el fin de analizar comparativamente el tratamiento con PRP y PRGF autólogos frente al tratamiento con apósito hidrocoloide.

Los resultados obtenidos, referentes al tiempo de cicatrización, apuntan a una mayor precocidad en las zonas tratadas con PRP o PRGF respecto al tratamiento con apósito

hidrocoloide [*Odds ratio* (OR) PRGF al 5º día postintervención de 1,408 p=0,542; OR PRP al 5º día postintervención de 1,86 p= 0,262; OR PRGF al 8º día postintervención 2,47 p =0,114; y OR PRP al 8º día postintervención de 3,397, esta última con p =0,036]. Respecto a la calidad de la cicatriz de la zona donante de IPPA, se obtuvieron valores inferiores en las escalas Vancouver (VSS) y escala de evaluación objetiva de paciente y observador (POSAS) en las zonas tratadas con PRP o PRGF, respecto al tratamiento con apósito hidrocoloide. No obstante, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Además, se obtuvo una menor puntuación en la escala visual analógica del dolor (EVA) en las zonas tratadas con PRP o PRGF, sin complicaciones en ninguno de los pacientes.

En conclusión, el tratamiento de la zona donante de injerto de piel parcial en el paciente quemado con PRP o PRGF proporcionó en nuestro estudio una cicatrización precoz y de mejor calidad, con mejor control del dolor y sin incremento de complicaciones, respecto al tratamiento habitual con apósito hidrocoloide.

# **Introducción**



## 1. Situación actual y justificación del estudio

El avance producido en las últimas décadas en las técnicas y protocolos de resucitación y soporte vital, ha contribuido a un notable incremento de la tasa de supervivencia del paciente quemado (Cantais y cols., 2008). En consecuencia, las opciones terapéuticas utilizadas hoy en día deben tratar de disminuir la morbilidad y las secuelas en este tipo de pacientes, permitiendo de esta forma alcanzar un adecuado estatus funcional que mejore su calidad de vida posterior.

El manejo de la zona donante tras la obtención del IPPA es de suma importancia en la recuperación del paciente con quemaduras que requieren tratamiento quirúrgico, siendo de vital importancia en el paciente gran quemado, cuya supervivencia y calidad de vida posterior depende en gran medida de la rápida cicatrización de las zonas donantes de piel. Debido a la amplia extensión de piel quemada estas zonas se ven reducidas a mínimas áreas, a las que hay que recurrir en sucesivas ocasiones para llegar a la cobertura total del paciente, dependiendo en todo momento de su tiempo de cicatrización.

Existe una notable diversidad de apósitos para el tratamiento de estas zonas. Como consecuencia, resulta complejo definir protocolos uniformemente estandarizados, considerándose necesario el desarrollo de estudios utilizando parámetros de evaluación de resultados que faciliten el análisis comparativo (Voineskos y cols., 2009; Serebrakian y cols., 2018).

El papel de las plaquetas en el proceso de reparación tisular y la facilidad para obtenerlas con métodos mínimamente invasivos (un simple pinchazo) y con escasa morbilidad, las ha convertido en un potencial recurso terapéutico para tratar distintas patologías en diferentes especialidades. A pesar de la gran difusión de su uso clínico, lo cierto es que existe una notable controversia sobre los resultados obtenidos en la literatura científicamente contrastada.

Pese a la existencia de estudios *in vitro* e *in vivo* que sugieren su papel en la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas, el número de trabajos efectuados con carácter prospectivo es muy escaso. Además, resulta ciertamente complejo establecer criterios comparativos, fundamentalmente como consecuencia de la falta de información descriptiva sobre el detalle de la metodología empleada y de la amplia diversidad de modalidades de procesamiento (Ramos-Torrecillas y cols., 2014). En un buen número de

casos, los parámetros de la metodología utilizada se basan en criterios empíricos y tampoco hay que olvidar que la evaluación de resultados no está exenta de cierta subjetividad.

En el caso de las quemaduras y sus áreas donantes, los estudios existentes hasta la actualidad no ofrecen la suficiente evidencia como para obtener conclusiones determinantes acerca del potencial beneficio sobre la cicatrización del PRP y sus derivados (Marck y cols., 2014; Pallua y cols., 2010; Klosová y cols., 2013; Maghsoudi y cols., 2013).

Cabe señalar una ventaja importante del PRP autólogo en el ámbito clínico, su bajo riesgo biológico, como reportan los múltiples estudios llevados a cabo en sus diversos campos de aplicación (Marck y cols., 2014; Picard y cols., 2015). Su carácter autólogo le confiere tolerancia inmunológica, además de minimizar otros inconvenientes potenciales asociados con el uso de productos alogénicos o xenogénicos (transmisión de enfermedades infecciosas, por ejemplo) (Albanese y cols., 2013). Por otro lado, es un producto fácil de obtener y no consume tiempo adicional para el paciente y/o especialista, llevándose a cabo su procesamiento de forma simultánea a la realización de la cirugía.

Como se verá más adelante, existen múltiples denominaciones de PRP que se pueden utilizar en función de las características del producto final obtenido. Una de ellas, el PRGF, se obtiene tras someter a la suspensión plaquetaria a uno o más ciclos de congelación/descongelación. De este modo, con la criofractura, se pretende conseguir un mayor rendimiento del procedimiento, reduciéndose significativamente la presencia de células viables, pudiendo incluso llegar a obtener un producto acelular (Pietramaggiori y cols., 2006; Pietramaggiori y cols., 2010). Sin embargo, no se dispone de información sobre estudios comparativos entre PRP y PRGF.

Con el objetivo de establecer un marco de actuación para este tipo de actividad, en mayo de 2013, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) emitió un informe relativo a los aspectos a considerar para el uso clínico de plasma rico en factores de crecimiento. En él señalaba la falta de resultados de ensayos clínicos con la suficiente fiabilidad para extraer conclusiones sobre las indicaciones clínicas y animaba a la realización de experiencias clínicas controladas que permitieran la elaboración de un listado de indicaciones con datos debidamente contrastados.

El desarrollo del proyecto se ha planteado de acuerdo con lo dispuesto en este informe y en respuesta a la demanda que se hace desde el mismo para la aportación de datos clínicos basados en evidencias suficientemente contrastadas. Hay que tener presente que en nuestro entorno autonómico aún no se ha establecido el mecanismo de autorización sanitaria específica para esta actividad, en lo que a su uso clínico respecta. En cualquier caso, el presente trabajo se ha realizado de acuerdo con las directrices del informe, las buenas prácticas clínicas (BPC) y los requisitos legales pertinentes.

La implementación de la cicatrización de las zonas donante conlleva grandes repercusiones estéticas, funcionales e incluso vitales. Mediante el análisis comparativo de estas distintas opciones terapéuticas, se puede llegar a resultados que optimicen su curación, disminuyendo la morbilidad de los pacientes quemados y el consumo de recursos sanitarios.

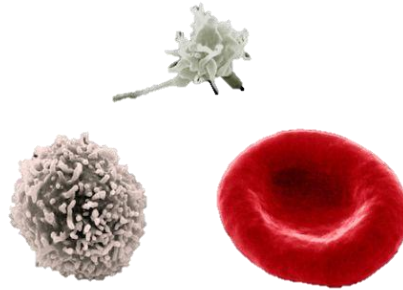
## **2. Plaquetas**

La sangre ha ocupado un lugar relevante en la historia de la humanidad, otorgándose desde tiempos remotos una vital importancia y un concepto místico, como denota su presencia dentro de la teoría humoral de la época grecorromana. A pesar de ser un tejido de fácil acceso, resistió durante mucho tiempo los esfuerzos de los investigadores por descubrir su verdadero significado fisiológico, lográndose realizar la primera transfusión exitosa y con base científica entre humanos a principios del siglo XX (Góngora-Biachi y cols., 2005).

En su composición se distingue una fase líquida y otra sólida, dentro de la cual se haya el elemento plaquetario. Esta fue advertida desde el inicio de la descripción de la celularidad sanguínea en el siglo XVII. No obstante, su reconocimiento como una tercera partícula en la sangre se remonta a finales del siglo XIX, gracias a los trabajos de Bizzozero y Hayem (Izaguirre-Ávila y cols., 2005).

Las plaquetas o trombocitos (figura 1) son fragmentos citoplasmáticos de 1-2 $\mu$ m de diámetro generados en la médula ósea por fragmentación de sus células precursoras, los megacariocitos. Cada plaqueta contiene entre 50 y 80 gránulos alfa, también contiene gránulos densos, mitocondrias y gránulos lisosomales. Se han citado en torno a 300 sustancias bioactivas en el contenido plaquetario. La vida media de las plaquetas en el organismo humano es de unos 10 días y son eliminadas por macrófagos del sistema

retículo-endotelial. Entre sus funciones principales destacan su importante y conocido papel en el proceso de hemostasia, su influencia en la reparación y regeneración de los tejidos y en la inmunogenicidad del organismo. Su activación tras un daño tisular conlleva su agregación y formación del tapón plaquetario, con la secreción de múltiples factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas (Farré y cols., 2013).



*Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de barrido: plaqueta (superior), glóbulo blanco (inferior izquierda) y eritrocito (inferior derecha).*

La aplicación inicial del concentrado plaquetario fue para el tratamiento y prevención de la hemorragia en casos de trombopenia severa, secundaria a aplasia medular, leucemia o pérdida sanguínea significativa. Este concentrado de plaquetas fue llamado plasma rico en plaquetas y su concentración plaquetaria ha sido clásicamente de  $0,5 \times 10^{11}$  plaquetas/unidad (Dohan y cols., 2009).

Por otro lado, su intervención (mediante la secreción de sustancias bioactivas) en las diferentes etapas del proceso de reparación tisular (hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación) ha sugerido su empleo en variadas indicaciones clínicas. Hace ya 50 años, mediante la utilización de pegamentos de fibrina, constituidos por concentrados de fibrinógeno (Matras, 1970; Whitman y cols., 1997) se describió su potencial para sellar heridas y estimular su cicatrización.

Múltiples técnicas han sido descritas para la obtención de PRP, cuyo nexo en común es la obtención de sangre del paciente y su procesamiento posterior para separar sus componentes en función de su diferente densidad. El tipo de recipiente utilizado para recoger la sangre, el anticoagulante de elección o el empleo de un sistema basado en una o dos centrifugaciones, son algunos de los parámetros que conllevan la citada variabilidad en los protocolos. Si a esto añadimos que también se utilizan distintas fuerzas y tiempos de centrifugación, así como diferentes protocolos para desencadenar la liberación del



contenido de los gránulos plaquetarios, se puede entender la dificultad para la estandarización. En general, se puede establecer como una componente común el objetivo de descartar la capa eritrocitaria, así como una buena parte de los glóbulos blancos y la fracción plasmática con menor concentración de plaquetas (denominada PPP, plasma pobre en plaquetas). Por otro lado, también las pautas de dosificación y metodologías de aplicación evidencian una notable variabilidad, lo que no hace sino incrementar la complejidad para efectuar análisis comparativos (Dohan y cols., 2009).

### 3. Mecanismo de reparación tisular

Se trata de un complejo proceso de restauración de los tejidos que se desarrolla en una serie de etapas superpuestas (figura 2). Tras la lesión, se produce la hemostasia con la coagulación y, seguidamente, las plaquetas se agregan, activándose el mecanismo de liberación del contenido de sus gránulos. A continuación, durante la fase inflamatoria, se van incorporando neutrófilos, macrófagos y linfocitos, por este orden. Los glóbulos blancos son especialmente importantes en los primeros momentos, por su papel defensivo frente a microorganismos. Al igual que las plaquetas, también aportan sustancias bioactivas (por ejemplo, estimulando la migración celular mediante mecanismos quimiotácticos o desbridando tejido dañado). La fase proliferativa se asocia con el crecimiento de capilares y la formación del tejido de granulación. La presencia de fibroblastos y la síntesis de matriz extracelular facilitan la reepitelización, a partir de los bordes de la lesión y de aquellos focos de queratinocitos basales con potencial de proliferación y diferenciación. La remodelación del tejido hasta recuperar completamente su aspecto estético y capacidad funcional puede llegar a tardar varias semanas o incluso meses.

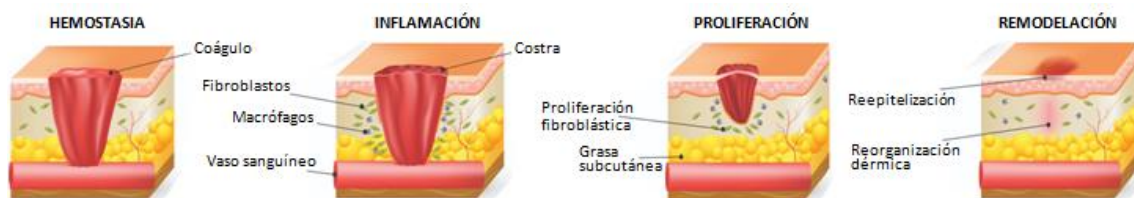


Figura 2. Etapas de la reparación tisular.

En cualquier caso, el proceso de reparación tisular debe contemplarse con un criterio multifactorial, ya que depende de un número importante de variables que, además se

interrelacionan entre sí, por lo que hay que asumir una notable complejidad y la dificultad para analizar datos comparativamente.

#### **4. Plasma rico en plaquetas**

##### **4.1. Contenido**

Entre la gran cantidad de sustancias bioactivas que contienen las plaquetas, centraremos la atención en aquellas que intervienen en el proceso de reparación tisular.

Entre los componentes del PRP destacan el PDGF, el TGF- $\beta$ , el factor plaquetario 4 (PF4), la interleucina 1 (IL-1), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento insulínico (IGF). Estas moléculas, entre otras, están implicadas en la promoción del ambiente local de regeneración, estimulando la proliferación, la migración y diferenciación celulares y la angiogénesis (Golebiewska y cols., 2015; Marck y cols., 2014; Pallua y cols., 2010). Su liberación comienza 10 minutos después de la coagulación, pudiendo llegar a prolongarse durante varios días.

Los factores de crecimiento TGF- $\beta$  y PDGF intervienen en la cicatrización de heridas, desencadenando el crecimiento y la diferenciación celular. Estudios *in vivo* e *in vitro* han evidenciado que las células que participan en el proceso de regeneración tisular son sensibles en mayor o menor medida a los factores de crecimiento (Kazakos y cols., 2009). Así, por ejemplo, los fibroblastos son sensibles a FGF, PDGF, IGF y EGF. Este último es un factor quimiotáctico para los fibroblastos, y su aplicación tópica aumenta la regeneración epidérmica y la fuerza de la tensión de la herida. Las células endoteliales son sensibles a FGF y VEGF (Pintucci y cols., 2002). La proliferación vascular es estimulada por los factores VEGF, PDGF y FGF (Go y cols., 2003). El PDGF interviene en los procesos de migración y proliferación de fibroblastos y células musculares lisas, aumenta la deposición de colágeno y también es un factor quimiotáctico para neutrófilos y monocitos (Carter y cols., 2003). Además, se ha demostrado que la proliferación de condrocitos y osteoblastos es promovida por los factores PDGF y FGF (Kaps y cols., 2002). El factor TGF- $\beta$  regula la diferenciación celular, la proliferación, la quimiotaxis y la síntesis de varias proteínas de la matriz extracelular, incrementando la regeneración epidérmica, promoviendo la síntesis de colágeno y acelerando su maduración en el periodo inicial de la cicatrización. Su concentración es 4 veces mayor en el PRP que en

el PPP (Carter y cols., 2003). En modelos animales, se ha demostrado que su aplicación tópica incrementa la síntesis de colágeno, el tejido de granulación y la fuerza de tensión de la herida (Kazakos y cols., 2009; Ostvar y cols., 2015).

En definitiva, con su empleo se pretende aumentar la concentración de factores de crecimiento, potenciando así la capacidad biorregeneradora (Marck y cols., 2014). De esta manera, el PRP se propone como una alternativa eficaz en el manejo de las heridas. A pesar de todo, son escasos los estudios clínicos bien contrastados y, en lo que se refiere a la reparación cutánea, principalmente enfocados al tratamiento de úlceras cutáneas crónicas (Conde-Montero y cols., 2014).

#### **4.2. Métodos de obtención**

Como ya se ha comentado previamente, hay una notable variedad de protocolos en la bibliografía y no siempre se citan todos los parámetros necesarios para reproducirlos. Algunos de ellos cuentan con dispositivos específicos que permiten la manipulación en un sistema cerrado. Este aspecto es importante, ya que por un lado facilita la estandarización y, por otro, minimiza el riesgo de contaminación medioambiental, si no se dispone de una cabina de flujo laminar con una calidad de aire suficiente. Sin duda, la plaquetoaféresis, utilizando máquinas que procesan la sangre conforme es extraída del paciente y la separan selectivamente en sus componentes, es un método que proporciona directamente el PRP y, además, permite la regulación de la concentración final. Los sistemas de doble centrifugación varían entre los que hacen una primera centrifugación para obtener una capa leuco-plaquetaria (CLP) sobre los hematíes y luego otra para eliminar hematíes y glóbulos blancos residuales; y aquellos que proporcionan un PRP en la primera centrifugación y luego concentran las plaquetas en el fondo del recipiente, eliminando parte del PPP sobrenadante, para luego resuspenderlas. Sin embargo, la doble centrifugación también puede incrementar el riesgo de activación plaquetaria, lo que limitaría el rendimiento de la concentración de factores. El sistema más rápido es aquel que requiere una sola centrifugación, separando en la parte superior directamente el PRP o bien, previa retirada de la fracción más superior (que supuestamente contiene el PPP).

Los dispositivos patentados que aparecen en la bibliografía ofrecen rendimientos de plaquetas en el PRP respecto de la sangre total entre el 30 y el 60%. Algunos ejemplos de sistemas automatizados son: GPS (Biomet, Warsaw, IN), PCCS (Implant Innovations Inc., FL, USA), Symphony II (DePuy, IN, USA), Smart-PReP (Harvest Technologies

Corp., MA, USA), Magellan (Medtronic, MN, USA), Fibrinet (Cascade Medical Enterprises, Plymouth, UK), Regen (Regen Lab, Lausanne, Switzerland), Plateltex (Plateltex S.R.O., Bratislava, Slovakia), vivostat (Vivostat A/S, Borupvang, Denmark), C-punt ( Biomed Device, Modena, Italy), PRGF Endoret (BTI Vitoria-Gasteiz, Spain) y Arthrex (Naples, FL, USA).

Especialmente cuando se pretende validar sistemas «caseros», desarrollados por el propio usuario, conviene tener en consideración una serie de pautas que se comentan seguidamente. A la hora de obtener un PRP centrifugando la sangre del paciente, el establecimiento de los parámetros a utilizar debe efectuarse desde la perspectiva de que es más importante lo que va a suceder en la parte superior del tubo o bolsa que en el extremo distal del mismo (a diferencia de lo que sucede cuando simplemente se pretende recoger un sedimento en el fondo del recipiente). Por esta razón, para poder evaluar la idoneidad de un protocolo y reproducirlo convenientemente es necesario conocer: el valor de g (o bien rpm y radio), el tiempo (especificando la duración de los períodos de aceleración y deceleración), la altura o tamaño del recipiente (tubo o bolsa) para determinar los radios mínimo y máximo, y el volumen de sangre contenido. Utilizar determinados protocolos descritos parcialmente (resulta difícil encontrar artículos donde se encuentre bien detallada la parametrización) puede conllevar a la obtención de un plasma acelular en lugar de un PRP, por ejemplo, simplemente por utilizar un tubo más corto o un volumen de sangre menor, con un mismo régimen de rpm.

### **4.3. Terminología**

En ocasiones, la importancia de la correcta denominación se ha plasmado en citas bibliográficas (Kakudo y cols., 2009). Por lo tanto, no es extraño que algunos autores se hayan esforzado por establecer unos criterios para la calificación de las diferentes presentaciones que se pueden obtener con este producto. Así, por ejemplo, dependiendo del modo de obtención, la presencia de glóbulos blancos en el producto final puede variar significativamente. Por otro lado, también el modo de aplicación va a dar lugar a diferencias, dependiendo por ejemplo si se infiltra simplemente el producto recién obtenido o bien se activa previamente (añadiendo calcio y, en ocasiones, trombina); además, en función de la indicación clínica, se puede aplicar como líquido o bien como gel (coagulado). De acuerdo con todo ello, Dohan Ehrenfest (2014) ha propuesto la siguiente clasificación:

- P-PRP (*Pure Platelet-Rich Plasma*): Plasma rico en plaquetas puro. Se caracteriza por la ausencia de leucocitos y una red de fibrina de baja densidad después de la activación. Su procesamiento puede realizarse de forma automatizada o manual. Los métodos automatizados descritos para su obtención, como la plaquetoaféresis o el separador celular Vivostat PRF (Vivolution, Denmark), suponen métodos laboriosos y de elevado coste que dificultan su práctica clínica diaria. Entre los métodos manuales, Anitua describió uno de los primeros protocolos de concentración plaquetaria en 1999. En él, tras la centrifugación de tubos con sangre venosa, se desechaba la parte superior del plasma y se obtenía mediante pipeteado manual el plasma restante considerado rico en factores de crecimiento, por encima de la capa leucocitaria. La polimerización de la fibrina era inducida con la adición de cloruro cálcico al 10%, obteniéndose un gel inestable de PRGF a los 15-20min. Otros autores como Nahita (Tamimi y cols., 2007) también han descrito protocolos para su obtención manual. Se tratan de métodos de menor coste aunque con menor precisión.
- L-PRP (*Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma*): Plasma rico en plaquetas y rico en leucocitos. Son concentrados plaquetarios con leucocitos y la red de fibrina tras la activación es de baja densidad. Se obtiene mediante 2 fases de centrifugación, la primera en la que obtenemos la separación de la sangre en tres componentes, de los cuales el PPP y el *buffy coat* se someten a una segunda centrifugación a alta velocidad, descartándose posteriormente el PPP y obteniendo un PRP rico en plaquetas, leucocitos y fibrinógeno. También existen sistemas automáticos para su producción.
- P-PRF (*Pure Platelet-Rich Fibrin*): Fibrina rica en plaquetas-pura. No contiene leucocitos y la red de fibrina tras la activación es de alta densidad. Se obtiene tras una primera centrifugación a alta velocidad en un tubo con citrato trisódico y gel separador (disminuye la cantidad de leucocitos extraídos), obteniendo las tres típicas capas sanguíneas. El PPP y el *buffy coat* se transfieren a un segundo tubo con CaCl<sub>2</sub> y se centrifuga durante 15min, obteniéndose un coágulo estable debido a la coagulación dinámica por la centrifugación. Se trata de un método costoso para la práctica diaria.
- L-PRF (*Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin*): Fibrina rica en plaquetas y leucocitos. También llamado de segunda generación, son concentrados de plaquetas con leucocitos y la red de fibrina tras la activación es de alta densidad. También conocido como Choukroun's PRF. En este protocolo no se utilizan anticoagulantes ni agentes

gelificantes. Se realiza una centrifugación a baja velocidad de la sangre, produciéndose la activación plaquetaria y polimerización de la fibrina durante la centrifugación, que se verifica inmediatamente tras la extracción (figura 3). El coágulo de fibrina formado en medio de las tres capas es rico en plaquetas y leucocitos. Esta matriz de fibrina se mantiene estable durante tiempo, pudiendo ser utilizado como biomaterial.

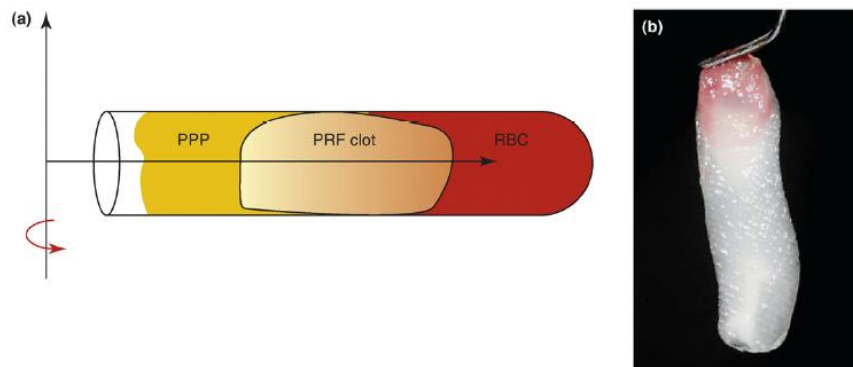


Figura 3. Coágulo de fibrina obtenido por el método descrito por Choukroun.

Sin embargo, en esta clasificación se echa en falta el sobrenadante obtenido tras la activación plaquetaria o bien por lisado de las plaquetas mediante ciclos sucesivos de congelación/descongelación, es decir, el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). En estos casos, es posible eliminar por centrifugación (ya que desaparece el riesgo de activación plaquetaria) los residuos celulares. Este lisado plaquetario se ha propuesto como alternativa al suero bovino fetal para suplementar el medio de cultivo utilizado durante los procesos de expansión celular *ex vivo* propios de las terapias avanzadas. Se ha demostrado la preservación de su potencial biológico (Anitua y cols., 2018; Nakatani y cols., 2017). Entre sus principales ventajas se encuentra la posibilidad de conservación de la muestra congelada, a largo plazo, lo que facilita su aplicación diferida, disminuyendo la frecuencia de extracciones de sangre de los pacientes sin afectar a su eficacia terapéutica. También este PRGF, o lisado plaquetario, es el producto de elección para suplementar medios de cultivo para la expansión *ex vivo* de células para su uso en terapias avanzadas.

#### 4.4. Utilización clínica

##### 4.4.1. Bioseguridad

Generalmente, el concentrado plaquetario se obtiene a partir del procesamiento de sangre del propio paciente (autólogo). Los efectos adversos asociados al uso autólogo son los

propios del método de extracción sanguínea mediante venopunción (dolor, taquicardia, sudoración, síncope, infección) (Patel y cols., 2013); o de la forma de aplicación del concentrado plaquetario, en caso de infiltración dérmica o intraarticular, como tumefacción, dolor, infección y limitación funcional (Li y cols., 2011). En general, el uso de PRP autólogo se presenta como un tratamiento seguro (Picard y cols., 2015; Nurden y cols., 2008; Marx y cols., 2004; Kotsovilis y cols., 2010; Villela y cols., 2010).

En el caso de valorar el uso de PRP en grandes quemados, teniendo en cuenta que estos pacientes tienen un estado fisiológico alterado que puede afectar a la función plaquetaria, además de que el propio estado clínico del paciente podría contraindicar la extracción de sangre, podría considerarse el uso alogénico (de donante) (Marck y cols., 2014). En este caso, los riesgos potenciales se amplían a una eventual respuesta inmunológica e incluso la transmisión de enfermedades infecciosas.

#### **4.4.2. Aspectos éticos y marco regulador**

Quizá uno de los principales inconvenientes para obtener información veraz y científicamente contrastada sobre el uso del PRP se deba a que se ha convertido en un lucrativo negocio. Jones (2018) ha estimado un mercado global de unos 3.880 millones de euros en la próxima década, para el uso del PRP en el tratamiento del dolor músculo-esquelético. Por desgracia, parece ser que el aspecto lucrativo ha primado sobre las evidencias científicas en el desarrollo de esta tecnología. Algunos destacados deportistas (Tiger Woods, Rafa Nadal, Stephen Curry...) han facilitado la promoción del producto. Kantrowitz (2018) ha calculado que un 93% de los responsables médicos de deportistas de élite en USA utilizan regularmente el PRP.

La simplicidad técnica que supone una extracción de sangre y su posterior centrifugación ha llevado a que la aplicación clínica de este producto se haya extendido en todo el mundo, sin que se cuente en muchos casos con una evidencia científica que justifique su utilización, especialmente considerando su empleo para una amplia lista de diferentes indicaciones clínicas. En algún caso extremo, la discusión sobre los intereses que mueven el uso de PRP ha llegado a la descalificación científica (Dohan Ehrenfest y cols., 2014).

A la hora de poner orden en esta materia, va a resultar determinante aclarar qué consideración tiene el producto en cuestión. En este sentido, conviene resaltar lo dispuesto en el Informe V1/23052013 de la AEMPS sobre el uso de plasma rico en

plaquetas. Según dicho documento «atendiendo a la composición del plasma rico en plaquetas, el mecanismo de acción postulado así como a sus fines o indicaciones», se asume su definición como medicamento de uso humano (no encuadrado entre los medicamentos de producción industrial ni entre los de terapias avanzadas)».

Sin entrar a discutir si el PRP es un producto que se integre en la definición de medicamento, no es menos cierto que otros productos (por ejemplo, como la matriz ósea desmineralizada, también utilizada como fuente de factores de crecimiento) igualmente se podrían incluir en tal definición; sin embargo, no es así puesto que se trata de un tejido humano y, por tanto, en el ámbito de aplicación del Real Decreto-ley 9/2014. Por idéntica razón, debería contemplarse lo referente al concentrado de plaquetas (el PRP lo es) según lo dispuesto al efecto en el Real Decreto 1088/2005. Evidentemente, el uso no transfusional de este componente sanguíneo reviste particularidades que deben ser tenidas en consideración, pero dentro del marco normativo que le corresponde. De lo contrario, se corre el riesgo de adjudicar, por analogía, la categoría de medicamento a algo que no lo es.

Ciertamente, ya la propia definición del producto no es sencilla, o sí. El citado informe V1/23052013 define el PRP como «un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/ $\mu$ l)». En algunos centros de nuestro país donde se procesa PRP se ha adoptado la denominación de hemoderivado de uso no transfusional. Por su parte, el RD 1088/2005 en su capítulo III incorpora un apartado para los componentes plaquetarios, entre los cuales se encuentra la «unidad de plaquetas recuperadas: suspensión de plaquetas obtenidas mediante procesamiento de una unidad de sangre total». Por otro lado, la agencia mundial antidopaje incluye en 2011 entre las sustancias prohibidas algunos de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (VEGF, PDGF, IGF-1, FGF) pero no el plasma rico en plaquetas propiamente dicho.

The International Cellular Medical Society (2011) ha establecido una guía con recomendaciones dirigidas a estandarizar diversos aspectos asociados con el uso clínico del PRP: definición, procesamiento, seguridad, acreditación profesional, formación, infiltración, seguimiento (evaluación de resultados), registro de datos, indicaciones (relativas exclusivamente a tejidos músculo-esqueléticos y nervios) y contraindicaciones (absolutas y relativas).



#### 4.4.2.1. Necesidad de estandarización

Seguidamente, se resume el contenido del ya citado informe V1/23052013 de la AEMPS:

- Introducción:
  - Describe el papel de las plaquetas en el proceso reparador.
  - Define el PRP como un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal.
  - Cita las técnicas de procesamiento de tipo abierto o cerrado (utilizando equipos especialmente diseñados).
  - Aclara las diferentes denominaciones que se pueden utilizar, en función de las características del producto final obtenido:
    - PRGF: Preparado Rico en Factores de Crecimiento.
    - RPGF: Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento.
    - PRP: Plasma Rico en Plaquetas.
    - PPP: Plasma Pobre en Plaquetas.
    - LR-PRP: Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos.
    - LP-PRP: Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos.
  - Describe algunas de las sustancias bioactivas presentes en las plaquetas, indicando su función.
- Argumentación sobre la consideración del PRP como medicamento.
  - Este producto responde a la definición de medicamento que se encuentra en la Directiva 2001/83/CE, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano y la Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios.
  - Además, aclara que no cabe su consideración como medicamento de producción industrial ni tampoco medicamento de terapia avanzada.
  - Por todo ello, se puede utilizar para uso humano al amparo del artículo 5 de la Directiva 2001/83/CE, y las disposiciones legales que transponen dicha Directiva en nuestro país.
- Consecuencias de la consideración como medicamento:
  - Condiciones de prescripción:
    - El uso del PRP debe hacerse siempre sujeto a prescripción de médicos, odontólogos o podólogos, en el ámbito de sus competencias

respectivas, no siendo susceptible de ser prescrito por otro tipo de profesionales sanitarios o no sanitarios.

- Cabe considerarlo como un medicamento de dispensación bajo prescripción médica restringida, de utilización reservada a determinados medios especializados que, en todo caso, deberán contar con la autorización de las autoridades competentes en materia de inspección.
- Queda prohibida cualquier tipo de publicidad destinada al público en general.
- Garantía de calidad:
  - El facultativo prescriptor será el responsable de garantizar su cumplimiento (aunque el procesado y la obtención sea realizada por un tercero), asegurando una relación beneficio/riesgo positiva.
  - Si se va a utilizar durante el procesamiento la forma manual con técnica abierta, el método empleado deberá ser evaluado desde el punto de vista de calidad, mediante la oportuna inspección de la autoridad competente.
  - En el caso de uso sistemas desechables con técnica cerrada, el método empleado deberá seguir las instrucciones descritas en cada sistema comercial, no siendo imprescindible la inspección pero el sistema empleado deberá disponer de marcado CE.
- Garantía de eficacia:
  - Hay una falta de resultados de ensayos clínicos con la suficiente fiabilidad para extraer conclusiones sobre las indicaciones clínicas.
  - Queda pendiente la elaboración de un listado de indicaciones con datos debidamente contrastados, para lo cual se anima a la realización de experiencias clínicas controladas.
- Garantía de trazabilidad:
  - Real Decreto 1088/2005: es de aplicación el Capítulo V sobre donación autóloga y autotransfusión, en lo que corresponda. También lo es el Anexo II, punto C, donde constan los criterios de exclusión permanente y temporal. Igualmente, para cada paciente deben realizarse las pruebas analíticas que se indican en el Anexo III,

como requisitos de verificación para las donaciones de sangre total y componentes sanguíneos.

- La aplicación del PRP fuera de las condiciones establecidas en este documento solo se puede realizar en el contexto de un ensayo clínico autorizado por la AEMPS o como tratamiento individual autorizado por parte de la Agencia como uso compasivo.
- Garantía de farmacovigilancia:
  - Las reacciones adversas que se puedan producir serán informadas con celeridad según lo dispuesto en la ley 29/2006 en lo respecta a procedimientos de notificación.
- Garantía de información:
  - El paciente debe recibir antes de su uso una información mínima que le garantice que se cumple con los requisitos de calidad, los aspectos conocidos sobre la eficacia del PRP en la indicación concreta en la que va a ser utilizado, así como las ventajas de aplicar esta terapia sobre otras existentes, los riesgos conocidos y las formas en que cualquier posible reacción adversa puede ser notificada.
  - La Agencia, junto con las sociedades científicas implicadas, establecerá y publicará los criterios mínimos de información en cada una de las indicaciones y PRP revisados.

El desarrollo de nuestro estudio se ha planteado de acuerdo con lo dispuesto en este informe y en respuesta a la demanda que se hace desde el mismo para la aportación de datos clínicos suficientemente contrastados. Hay que tener presente que en nuestro entorno autonómico aún no se ha establecido el mecanismo de autorización sanitaria específica para esta actividad, en lo que a su uso clínico respecta. Por todo ello, para la consecución de nuestro estudio, un ensayo clínico en humanos, fue necesaria la obtención de las pertinentes autorizaciones por parte del comité de ética de la investigación con medicamentos y la AEMPS (Anexos 3 y 4).

#### **4.4.3. Tratamiento de zona donante**

El manejo de la zona donante tras la obtención del IPPA es de suma importancia en la recuperación del paciente con quemaduras que requieren tratamiento quirúrgico. Tradicionalmente, se han utilizado distintos apósitos para facilitar su curación y

proporcionar condiciones ideales que promuevan la reepitelización de la herida. Con el desarrollo tecnológico actual, se han creado nuevos apósitos que pretenden otorgar este medio óptimo que acelere la reepitelización, minimice el dolor y la estancia hospitalaria e incremente la comodidad del paciente (Masella y cols., 2013); sin embargo, aún no se ha logrado una cobertura ideal para este fin (Demirtas y cols., 2010).

Diversos apósitos son adecuados, yendo desde el uso clásico de gasas y apósitos no adherentes hasta los modernos apósitos de silicona, alginatos, películas e hidrofibras. Sin embargo, los regímenes de tratamiento varían considerablemente entre los centros y especialistas quirúrgicos. Las películas e hidrocoloides parecen más eficaces en términos de alivio del dolor y confort del paciente (Demirtas y cols., 2010; Brölmann y cols., 2013); no obstante, la mayoría de las revisiones destacan la necesidad de nuevos y mayores estudios para conseguir una evidencia científica convincente (Voineskos y cols., 2009).

Diversos estudios comparan los resultados de la utilización de distintos tipos de apósitos en función de los estándares de manejo de zona donante utilizados en las diversas instituciones hospitalarias, persiguiendo todos ellos el objetivo de encontrar un material de cobertura ideal (Masella y cols., 2013; Demirtas y cols., 2010; Brölmann y cols., 2013; Barnea y cols., 2004; Dornseifer y cols., 2011; Schulz y cols., 2015; Solanki y cols., 2012).

En el afán por conseguir este objetivo, no sólo para el manejo de las quemaduras y zonas donantes sino de las heridas en general, tanto crónicas como agudas, en los últimos años se ha tratado de avanzar en nuevas opciones tales como la aplicación tópica de plasma rico en plaquetas (Golebiewska y cols., 2015; Conde-Montero y cols., 2014; Carter y cols., 2011).

#### **4.4.4. Evaluación de la calidad de cicatrización mediante escalas**

Se han propuesto varias escalas para la evaluación clínica de la cicatrización postquemadura. Estas se basan en parámetros como la pigmentación, vascularización, grosor, elasticidad, altura o depresión, y en algunas se valoran los síntomas como el confort, prurito o dolor. Las escalas más utilizadas en los estudios clínicos son: Vancouver, VSS por sus siglas inglesas (*Vancouver Scar Scale*); evaluación de cicatrices de paciente y observador, POSAS (*Patient and Observer Scar Assessment Scale*);

analógica visual, VAS (*Visual Analog Scale*); Manchester para cicatrices, MSS (*Manchester Scar Scale*).

La VSS fue descrita por Sullivan en 1990 y es una de las más utilizadas en los estudios clínicos para la evaluación de cicatrices postquemadura. Evalúa 4 variables: la vascularización, el grosor o altura, la elasticidad y la pigmentación. No tiene en cuenta la percepción del paciente.

La escala visual analógica (Duncan y cols., 2006) está basada en la fotografía de la cicatriz y se evalúa la pigmentación, la vascularización, la aceptación y confort, además del contorno. Suma las puntuaciones individuales para da una puntuación única que va de excelente a pobre.

La escala POSAS (Draaijers y cols., 2004) incluye síntomas subjetivos y amplía los datos con respecto a la VSS. Consta de 2 escalas numéricas, la escala de valoración del paciente y la del observador. Evalúa vascularización, pigmentación, grosor, elasticidad, área afectada, e incorpora evaluaciones subjetivas de los pacientes como dolor y prurito.

La escala de Manchester fue propuesta por Beusang (1998) y difiere de la POSAS en que incluye una escala visual que se añade a los atributos individuales. Valora 7 parámetros: color, textura de la piel, relación con el borde de la piel, textura de la cicatriz, márgenes, tamaño y si es única o múltiple. Es poco utilizada en los estudios clínicos.

Estas escalas han sido validadas y aceptadas, sin embargo tienen una sensibilidad limitada. Tiene un alto componente subjetivo, por lo que deben ser aplicadas por observadores entrenados (Fearmonti y cols., 2010). Esta falta de objetividad estimula la búsqueda de métodos de evaluación basados en técnicas de evaluación más precisas.



# Objetivos





### **1. Objetivo principal**

Estudiar la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual.

### **2. Objetivos secundarios**

1. Efectuar un análisis crítico de la literatura publicada sobre el uso clínico del PRP.
2. Evaluar el efecto analgésico de los dos productos (PRP y PRGF).
3. Evaluar la incidencia de efectos adversos (especialmente para el caso de infecciones) asociados a cada uno de los dos productos (PRP y PRGF).
4. Determinar el potencial terapéutico de los dos productos (PRP y PRGF).
5. Cuantificar el coste que supone el modelo propuesto y analizarlo comparativamente con otras metodologías para el uso terapéutico propuesto, ya sean análogas o basadas en otros fundamentos.



# **Material y métodos**



## **1. Estudios preclínicos**

### **1.1. Protocolo de coagulación**

En nuestro caso, hemos estudiado el modelo más adecuado de preparación del producto para el uso propuesto. Con este fin y teniendo presente que la coagulación es un proceso cuya cinética se encuentra estrechamente ligada a la temperatura, evaluamos las siguientes variables, una vez añadido el cloruro cálcico:

- Temperatura de incubación:
  - 37°C.
  - Ambiente.
  - Intercambio de las condiciones de temperatura una vez consumada la coagulación.
- Tipo de almacenamiento:
  - Fresco.
  - Congelado a -80°C.
  - Congelado por inmersión directa en nitrógeno líquido.

La descongelación de los productos congelados se llevó a cabo por inmersión en baño termostático a 37°C.

Paralelamente, se desarrolló un procedimiento para incorporar en el producto coagulado una gasa, con la finalidad de proporcionar consistencia para facilitar su manejo.

## **2. Variables del estudio**

### **2.1. Selección de sujetos**

Se aplicaron los siguientes criterios para considerar la inclusión de los pacientes:

- Hombre o mujer con edad comprendida entre los 18 y los 70 años de edad en el momento del consentimiento.
- Capacidad suficiente para entender el contenido del formulario de consentimiento informado proporcionado y otorgar dicho consentimiento de forma libre y voluntaria (ningún sujeto debe ser obligado a participar en el ensayo), mediante la firma, por sí mismos o a través de sus familiares custodios o, cuando así requiera, representantes legales.

- Disponibilidad para cumplir con los requisitos del estudio clínico. Principalmente, en lo que se refiere a la pauta establecida para las visitas al centro sanitario los días señalados en el estudio para las curas y la recogida de documentación fotográfica hasta la regeneración total de la herida y disposición a realizar una visita de seguimiento al mes, 3, 6 y 12 meses.
- Presentando quemaduras de segundo o tercer grado susceptibles de recibir autoinjertos de piel con un tamaño mínimo de 112,5cm<sup>2</sup>.
- Lesión cutánea por quemadura de espesor parcial que afecte entre un 0,5% y un máximo de 10% de la superficie corporal.

En cuanto a los criterios de exclusión, se consideraron los siguientes:

- Lesión cutánea por quemadura que afecte a más del 10% de la superficie corporal.
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Enfermedades o trastornos que, en opinión del investigador, podrían interferir en la evaluación de la seguridad o la eficiencia.
- Enfermedad cutánea crónica o actualmente activa que el investigador considere que afectará de forma negativa a la regeneración dérmica.
- Historia de coagulopatía.
- Tratamiento crónico de corticosteroides u otro fármaco inmunosupresor.
- Sujetos inmunodeprimidos.
- Enfermedad infecciosa activa.
- Enfermedad sistémica que pudiera empeorar el pronóstico si se produce algún efecto adverso (pacientes con diabetes mal controlada que presenten retinopatía o vasculopatía periférica, hipertensión severa o enfermedad grave). Las descompensaciones puntuales de la diabetes ligadas al estrés inducido por la lesión o cirugía no se considerarán criterio de exclusión.

- Miembros del equipo investigador: investigadores, colaboradores, personal de enfermería, trabajadores del centro o cualquier otra persona directamente relacionada con el desarrollo del protocolo.

Incapacidad mental o barreras idiomáticas que impiden la adecuada comprensión del formulario de consentimiento informado o la cooperación o disposición necesarias para cumplir los procedimientos del estudio clínico.

## 2.2. Recurso terapéutico

En todos los casos, cada una de las tres zonas donantes de cada paciente (ver diseño del ensayo) se trató con PRP, PRGF o hidrocoloide.

## 2.3. Criterio de valoración principal

Tiempo de cicatrización total, objetivado por el observador. La unidad de medida utilizada fue el número de días de evolución.

## 2.4. Criterios de valoración secundarios

Durante el tiempo de estudio se analizaron otros parámetros:

- Dolor objetivado por el paciente durante el manejo de la zona donante de piel en las sucesivas visitas de seguimiento hasta la epitelización completa. Para su medición se utilizará la escala visual analógica (figura 4).

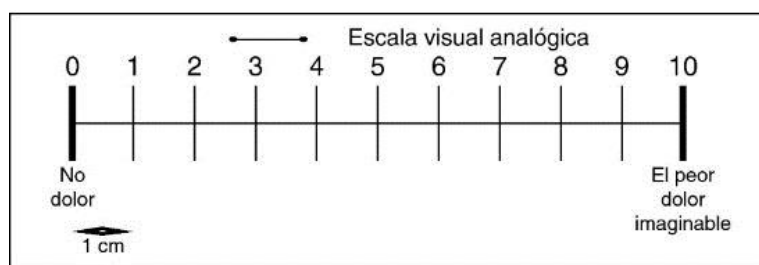


Figura 4. Escala visual analógica.

- Tasa de infección de las distintas opciones terapéuticas empleadas, determinada por el observador.

- Calidad de cicatrización:

- Escala de Vancouver. Los parámetros se expresaron sobre un total de 13 puntos (tabla 1).

Valor	Pigmentación
0	Color normal (parecido a piel cercana)
1	Hipopigmentada
2	Hiperpigmentada
Valor	Vascularidad
0	Normal
1	Rosa (flexible con mínima resistencia)
2	Roja (aumento significativo en el riego sanguíneo local)
3	Morada (excesivo riego sanguíneo local)
Valor	Flexibilidad Bandas (bridas, no limitan grado de movimiento)
0	Normal
1	Flexible
2	Cede
3	Firme
4	Adherencia
5	Contractura
Valor	Altura/Grosor
0	Normal
1	<2 mm
2	2-5 mm
3	>5 mm

Tabla 1. Escala de Vancouver.

- Escala del Observador y Paciente para Evaluación de Cicatrices. Esta incluye dos escalas, una realizada por el observador y otra por el paciente, valorando seis variables con un rango de puntuación de 1 a 10, siendo la menor puntuación indicativa de equivalencia a las cualidades de la piel normal. Por ello permite valorar el grado de satisfacción del paciente (tabla 2).



Componente para el observador														
	Piel normal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Peor cicatriz imaginable		Categorías
Vascularización														Pálido/Rosa/Rojo/Violáceo/Mixto
Pigmentación														Hipopigmentado/Hiperpigmentado/Mixto
Grosor														Grosso/Delgado
Relieve														Mayor/menor/Mixto
Flexibilidad														Flexible/Rígido/Mixto
Área de cicatriz vs herida inicial														Expansión/Contracción/Mixto
Componente para el paciente														
	No, sin síntomas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Peor síntoma posible		
¿La cicatriz duele?														
¿La cicatriz pica?														
	No, como la piel normal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Si, muy diferente		
¿Es el color de la cicatriz diferente?														
¿Es la cicatriz más rígida?														
¿Es el grosor de la cicatriz diferente?														
¿Es la cicatriz irregular?														

Tabla 2. Escala del Observador y Paciente para Evaluación de Cicatrices.

- Cuantificación económica del gasto sanitario que supone el tratamiento con estos productos frente a otras alternativas terapéuticas. La unidad de medida será euros.
- Variables hematológicas (recuentos, hematocrito, volumen celular, etc.) de la sangre extraída para la producción de PRP y PRGF mediante la utilización de un contador celular automático y concentración de los factores de crecimiento PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, EGF y VEGF de las muestras de PRP de cada paciente.

### **3. Diseño del estudio**

Se planteó como un ensayo clínico aleatorizado, con evaluación ciega por terceros y en el que cada paciente actúa como su propio control.

#### **3.1. Enmascaramiento**

La localización de las zonas tratadas con PRP, PRGF o tratamiento control ha sido desconocida para los sujetos, evaluadores y el resto del personal del estudio durante la duración del mismo, a excepción del cirujano que llevó a cabo la intervención.

#### **3.2. Aleatorización**

La elección de la zona donante de piel estuvo sujeta a las características y localización de la quemadura; no obstante, y siendo así en la práctica clínica habitual, se eligió la cara anterior del muslo siempre que fue posible.

La asignación del tratamiento a cada una de las zonas donantes fue aleatoria, de forma que cada una podía ser destinada a tratamiento habitual, PRP o PRGF. Dicha asignación se llevó a cabo mediante una secuencia de aleatorización oculta y proporcionada al cirujano que llevó a cabo la intervención antes del procedimiento por una persona ajena al estudio designada para dicho fin. El departamento de bioestadística del IIS La Fe generó un listado de aleatorización con la ubicación de cada uno de los tratamientos para cada uno de los pacientes.

### 3.3. Descripción del tratamiento

#### 3.3.1. Diagrama del ensayo clínico

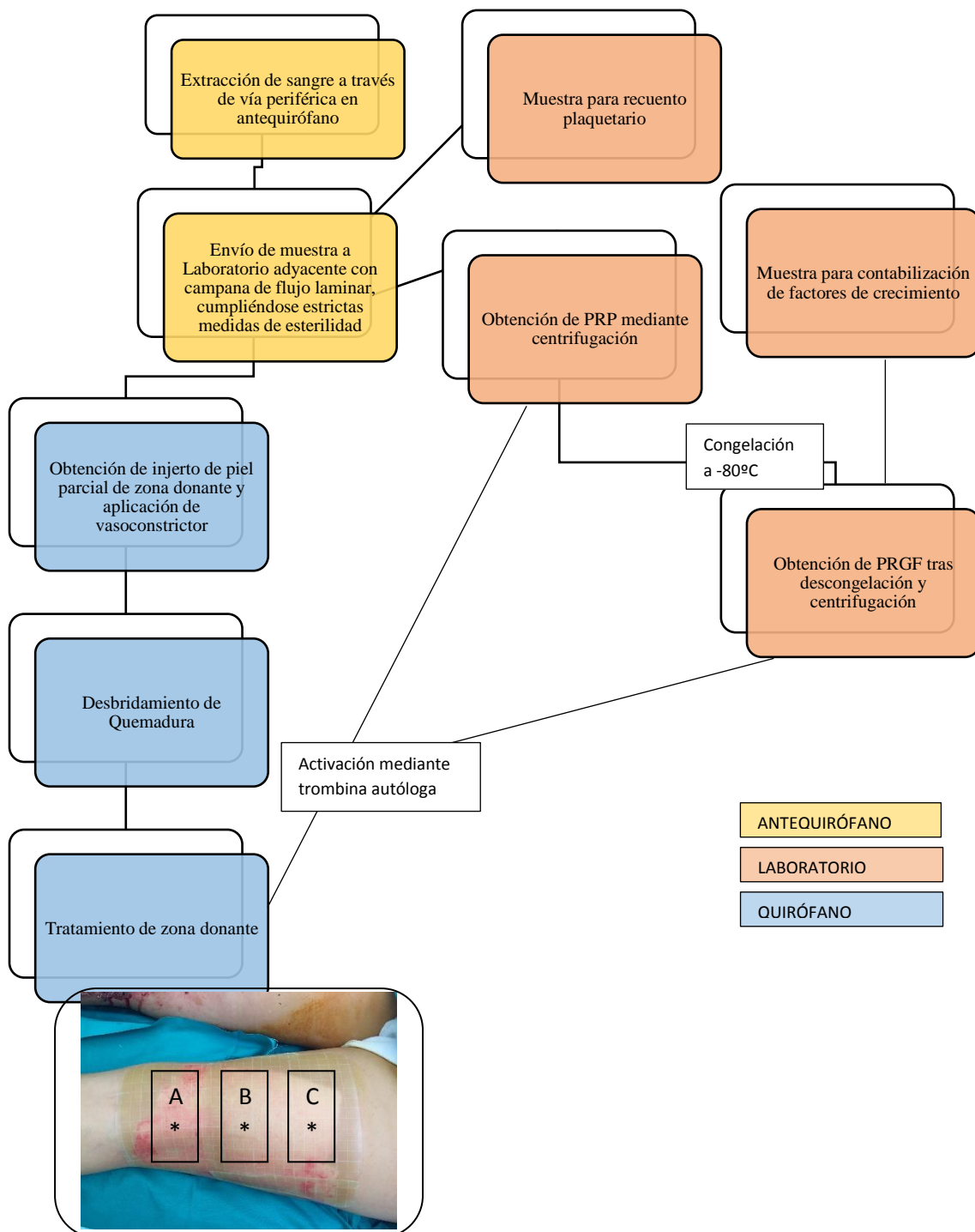


Figura 5. Diagrama del ensayo clínico.

\* Zonas de tratamiento aleatorizadas. A: apósito primario; B: PRP + apósito primario; C: PRGF + apósito primario.

Nota: el laboratorio adyacente donde se recibe y procesa la muestra es el Banco de sangre del Hospital la Fe, siguiendo el protocolo del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

### 3.3.2. Tratamiento

La obtención de PRP y PRGF se llevó a cabo durante el tiempo necesario para realizar el desbridamiento quirúrgico de la quemadura y su cobertura mediante IPPA obtenido de la zona donante, no suponiendo ningún incremento añadido al tiempo de tratamiento habitual de esta patología. El PRP y PRGF se etiquetaron de acuerdo a la legislación vigente, se incluyó en la etiqueta la identificación del donante y la advertencia «solo para uso autólogo».

#### 3.3.2.1. Material utilizado con cada paciente

Seguidamente se detalla el aparataje y material fungible que se empleó para obtener el producto terapéutico:

- 6 Tubos Vacuette® de 9ml con anticoagulante ACD-B.
- Centrifugadora Heraeus Multifuge 4KR (figura 6).



Figura 6. Centrifugadora Heraeus Multifuge 4KR.

- Campana de flujo laminar (figura 7).



Figura 7. Campana de flujo laminar.

- Baño de agua PolyScience (figura 8).



Figura 8. Baño de agua PolyScience.

- Pipetas Pasteur estéril de 3ml (figura 9).
- Micropipeta con puntas estériles (figura 9).
- Gradilla con (figura 9):
  - Tubo de 1ml de  $\text{CaCl}_2$
  - 6 criotubos de 1ml (5 para congelar y 1 para medir la concentración de plaquetas de la muestra).
  - 5 tubos de 10ml seco (sin anticoagulante).

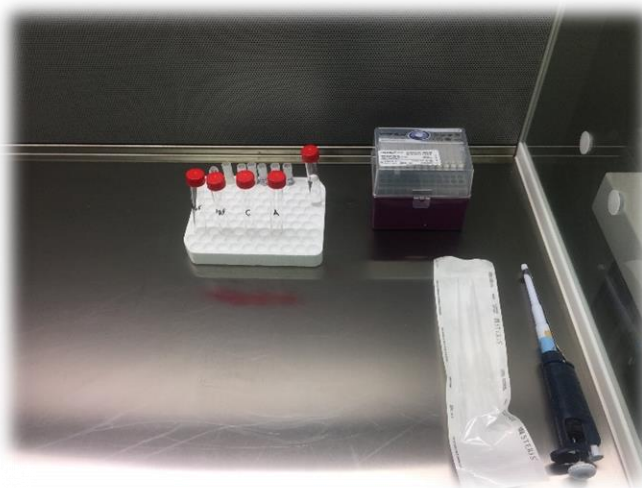


Figura 9. Material utilizado durante el procesamiento de las muestras.

- Paño estéril.
- Guantes estériles.
- 2 pinzas estériles.

- 2 jeringas estériles de 2,5ml.
- 1 atomizador (figura 10).



Figura 10. Atomizador.

- Apósito hidrocoloide Comfeel® Plus Transparent (Coloplast S.L.).

### 3.3.2.2. Evaluación del donante

El PRP y PRGF obtenido fueron utilizados exclusivamente para uso autólogo. Para cada paciente se realizaron antes de la extracción de sangre las siguientes pruebas analíticas:

- Grupo ABO y Rh.
- Pruebas para detección de agentes infecciosos:
  - Sífilis: pruebas serológicas.
  - Hepatitis B: HBsAg. Cuando el HBsAg sea negativo y el anti-HBc sea positivo, se realizarán pruebas adicionales para determinar si el producto puede utilizarse, pruebas de amplificación genómica del ácido nucleico (NAT).
  - Hepatitis C: anti-VHC y NAT.
  - VIH 1/2: anti-VIH y NAT.

### 3.3.2.3. Extracción de la sangre

En antequirófano, utilizando un sistema convencional para este propósito, se obtuvieron 6 tubos de 9ml de sangre, que fueron etiquetados con los datos del paciente. El volumen de sangre obtenido se ajustó a las necesidades para que el producto final cubriera la totalidad de la zona donante a tratar, aproximadamente 54ml. En cuanto al transporte

desde el antequirófano hasta el banco de sangre del Hospital la Fe, los tubos fueron transportados en una gradilla dentro de una caja a temperatura ambiente.

#### **3.3.2.4. Protocolo de procesamiento y aplicación**

La manipulación de la sangre y los productos resultantes se realizó en exposición abierta, en el banco de sangre del Hospital la Fe. De acuerdo con ello, y siguiendo las indicaciones de la AEMPS, se realizó dicho procesamiento en el ambiente aséptico proporcionado por una cabina de flujo laminar, garantizando un entorno medioambiental con una calidad grado A. Este dispositivo se encuentra en un laboratorio debidamente autorizado por la *Conselleria de Sanitat Universal y Salut Pública* para la manipulación de hemoderivados. Para la separación de las plaquetas se utilizó la centrifugación.

Existe una gran disparidad de criterios a la hora de establecer las condiciones de velocidad (FCR) y tiempo. Debido a ello y para evitar la generación de un número de variables que impidiera la realización del proyecto, se implementó una adaptación del protocolo desarrollado en el Centro de Transfusión de Valencia para este fin. De acuerdo con ello, la sangre fue sometida a un proceso de centrifugación utilizando un cabezal basculante, con el fin de generar un gradiente en función de la densidad de los diferentes componentes celulares. Las condiciones de centrifugación vienen definidas por los siguientes parámetros: FCR (400g), tiempo (7min), temperatura (22°C), aceleración (alta), freno (mínimo). Se escogió un sistema de obtención de PRP con una sola centrifugación para minimizar la pérdida de sustancias bioactivas en el sobrenadante (que puede producirse por activación de la desgranulación plaquetaria, con la consiguiente liberación al sobrenadante, que se desecha en parte en los sistemas con doble centrifugación).

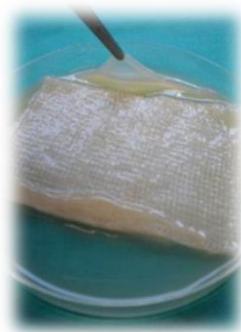
Con este procedimiento, la mayoría de las plaquetas quedan suspendidas en el plasma sobrenadante, que se retiró del recipiente con mucho cuidado para evitar turbulencias. Una vez obtenido el PRP de todos los tubos, se agrupó y se dividió en varias alícuotas:

- Un tubo con 0,5ml para hematimetría.
- Un tubo con 1,75 ml se almacenó a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) hasta su uso como PRP.
- Un tubo con 2ml, al que se añadió CaCl<sub>2</sub> 10% en una proporción 1:20 para inducir la coagulación mediante su incubación a 37°C en el baño de agua, cuyo

sobrenadante se utilizó posteriormente como activador (fundamentalmente por el aporte de trombina), deshaciendo el coágulo mecánicamente con unas pinzas.

- Un tubo con 6,75ml se sometió a un doble ciclo de congelación/descongelación a -80°C y se centrifugó a 4000g 5min para eliminar material residual. Una vez descongelado, se preparó 1 tubo con 1,75ml para uso como PRGF. El resto se dividió en 5 criotubos que se almacenaron a -80°C para posterior determinación de la concentración de factores de crecimiento.

En estrecha relación con el apartado 1.1 de Material y métodos y 3 de Resultados, vista la mayor fragilidad de las muestras congeladas/descongeladas, se diseñó un modelo que facilita la manipulación del producto, manteniendo su integridad y, además, procurando minimizar la pérdida de exudado del coágulo antes de la aplicación (para evitar la pérdida de factores de crecimiento con el líquido). La opción de generar el coágulo después de empapar una gasa con el PRP (figura 11) se descartó por el riesgo de producir adherencias sobre el lecho cruento.



*Figura 11. Gasa bañada en PRP coagulado.*

Una vez procesado y preparado el tratamiento de estudio, los tres tubos con 1,75ml de PRP, 1,75ml de PRGF y 1,75ml de activador (figura 12), fueron transportados nuevamente a temperatura ambiente al quirófano, donde se procedió a su aplicación directamente sobre cada área de tratamiento del paciente mediante jeringas estériles de 2,5ml con atomizador, procurando limitar el alcance del rociado del producto únicamente sobre el área de tratamiento seleccionada (figura 13). Cada jeringa estéril se cargó con 0,5ml de activador y 1,5ml de producto, PRP o PRGF en función del área a tratar.



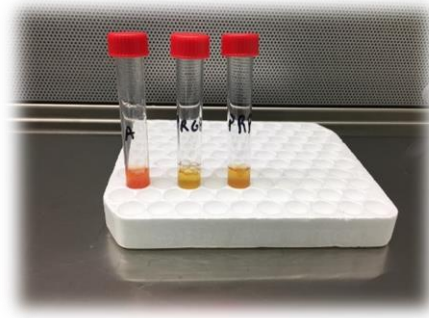


Figura 12. Izquierda-derecha: activador, PRGF y PRP.

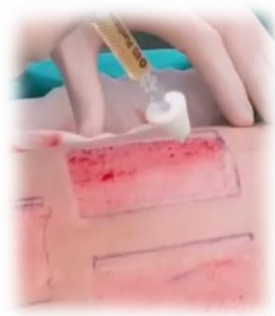


Figura 13. Aplicación del tratamiento individualizado a cada zona mediante atomizador.

### 3.3.2.5. Protocolo quirúrgico

Todos los pacientes del estudio fueron sometidos a intervención quirúrgica programada de desbridamiento de su quemadura y cobertura mediante injerto de piel parcial obtenido mediante dermatomo eléctrico. Cada paciente constituyó su propio control. Para el estudio se utilizó un área donante de  $105\text{cm}^2$  dividida en 3 zonas de tratamiento de 7cm largo x 5cm de ancho (figura 14), totalmente diferenciadas y separadas por piel integra para evitar posibles interferencias entre ellas. En cada zona se aplicó una de las distintas opciones terapéuticas estudiadas siguiendo el esquema de aleatorización proporcionado por el departamento de bioestadística:

1. Tratamiento mediante apósito primario tipo hidrocoloide.
2. PRP + apósito primario tipo hidrocoloide.
3. PRGF + apósito primario tipo hidrocoloide.

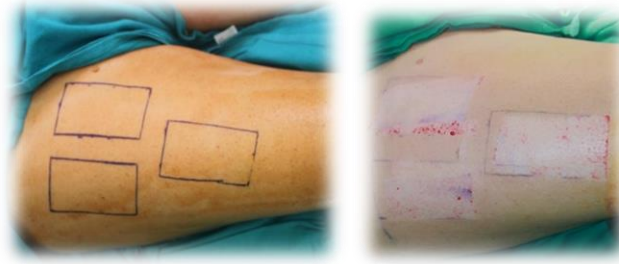


Figura 14. Izquierda: marcación zona donante. Derecha: herida tras obtención de injerto de piel parcial.

El resto de zona donante del paciente (si la hubo) estuvo fuera del objetivo del estudio y se trató según la forma habitual. Toda la zona donante se cubrió con apósito secundario consistente en compresas y vendaje tipo *crepé*.

El apósito primario utilizado fue el hidrocoloide Comfeel® Plus Transparent (Coloplast S.L.). Su composición consiste en partículas de carboximetilcelulosa (CMC) sódica absorbentes de humedad que se encuentran encapsuladas en una masa sintética, elástica y pegajosa. Presenta una cubierta pelicular de poliuretano semipermeable. Su esterilización ha sido llevada a cabo mediante radiación y entre sus indicaciones encontramos el tratamiento de heridas crónicas no exudativas o de baja exudación y heridas agudas superficiales en las etapas finales de cicatrización. Además este apósito puede aplicarse en quemaduras superficiales, quemaduras superficiales de espesor parcial, sitios donantes, heridas posoperatorias y excoriaciones cutáneas. Según ficha técnica, puede dejarse colocado sobre la herida durante un máximo de 7 días, según las características específicas de la herida.

#### 3.4. Cuantificación factores de crecimiento

Para la cuantificación de los factores de crecimiento de las muestras obtenidas de cada paciente se utilizó el *kit* Custom 5-plex LEGENDplex™ panel (Analytes: EGF, FGF-basic, PDGF-BB, Free active TGF- $\beta$ 1, VEGF) (código de producto 92919). Este *kit* permite la cuantificación de estos factores de forma simultánea en las muestras biológicas mediante la utilización de citometría de flujo.

#### 3.5. Conservación de muestras

Las muestras obtenidas de cada paciente del estudio fueron conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  (en congelador con sistema de alarma acústica y visual) en el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

### 3.6. Cronograma del estudio

Punto temporal	Visita Selección	Visita Inclusión Cirugía	Periodo de evaluación	Seguimiento	Seguimiento a largo plazo	Seguimiento a largo plazo
Procedimiento		Día 0	Días 3, 5, 8, 11, 14,...,29 ( $\pm 2$ días)	Un mes tras intervención ( $\pm 14$ días)	Tres meses tras intervención ( $\pm 14$ días)	Seis meses tras intervención ( $\pm 14$ días)
Consentimiento informado	+					
Criterios de inclusión y exclusión	+					
Antecedentes y tratamiento habitual	+					
Medicación concomitante	+		+			
Analítica	+	+				
Serología	+					
Datos demográficos	+					
Test de embarazo	+					
Aleatorización		+				
Extracción de la muestra y procesamiento		+				
Aplicación de PRP y PRGF		+				
Evaluación de la eficacia			+			
Evaluación de eficiencia			+	+	+	+
Evaluación dolor (escala EVA)			+			
Evaluación POSAS y VSS				+	+	+

Tabla 3. Calendario del estudio.

### **3.6.1. Visita de selección**

Durante la selección se obtuvieron los siguientes datos:

- Firma del consentimiento informado.
- Revisión de criterios de inclusión y exclusión
- Antecedentes médicos de hasta cinco años antes del inicio del estudio y sucesos médicos importantes.
- Documentación de la medicación habitual tomada por el paciente.
- Parámetros analíticos de hematología y hemostasia
- Datos demográficos (sexo, edad, raza, tipo de piel según la clasificación de Fitzpatrick I-VI).
- Prueba de embarazo en orina en el caso de mujeres que pudieran estar embarazadas.

### **3.6.2. Periodo del estudio**

Seguidamente, se detallan los contenidos de cada una de las etapas incluidas en la parametrización del estudio:

- Cirugía (día 0):
    - Comprobación de los criterios de inclusión y exclusión.
    - Comprobación de prueba de embarazo negativa de las mujeres con esta posibilidad.
    - Selección de la zona de estudio por criterio del cirujano principal y aleatorización de la parte que va a recibir el PRP, PRGF o tratamiento habitual.
    - Obtención del IPPA, desbridamiento de la quemadura y su cobertura.
    - Aplicación de PRP, PRGF y tratamiento habitual según aleatorización.
- En este día también se cuantificaron las variables hematológicas de cada muestra.
- Curas (días 3, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 y  $29 \pm 2$  días):
    - Durante este periodo se realizaron las evaluaciones de eficacia del tratamiento, mediante la valoración de la tasa de cicatrización, la tasa de infección y el dolor durante las curas.

- En la visita del 3<sup>er</sup> día postoperatorio solo se realizó cambio de apósitos secundarios. En las sucesivas visitas se llevaron a cabo cambio de apósitos primarios y secundarios, permitiendo así la evaluación de la tasa de epitelización.
- El final del periodo de evaluación se definió como el día en el que se observó por primera vez una cicatrización completa de la herida. A partir de ese momento no se realizaron más visitas de evaluación hasta la primera visita de seguimiento el día 30 postoperatorio.
- Valoración de la calidad de cicatrización (1, 3 y 6 meses tras la intervención quirúrgica):
  - En cada una de las visitas con los pacientes durante este periodo se llevó a cabo una evaluación subjetiva de la calidad de cicatrización de cada zona de tratamiento del paciente mediante las escalas VSS y POSAS.

### **3.7. Evaluaciones**

Aunque el estudio es abierto para el cirujano principal que llevó a cabo la intervención (puesto que conocía la localización de los tratamientos), la evaluación de la eficacia, seguridad y el resto de criterios de valoración se realizaron de forma enmascarada, tratándose de una evaluación imparcial con respecto al tipo de régimen terapéutico.

Para evitar sesgos, se designó a un único evaluador para cada paciente quien llevó a cabo las evaluaciones durante todo el periodo de estudio.

La eficacia del tratamiento estuvo determinada por la magnitud del beneficio obtenido en términos de promoción de la cicatrización, medida mediante:

- Tiempo de cicatrización total en días, objetivado por el observador. Esta evaluación se realizó por el evaluador durante el periodo de curas (hasta la epitelización total).
- Paralelamente, durante el periodo anterior, también se llevaron a cabo las valoraciones de:
  - Dolor: objetivado por el paciente durante el manejo de la zona donante de piel en las sucesivas visitas de seguimiento hasta la epitelización completa, para su medición se utilizó la escala visual analógica.

- Tasa de infección: de las distintas opciones terapéuticas empleadas, objetivadas por el observador.

La calidad de la cicatriz resultante en cada zona de tratamiento se cuantificó mediante:

- Escala de Vancouver.
- Escala del Observador y Paciente para Evaluación de Cicatrices.

En cuanto a los parámetros biológicos relacionados con el tipo de producto (PRP Y PRGF):

- La cuantificación de las variables hematológicas de cada paciente se llevó a cabo el día 0 de cirugía, mediante una muestra obtenida de la sangre extraída para el procesamiento del PRP y PRGF.
- La determinación de la concentración de los factores de crecimiento se realizó una vez finalizado el proceso de reclutamiento, mediante la cuantificación de estos en las muestras congeladas de cada uno de los pacientes del estudio que fueron almacenadas a lo largo del proceso de reclutamiento, utilizando *kits* de anticuerpos diseñados con dicho fin.

#### **4. Análisis estadístico**

En cuanto al tamaño muestral necesario, se ha calculado que para un valor estimado de la diferencia media en tiempo de cicatrización entre el tratamiento habitual y cualquiera de los dos nuevos de 2 días, con una desviación típica de 3 días en el tiempo medio de cicatrización, sería conveniente conseguir datos de unos 32 pacientes para alcanzar una potencia estadística del 80% tomando una significación  $\alpha=0,05$ . Asumiendo un 10% de pérdidas el tamaño muestral final sería de 35 pacientes.

Los datos se han resumido mediante media ( $\pm$ desviación estándar) y mediana (primer y tercer cuartil) en el caso de variables continuas y mediante frecuencias relativas y absolutas en el caso de variables categóricas.

La asociación entre el tiempo de cicatrización y el tratamiento se ha analizado mediante un modelo de regresión de Cox.

Los resultados se han representado mediante curvas de supervivencia, considerándose la cicatrización completa como el evento final. Para estudiar la asociación en distintos instantes temporales entre el tratamiento y el grado de cicatrización, el valor de POSAS, el valor de VSS y el valor de EVA, se han utilizado modelos de regresión ordinal

incluyendo el individuo como factor aleatorio para tener en cuenta la no independencia de las observaciones.

Adicionalmente, se estimó una matriz de correlaciones de Spearman para estudiar las asociaciones entre las variables del paciente y las variables referentes a su muestra de PRP.

Finalmente, se estudió la relación entre las plaquetas del paciente en el momento de la intervención y las variables factor de concentración plaquetaria, PDGF, EGF, VEGF y FGF, mediante modelos de regresión lineal.

Todos los análisis estadísticos, así como las gráficas correspondientes, se realizaron mediante el software R (versión 3.5.2) y los paquetes lme4 (versión 1.1-19), clickR (versión 0.4.26), ordinal (versión 2018.8-25) y brms (versión 2.6.0). Los p-valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## **5. Principios éticos y autorización**

Este estudio ha sido realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki sobre principios éticos para la investigación médica en sujetos humanos. Además, se ha llevado a cabo de acuerdo al protocolo de BPC, las directrices de la conferencia internacional sobre armonización y los requisitos normativos para las instituciones participantes.

El protocolo del estudio ha sido revisado por un comité ético de investigación clínica y con medicamentos, objetivando que los beneficios del estudio están en proporción con los riesgos. Ha sido elaborado respetándose los derechos y el bienestar de los sujetos, y se ha desarrollado por personas científica y médicamente cualificadas.

Finalmente, su desarrollo como ensayo clínico ha sido autorizado por la AEMPS.

## **6. Revisión bibliográfica**

Para la recuperación de información relacionada con el tema de la presente tesis, se han interrogado las bases de datos: PubMed<sup>®</sup> (NLM), Google Scholar<sup>®</sup> y Cochrane Library<sup>®</sup>.

La estrategia de búsqueda se diseñó, en una primera fase, con el objetivo de encontrar referencias sobre el uso clínico, en general, de los productos analizados en este estudio. Para ello, se utilizaron las siguientes palabras clave: *platelet-rich plasma*, *growth factor-rich plasma*, *platelet lysate*, *wound healing*. Los artículos se agruparon por especialidades

y/o indicaciones clínicas. Dentro de cada grupo se diferenciaron aquellos que correspondían a revisiones, así como los que estaban basados en ensayos clínicos con humanos.

Seguidamente, para proporcionar mayor precisión, a las tres primeras palabras clave del apartado anterior se añadieron *burn* y *donor site*.

Las referencias bibliográficas se obtuvieron finalmente mediante las oportunas combinaciones de los términos seleccionados con los operadores booleanos *and* y *or*.



# Resultados



## 1. Análisis crítico de la literatura publicada

A continuación, se comentan aquellos aspectos relacionados con la obtención de PRP o PRGF, así como los relativos a su uso clínico, que pueden condicionar su eficacia. Este análisis se aborda tanto desde la perspectiva de los trabajos de los diferentes autores analizados como de la experiencia propia y en base a consideraciones apoyadas con datos procedentes del procesamiento de sangre para obtención del PRP en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

### 1.1. Centrifugación

La fuerza gravitatoria de la tierra es suficiente para separar muchos tipos de partículas. Así, un tubo de sangre anticoagulada que permanezca en reposo sobre un banco se separará finalmente en sus componentes (plasma, plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos) en función de sus diferentes densidades. Para acelerar la sedimentación, el efecto de la gravedad se puede amplificar utilizando la fuerza centrífuga (FC) generada por una máquina con un eje de rotación. El factor por el que incrementa la fuerza de la gravedad (g) es lo que se denomina fuerza centrífuga relativa (FCR), que viene definida por la formula siguiente:

$$FCR = (1,118 \times 10^{-5}) r v^2$$

Siendo: r, el radio del rotor de la centrífuga en cm; y v, la velocidad de rotación en rpm.

El movimiento de una partícula durante el proceso de centrifugación es el resultado de una serie de parámetros que actúan sobre dicha partícula: la fuerza de la gravedad, en dirección hacia el eje terrestre; la FC, en la dirección del radio de rotación; el empuje, según el principio de Arquímedes; y, además, la resistencia al movimiento, de acuerdo con la ley de Stokes (esta resistencia es directamente proporcional al radio de la partícula, a su velocidad y al coeficiente de viscosidad del medio).

Teniendo en cuenta que la centrifugación es un método habitualmente utilizado en los centros de transfusión para separar componentes sanguíneos, es lógico que sea este el sistema de elección para el caso del PRP.

La separación de los componentes celulares de la sangre se puede lograr mediante un proceso conocido como centrifugación diferencial. La tasa de sedimentación de cada uno

de ellos depende de su tamaño y de la diferencia entre la densidad del elemento y la de la solución. Lógicamente, de acuerdo con lo expresado anteriormente, la distancia hasta el eje de giro incidirá directamente en la FCR aplicada en cada punto (Pintucci y cols., 2002; Go y cols., 2003). Cuanto mayor es el radio de giro, mayor es la FC que actúa sobre la partícula.

La centrifugación se puede realizar utilizando dispositivos con rotor de ángulo fijo (RAF; generalmente, con un ángulo de  $45^\circ$  con el eje de rotación) o bien rotor de ángulo variable o basculante (RAV; en reposo, se encuentra en paralelo con el eje de rotación y, en funcionamiento, alcanza  $90^\circ$ ) (figura 15).

Con el RAV, el sedimento se concentra en el extremo final del tubo, mientras que con el RAF se sitúa ligeramente desplazado (figura 15).

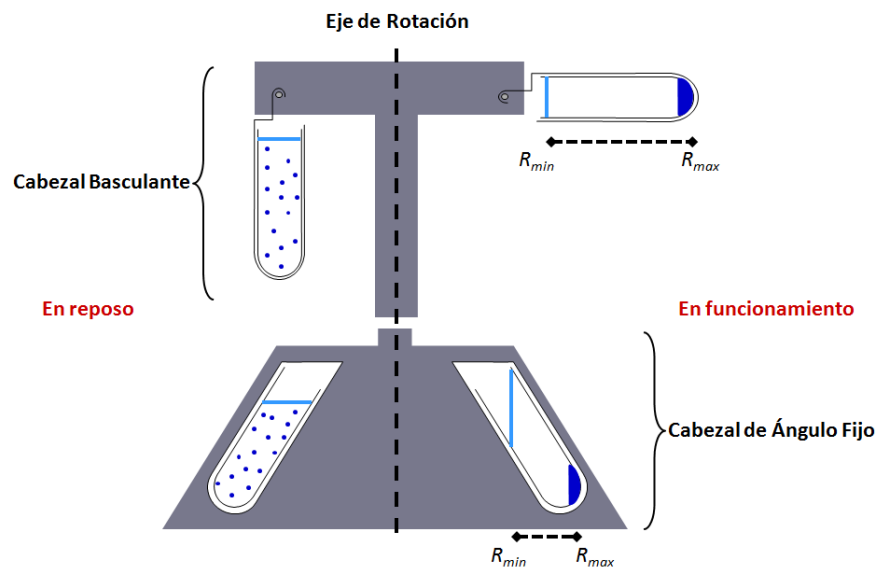


Figura 15. Esquema de centrifuga en reposo (izquierda) y en funcionamiento (derecha).

En el caso del RAF, su consistencia más rígida le permite soportar fuerzas gravitacionales mucho más elevadas. En el caso del PRP no se utilizan valores muy elevados.

La separación de partículas por tamaño y densidad es más eficaz con el RAV, ya que la longitud entre el radio máximo ( $R_{max}$ ) y el radio mínimo ( $R_{min}$ ) es mayor (figura 15), lo que facilita la estratificación en función del tamaño y la densidad específica de las diferentes partículas presentes en la suspensión. Para obtener sedimentos en el fondo del tubo, es más eficaz el RAF; sin embargo, para el caso de gradientes, la reorientación que

experimenta la posición del líquido durante el proceso de desaceleración puede alterar el resultado final.

La eficacia de esta metodología tiene su fundamento en las diferentes densidades de los elementos formes de la sangre (figuras 16 y 17).

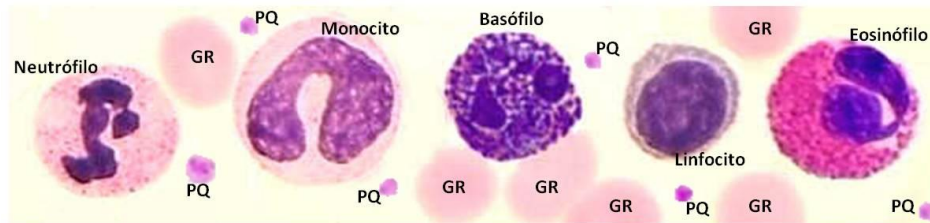


Figura 16. Elementos formes de la sangre.

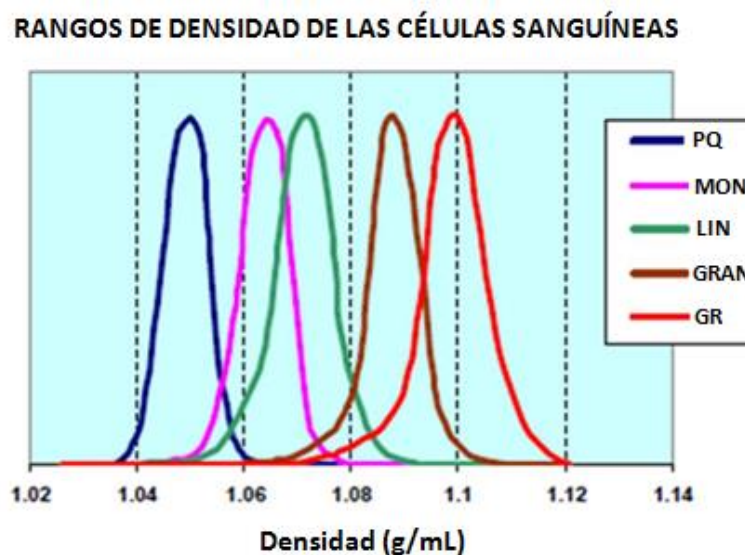


Figura 17. Rangos de densidad de las células sanguíneas.

La simple centrifugación de la sangre total (ST) con un régimen de revoluciones alto (A) (Figura 18.A) va a permitir una estratificación en la que se pueden distinguir 3 niveles: superior, que corresponde al plasma (PL); medio, donde se encuentra la capa leucoplaquetar (CLP), que incorpora la mayor parte de las plaquetas y glóbulos blancos; e inferior, aglutinando los glóbulos rojos (GR) (Figura 19). De este modo, se consigue un máximo rendimiento en la obtención de los tres componentes sanguíneos para uso clínico (plasma, plaquetas y glóbulos rojos). No obstante, en el caso de las plaquetas, también se recupera con la CLP un buen número de hematíes, durante el proceso de separación de los componentes. Por esta razón, se hace necesaria una segunda centrifugación.

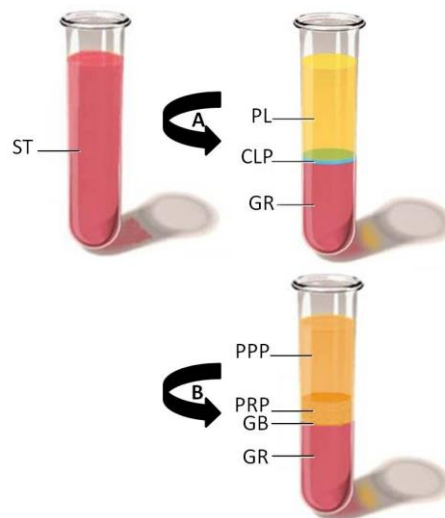


Figura 18. (A) Estratificación de la muestra sanguínea tras centrifugación a régimen de revoluciones alto. (B) Régimen de revoluciones bajo.

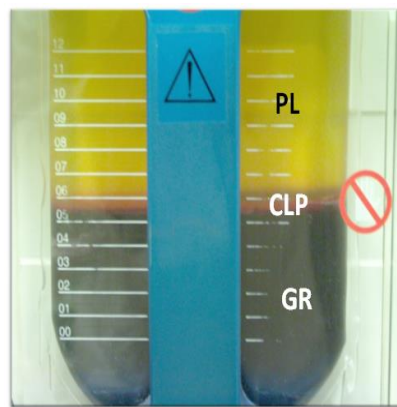


Figura 19 Estratificación de la muestra sanguínea tras la centrifugación.

El efecto «colchón» que proporcionan los hematíes reduce el estrés sobre las plaquetas. Sin embargo, si con la segunda centrifugación se pretende compactar las plaquetas en el fondo del tubo, el riesgo de activación se incrementa significativamente. Por esta razón, algunas de los sistemas de procesamiento automatizado para obtener PRP utilizan un gel que, además de facilitar la separación, reduce el riesgo de activación durante el procesamiento.

Puesto que, en el caso del PRP, no se pretende una máxima eficacia en la recuperación de todos los componentes (desechándose parte del plasma, la mayoría de los glóbulos blancos y los glóbulos rojos), se puede obtener el producto deseado con una sola centrifugación, con un régimen de revoluciones bajo (figura 18. B). Al desplazarse los glóbulos rojos hacia el fondo del recipiente, desplazan un volumen de líquido

sobrenadante equivalente a su peso; mientras que las plaquetas, más pequeñas y con menor densidad, permanecen en suspensión (favoreciendo su concentración por encima de los glóbulos rojos ya sedimentados). De este modo, en la parte superior queda un PPP, con estos elementos en una concentración significativamente inferior a la basal. Luego, inmediatamente por encima de los glóbulos rojos se encuentra una fracción de plasma, con aspecto muy turbio, que contiene una proporción importante de la población plaquetaria, es el PRP. Además, suele contener también glóbulos blancos, especialmente linfocitos (GB); añadiéndose granulocitos y monocitos conforme nos adentramos en el concentrado de hematíes, que queda debajo (GR). En este caso, algunos autores proponen una segunda centrifugación del sobrenadante (PPP+PRP) para luego retirar unas dos terceras partes de sobrenadante (o incluso más) y así incrementar la concentración plaquetaria. No obstante, como ya se ha comentado anteriormente, esta práctica aumenta el riesgo de activación durante el procesamiento (lo que supondría una pérdida de rendimiento, al liberarse el contenido de los gránulos al sobrenadante, que luego será retirado en su mayoría).

Seguidamente se citan algunas consideraciones apoyadas con datos procedentes del procesamiento de sangre para obtención del PRP en el Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

Especialmente si se opta por un protocolo con una sola centrifugación, hay que prestar atención especial a lo que sucede en la mitad superior de la sangre, ya que no se pretende sedimentar en el fondo del tubo el producto final. Consecuentemente, el resultado puede estar condicionado por el hematocrito del paciente. Cuanto mayor sea el hematocrito, el volumen de plasma sobrenadante (PRP + PPP) respecto del de sangre total será menor (figura 20) y, por lo tanto, el radio de centrifugación aplicado sobre la fracción correspondiente (tomando como límite la altura alcanzada por los hematíes) será variable en función del volumen ocupado por estos (es decir, el hematocrito).

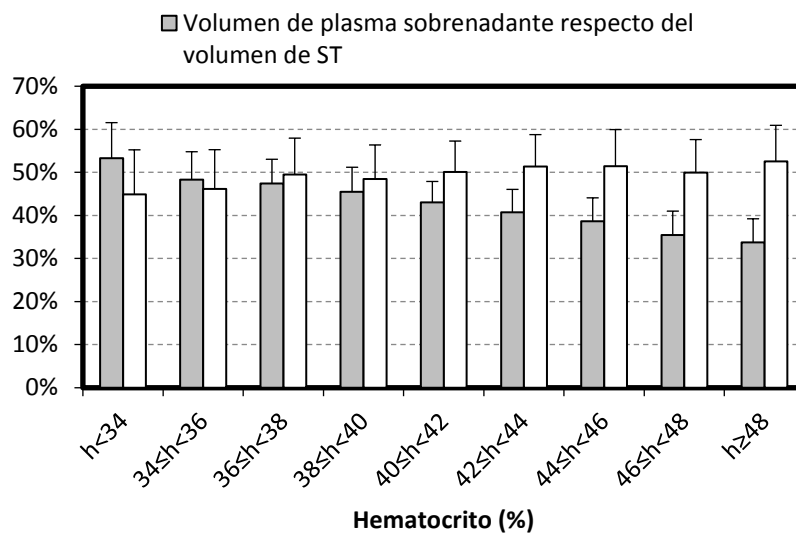


Figura 20. Efecto del hematocrito sobre el rendimiento utilizando un único procedimiento de centrifugación, aplicando un régimen bajo de fuerza centrífuga. Barra gris: proporción que representa el volumen de plasma sobrenadante (PRP + PPP) respecto del volumen de sangre total (ST). Barra blanca: rendimiento de la recuperación de plaquetas en el PRP respecto del contenido plaquetario en la muestra de sangre total (ST).

De acuerdo con ello, se podría deducir que para un mayor radio aplicado sobre el límite de la capa de los glóbulos rojos compactados (es decir, menor hematocrito) y, por lo tanto, mayor incremento de la fuerza gravitacional, la concentración de plaquetas en la fracción de plasma más próxima a los glóbulos rojos debería ser mayor. Sin embargo, analizando el factor de concentración plaquetaria en el PRP respecto de la basal (figura 21), incluso el valor medio resulta algo más elevado en el caso de mayor hematocrito. Esta aparente contradicción puede explicarse porque el volumen de plasma sobrenadante (PRP + PPP), como ya se ha mostrado (figura 20), se reduce con el hematocrito y, por tanto, esta circunstancia podría favorecer un valor de concentración más elevado (figura 22).



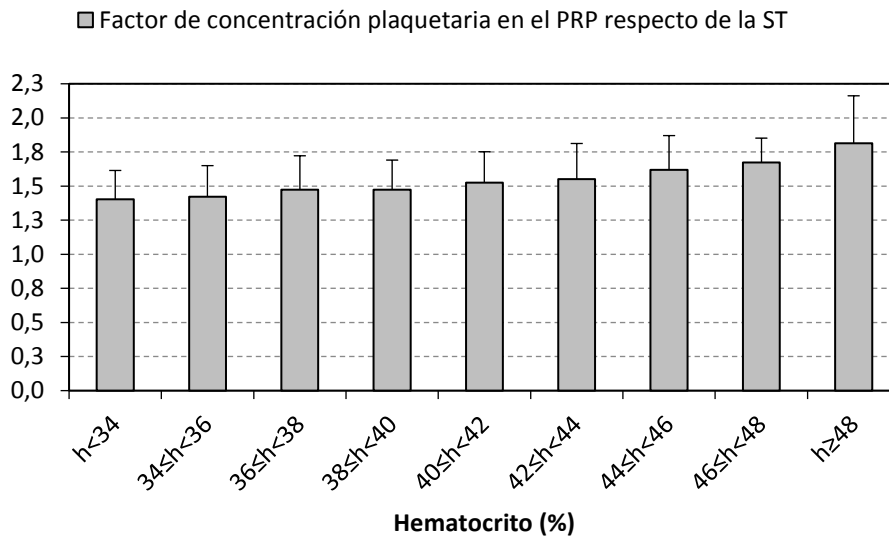


Figura 21. A: factor de incremento de la concentración plaquetaria en el PRP respecto del recuento obtenido en la sangre total (ST).

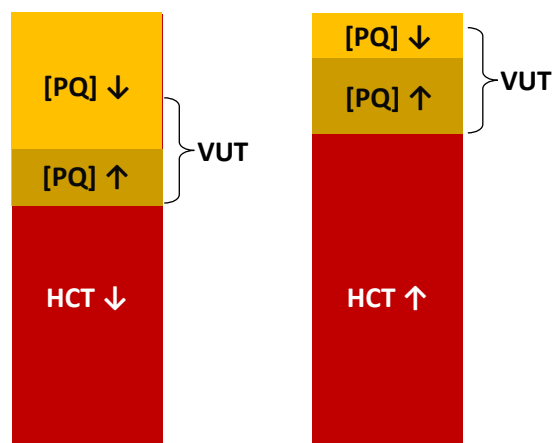


Figura 22. Efecto sobre la concentración plaquetaria [PQ], para un mismo volumen de uso terapéutico (VUT) requerido para una indicación clínica específica, en función del hematocrito (HCT) de la sangre total.

Seguidamente, se muestran las diferencias que se pueden producir para un protocolo basado en la aplicación de una misma fuerza relativa gravitacional pero utilizando tres diferentes modelos de centrífugas (todas ellas de la marca Heraeus y con cabezal basculante) (tabla 4).

	Rotor	Radio	Recipiente
Multifuge 3 SR	2520	19,2cm	Tubo
Megafuge 1.0	2101	16,1cm	Tubo
Varifuge 3.0 RS	8080	21,1cm	Bolsa

Tabla 4. Parámetros utilizados en cada uno los modelos de centrífuga.

El material de los recipientes es polipropileno, los tubos para un volumen máximo de 15ml y la bolsa, para un volumen recomendado de 150ml. Se calcularon los radios mínimos para cada caso (considerando en los tubos un volumen de 13ml y en la bolsa el citado como recomendado). Para los cálculos, se programó una centrifugación a 400g en los tres casos.

Con estos datos, utilizando un nomograma (figura 23), es posible superponer los rangos de actuación (distancia entre radio máximo y radio mínimo) en cada caso, para obtener una imagen que simplifica la comprensión.

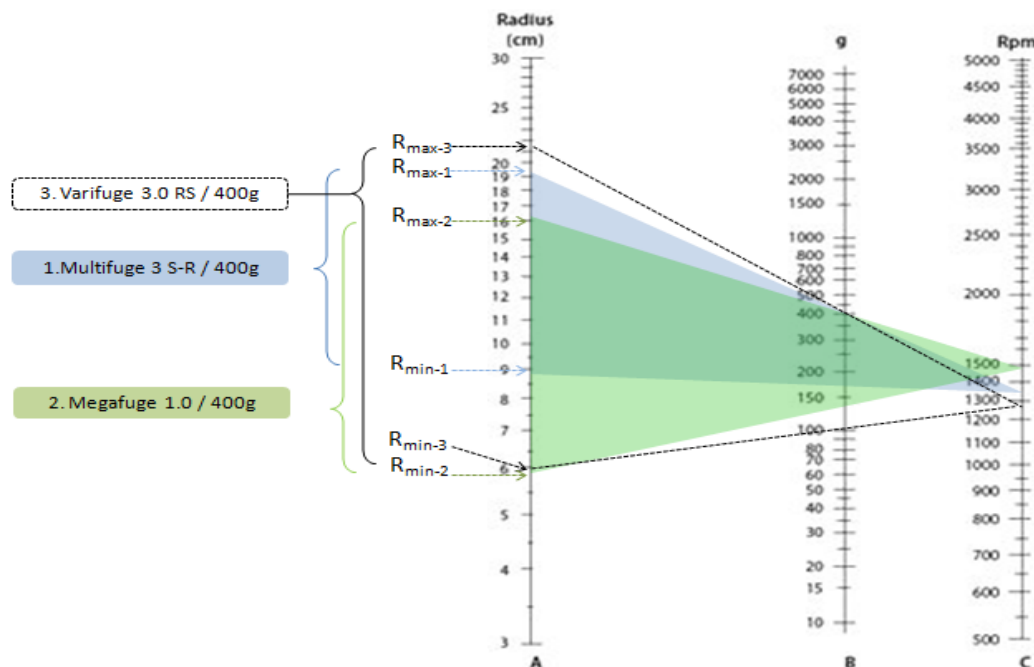


Figura 23. Nomograma sobre el que se establece la fuerza gravitacional (g) que se aplica a lo largo de cada recipiente, en función de sus respectivos radios mínimos ( $R_{min}$ ) y máximos ( $R_{max}$ )

Como es lógico, la bolsa (con mayor altura) proporciona una mayor amplitud de gradiente. En el caso de los tubos, se observó que, reduciendo el volumen de sangre que

contenían (de 13ml a 10ml), se incrementaba el volumen de plasma recuperado y se aumentaba la concentración de plaquetas sobre los glóbulos rojos compactados. Calculando la FCR en el nuevo radio mínimo (unas 220g) y reprogramando la centrifugación para alcanzar este régimen en los tubos con 13ml se optimizó el resultado también en este caso. Estas consideraciones son importantes a la hora de desarrollar un protocolo propio de obtención de PRP. Incluso, podría optimizarse el procedimiento en función del hematocrito, teniendo en cuenta que, como ya se ha mostrado, la altura en la que se va a situar en el recipiente el estrato donde se concentran las plaquetas (inmediatamente por encima de los glóbulos rojos) depende de dicho hematocrito.

Para el caso de la bolsa, se consideró importante colocarla en una posición que la situara de modo que ofreciera una superficie paralela al plano de rotación, ya que ponerla en el soporte de la centrífuga en una posición perpendicular a aquél supondría mayor riesgo de movimiento de la muestra durante los procesos de reorientación del cabezal basculante.

Pérez (2014) observó diferencias en el rendimiento del proceso de centrifugación de sangre para obtención de PRP, con las mismas condiciones de centrifugación, pero con distintos volúmenes de sangre inicial. Esto es consecuencia de la variación en el radio de giro que incide sobre la sangre en uno (8,5ml) y otro (3,5ml) caso. También do Amaral (2016) observó diferencias en la recuperación de plaquetas dependiendo de la longitud del tubo y, por lo tanto, del volumen de sangre contenido.

Analizando comparativamente los resultados aportados por Araki (2102) y Pérez (2014) sobre eficacia en la recuperación de plaquetas tras la centrifugación de la sangre total, llaman la atención las evidentes diferencias entre los rendimientos obtenidos por uno y otra, a pesar de utilizar fuerzas centrífugas similares.

En cualquier caso, lo cierto es que las diferencias observadas no resultan estadísticamente significativas y que, muy probablemente, el rendimiento final del PRP deba contemplarse desde una perspectiva multifactorial, de notable complejidad.

Dugrillon (2002) sugiere que una FCR superior a 800g durante 15min podría alterar la función plaquetaria, reduciendo la liberación de factores o bien perdiéndose éstos durante el procesamiento, por activación plaquetaria prematura. Es decir, que la utilización de un régimen elevado de rpm para asegurar la recogida de la mayoría de las plaquetas podría tener un efecto contraproducente. Además, reportó que el número de plaquetas no siempre

es proporcional a la cantidad de factores de crecimiento, por lo que se debe prestar más atención a la calidad del PRP que al número de plaquetas concentradas. En su estudio se mostró que el TGF- $\beta$  y la concentración de plaquetas se relacionan de forma directamente proporcional con la fuerza de centrifugación cuando las fuerzas son menores de 800g.

En el caso de utilizar una doble centrifugación, se debe controlar la presencia de eritrocitos en la suspensión que se va a someter a una centrifugación. Estos glóbulos rojos pueden sedimentar en el fondo del tubo, adsorbiendo plaquetas y glóbulos blancos. Ello puede condicionar recuento de plaquetas, habiéndose descrito hasta una pérdida del 20% de las plaquetas en dicho sedimento (Pérez y cols., 2014).

Amable (2013), observó que incrementando el tiempo de centrifugación aumentaba ligeramente la recuperación plaquetaria y disminuía la concentración de glóbulos blancos en la capa superior.

Do Amaral (2016) observa un incremento en el tamaño de las plaquetas (MPV, volumen plaquetario medio) cuando se utiliza un protocolo con más de una centrifugación, lo que podría ser un indicador de cambios en la morfología plaquetaria, hacia un fenotipo activado.

Dohan (2017) publicó un estudio sobre el impacto de las características del dispositivo centrifugador, entre ellas las vibraciones producidas, sobre la arquitectura y contenido celular del coágulo de L-PRF. Comparando distintos dispositivos centrífugos disponibles en el mercado y observó un impacto directo sobre el concentrado plaquetario, con efectos negativos sobre su viabilidad.

De acuerdo con lo expuesto, la fuerza centrífuga, el número de centrifugaciones, el tiempo de duración y la distancia entre la columna sanguínea y el rotor de la centrífuga pueden resultar factores críticos para la optimización del PRP, si no se aplican convenientemente.

Teniendo en cuenta la diversidad de los protocolos y la necesidad de un control de calidad estandarizado en la utilización clínica, se requiere demostrar que el procedimiento descrito es reproducible, con resultados consistentes. Sin embargo, la citada diversidad en las modalidades de generación del PRP conlleva una variabilidad en su composición final, lo que puede inducir diferentes respuestas biológicas, añadiendo mayor complejidad a la hora de comparar resultados.

## 1.2. Activación plaquetaria

Este proceso conlleva la liberación de los factores de crecimiento contenidos en los gránulos (Liao y cols., 2013). Se produce en condiciones fisiológicas al contactar con el colágeno tipo I de los tejidos (Marlovits y cols., 2004). Supone un cambio morfológico, pasando de su forma típica discoidal a un aspecto irregular (figura 24).

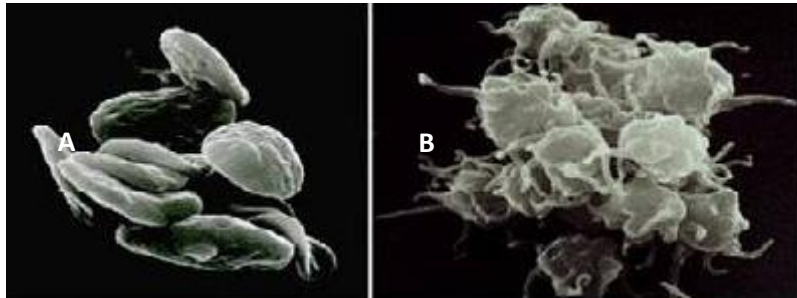


Figura 24. Cambio morfológico de las plaquetas tras su activación. A, forma discoidal. B, forma irregular tras su activación

En su desencadenamiento desempeña un papel trascendental el calcio. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los protocolos parten de una recogida de la sangre en un recipiente con anticoagulante, se requiere añadir compuestos con calcio para conseguir la activación. La agregación de las plaquetas y la formación de una red de fibrina a partir del fibrinógeno son etapas asociadas a la generación del coágulo. La trombina tiene un papel trascendental en este proceso. En algunos casos se añade trombina exógena, mientras que en otros se considera suficiente la endógena.

Además de los estímulos moleculares, también algunos parámetros físicos pueden activar las plaquetas. Ya se ha comentado que la centrifugación puede ser uno de ellos. También el frío puede hacerlo, por ello, los procedimientos de congelación-descongelación de las plaquetas en condiciones adecuadas pueden ofrecer una doble ventaja desde el punto de vista de optimizar el rendimiento de factores de crecimiento: por un lado la baja temperatura y, por otro, la criofractura (Zang y cols., 2004; Elder y cols., 2015).

Algunos estudios han evaluado el efecto del modo de activación sobre la liberación de los factores de crecimiento de las plaquetas. Martineau y cols. (2004) estudiaron diferentes combinaciones de trombina y  $\text{CaCl}_2$  en relación a la cinética de liberación de factores de crecimiento de las plaquetas, encontrando variaciones específicas para cada factor de crecimiento en función de la concentración de cada uno de los productos utilizados. Observaron que concentraciones altas de calcio y trombina (142,8U/ml y 14,3mg/ml, respectivamente) llevaban a un inmediato incremento de las concentraciones

de bFGF, TGF- $\beta$ 1 y PDGF-BB. Concentraciones bajas de calcio y trombina tendían a reducir y retrasar la liberación de factores de crecimiento de las plaquetas. Una rápida activación ha sido asociada con una disminución en la cantidad total de factores de crecimiento disponibles en los tejidos a lo largo del tiempo. Según el estudio de Cavallo y cols. (2016), mediante la activación con trombina únicamente o en combinación con  $\text{CaCl}_2$  y colágeno tipo I, se observó una liberación rápida de factores de crecimiento que permanece estable hasta las 24h. Con la utilización aislada de  $\text{CaCl}_2$  se apreció una liberación gradual con un menor nivel inicial, seguido de un incremento progresivo hasta concentraciones similares o incluso superiores a las 24h.

Por otro lado, la velocidad en la formación del coágulo también está influenciada por el tipo de activador empleado. Con  $\text{CaCl}_2$ , su formación se produce dentro de los 30 minutos siguientes a su adición. Sin embargo, con el uso de trombina o la combinación de  $\text{CaCl}_2$  y trombina, se obtiene el coágulo en los primeros 15 minutos. Con la activación mediante colágeno tipo I el coágulo no es visible a las 24h. Todo ello podría tener importancia en su aplicación clínica, influyendo en la forma de aplicación (de líquido a gel) (Cavallo y cols., 2016). DeLong y cols. (2012) reportaron sensación de quemazón tras la aplicación de muestras activadas con  $\text{CaCl}_2$  debido al pH bajo. El tipo de anticoagulante utilizado podría también estar relacionado con esta incidencia.

La relevancia de todo ello sobre el proceso de cicatrización de heridas es importante, ya que si bien bajas concentraciones podrían no tener efecto significativo sobre ella, altas concentraciones podrían inhibir las funciones celulares y el nivel de respuesta cicatricial (Ranly y cols., 2005; Han y cols., 2009).

### **1.3. Temperatura**

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, este parámetro puede influir en el control de la activación plaquetaria. Se recomienda una temperatura entre 21°C y 24°C durante la centrifugación de la sangre para la obtención del PRP (Sweeny y cols., 2002).

Durante el procesamiento puede condicionar el resultado, ya que una temperatura elevada reduce la densidad del plasma y esto podría afectar a la velocidad de sedimentación, aunque Amable (2013) sugiere que sólo se observa efecto de la temperatura si se centrifuga al menos durante 15min (que no es nuestro caso).

Por otro lado, autores como Macey (2002) propusieron que el frío podría retardar la activación plaquetaria. Algunos autores han utilizado temperaturas entre 12 y 16°C intentando optimizar la recuperación plaquetaria.

#### 1.4. Coagulación

La mayoría de los estudios que abordan los efectos biológicos del concentrado plaquetario se centran en la importancia de los factores de crecimiento e ignoran las citocinas de su entorno o la influencia de la matriz de fibrina que soporta su liberación. La concentración de fibrinógeno varía entre los diferentes métodos de obtención. En los protocolos de procesamiento de P-PRP, el fibrinógeno se origina principalmente de los gránulos de plaquetas después de la activación y la concentración final es baja. En los protocolos de obtención de P-PRF, el fibrinógeno circulante también se recoge y refuerza la red final de fibrina (Dohan y cols., 2009). Los concentrados de plaquetas deben analizarse como un todo, como un conjunto de plaquetas y leucocitos en una matriz de fibrina compleja.

En la figura 25 (Dohan Ehrenfest y cols., 2009) se pueden comparar la matriz y arquitectura celular de las cuatro categorías de concentrados plaquetarios, distinguiéndose las plaquetas y leucocitos (esferas azules). La red de fibrina es más gruesa y sólida en los PRF (flechas negras).

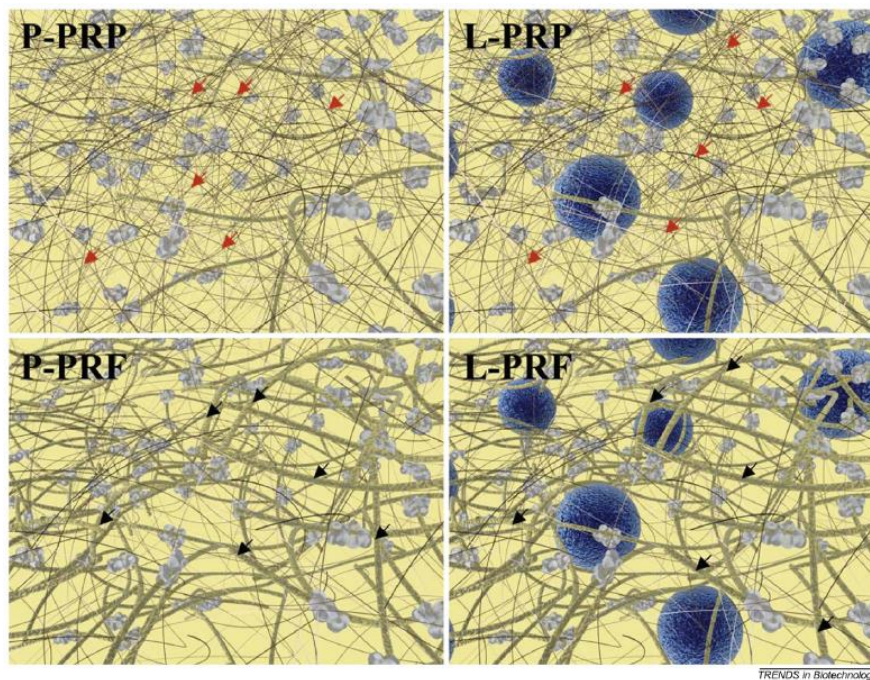


Figura 25. Comparación de la matriz y arquitectura celular de P-PRP, L-PRP, P-PRF y L-PRF.

Todo lo dicho incide en la idea ya comentada de que no todos los sistemas de procesamiento generan un mismo estándar de calidad, en este caso referido a la configuración estructural en la matriz de fibrina que se obtiene con la coagulación del producto. Según Dohan Ehrenfest (2014), para que la red de fibrina sea densa, además del fibrinógeno de las plaquetas hace falta incorporar fibrinógeno circulante.

Pérez (2014) sugiere un modelo estadístico para predecir la arquitectura del coágulo en función del radio estimado para las fibras de fibrina. El radio y el tiempo de coagulación se reducen cuando se incrementa el ratio suero/cloruro cálcico.

Han 2009 indica que la activación del PRP con trombina previamente a su uso clínico tiene un efecto negativo sobre la diferenciación celular, en concreto ve que esta activación previa inhibe la osteoconducción cuando el PRP se administra conjuntamente con matriz ósea desmineralizada.

Seguidamente, se describen los resultados obtenidos con el protocolo descrito en el apartado 1.1 de Material y Métodos. La coagulación se producía antes (con una diferencia de unos pocos minutos) en las muestras incubadas a 37°C (como era de esperar) y, en cada grupo de temperatura, antes en las sometidas a congelación/descongelación que en las frescas (probablemente por la liberación de parte del contenido plaquetario como consecuencia de la criofractura).

No hubo diferencias apreciables en el coágulo recién obtenido por las diferentes condiciones de temperatura (figura 26). Seguidamente, se procedió a despegar con mucho cuidado la fibrina de la superficie de la placa, para facilitar. En el caso de las muestras frescas fue evidente una cierta retracción que no se observó en las congeladas/descongeladas. Se dejó deliberadamente una cierta concentración de hematíes para «colorear» las muestras. En el caso de las frescas, se puede observar un mayor tono rojizo como consecuencia de la compactación de estos glóbulos rojos (especialmente en la zona perimetral). En las congeladas/descongeladas, la tinción es más tenue y uniforme, seguramente por la hemólisis post-congelación y consecuente dilución de la hemoglobina (dando una tonalidad más clara y uniforme).



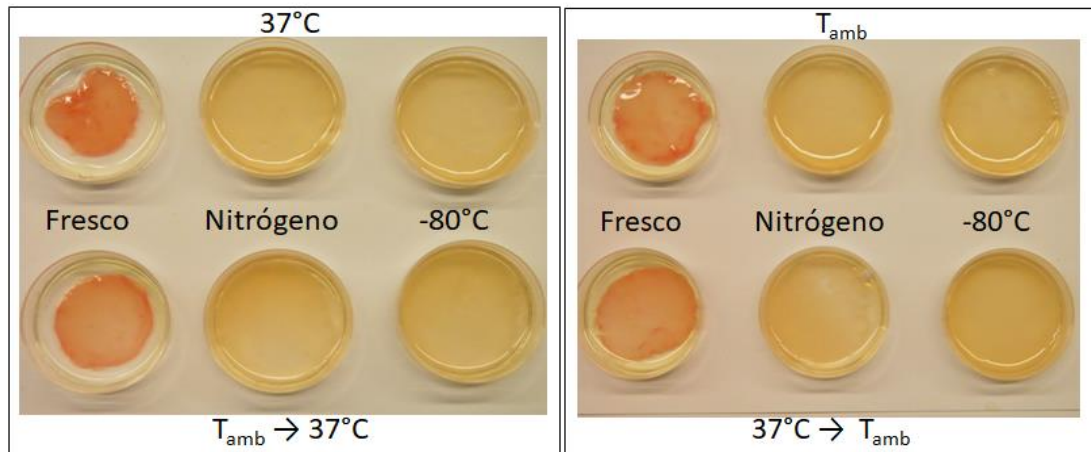


Figura 26. Cambios del coágulo en función de las diferentes condiciones de temperatura.

Aparte de las citadas diferencias en el tiempo necesario para la coagulación en unos casos y otros, no hubo otras incidencias reseñables durante esta etapa. Después de una hora de incubación en las condiciones de temperatura correspondientes, se procedió a manipular la matriz de fibrina para evaluar su consistencia. No se observaron diferencias asociadas al tipo de congelación, pero sí con las frescas. Como se puede observar en la figura 27A, la matriz generada con el producto fresco resultó fácil de manejar (sin riesgo de rotura) e incluso evidenciando cierta flexibilidad frente a la tracción (recuperando luego su longitud inicial). Por su parte, la matriz del producto congelado/descongelado se podía manipular también con cierta facilidad, aunque evidenciando cierta flacidez y con escasa resistencia a la tracción (probablemente por una distribución irregular de las fibras) (Figura 27B).

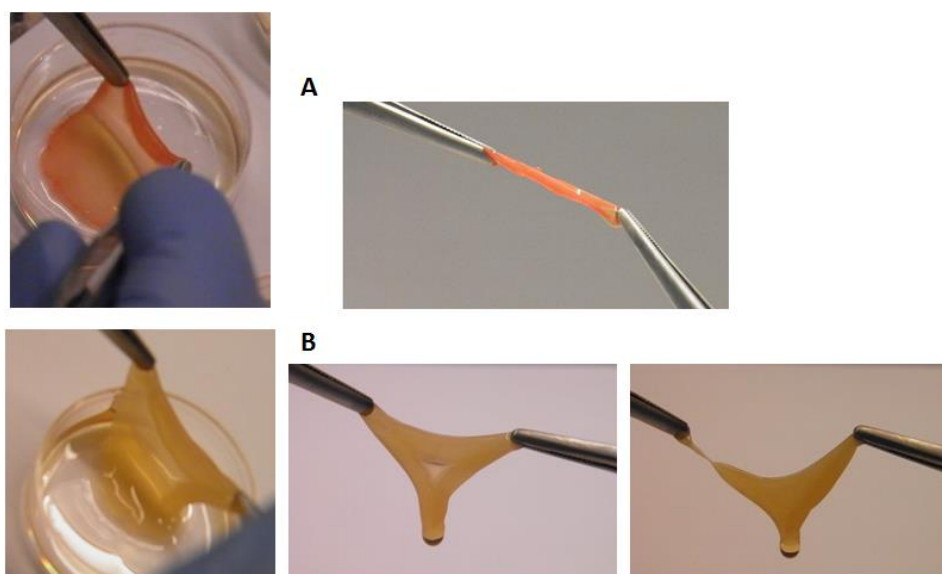


Figura 27. Manipulación del coágulo. A: producto fresco; B: producto congelado/descongelado

La ausencia de retracción en el segundo caso ofrece la ventaja de disponer de mayor superficie de matriz, aunque con cierta fragilidad. Esto último podría tener alguna implicación, por ejemplo, si se pretendiera utilizar la matriz de fibrina para contener células, en productos de ingeniería tisular; o también si el producto, una vez infiltrado, se coagula y puede ser sometido a estrés mecánico que condicione su integridad (en el caso de que ésta se considere relevante).

### **1.5. Congelación-descongelación**

Existen distintas hipótesis acerca de los efectos de la congelación sobre el concentrado plaquetario. Algunos investigadores consideran que podría influir en su función, disminuyendo la función plaquetaria y la liberación de factores de crecimiento, promoviendo la acumulación de citocinas pirogénicas y aumentando el riesgo de proliferación bacteriana (Kon y cols., 2013), y por tanto, podría afectar negativamente a su actividad biológica. Lógicamente, si lo que se pretende es una rotura de los elementos celulares para obtener la máxima concentración de factores, hay que asumir la pérdida de viabilidad.

Por otro lado, estudios *in vitro* como el desarrollado por Ceci y cols. (2016), muestran que la congelación no afecta al efecto estimulante del concentrado de plaquetas sobre la proliferación y diferenciación celular. En este se evaluó la vitalidad del crecimiento celular y la osteo-diferenciación de células progenitoras utilizando PRGF congelado en comparación con suero bovino fetal, observándose una mayor estimulación en el primer grupo.

Zimmermann y cols. (2003) describieron que el ciclo de congelación-descongelación daña la membrana plaquetaria produciendo una gran degranulación y el incremento de factores de crecimiento en plasma. Perut y cols. (2013) demostraron que este procedimiento reducía el número de plaquetas pero no afectaba a la liberación de factores de crecimiento. Este resultado también fue confirmado por Roffi y cols. (2014), cuyo estudio subrayó que aunque la congelación y la descongelación afectaba la cinética de liberación de los factores de crecimiento, los concentrados plaquetarios frescos y congelados no diferían significativamente en su capacidad para inducir la proliferación celular.

Pietramaggiore y cols. (2006) mostraron un efecto positivo sobre la cicatrización en modelo animal tras la aplicación de PRP congelado previamente, observándose mayor tejido de granulación y niveles de proliferación más elevados que en las heridas no tratadas.

En cuanto a la influencia del tiempo de congelación, Anitua y cols. (2013) describieron que muestras de PRGF almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15, 30 y 90 días, mantenían las mismas concentraciones de las principales proteínas y factores de crecimiento, y no se veían afectados sus efectos *in vitro*.

Esta opción de almacenamiento podría simplificar su administración en los pacientes sometidos a múltiples sesiones, sin embargo cabe señalar que los resultados biológicos no siempre se pueden traducir directamente en resultados clínicos.

### **1.6. Leucocitos**

Los leucocitos juegan un papel importante en la inmunogenicidad debido a su acción antiinfecciosa e inmunorreguladora. Por otro lado, también aportan algunos factores de crecimiento, como el de VEGF, factor promotor de la angiogénesis (Dohan y cols. 2009). Algunos autores recomendaron su eliminación del concentrado plaquetario con el objetivo de evitar los efectos proinflamatorios de las proteasas y las hidrolasas que contienen (Anitua y cols. 2007). No obstante, otros han sugerido el interés de su presencia por su potencial anti-microbiano. La controversia se extiende también a la relación entre dicho potencial y el modo de activación plaquetario, asociando algunos una reducción del mismo con el uso de cloruro cálcico o trombina (imputada al consumo de complemento durante la activación) (Burnouf y cols. 2013, Wu y cols. 2013); mientras que otros han evidenciado un incremento del poder antimicrobiano del PRP activado con trombina (Chen y cols. 2013; Li y cols. 2013). Finalmente, D'asta (2017) concluye no existe suficiente evidencia para atribuir este efecto a la presencia de leucocitos en el biomaterial.

### **1.7. Concentración plaquetaria y de factores de crecimiento**

Se recomiendan concentraciones de plaquetas de al menos  $0,8$  a  $1 \times 10^6$  plaquetas/ml (Moojen y cols., 2008; Borzini y cols., 2007; Marx y cols., 2004) para el PRP. En cualquier caso, lo cierto es que no parece probado que una mayor concentración plaquetaria conduzca a mejores resultados clínicos, e incluso se han observado efectos perjudiciales sobre las células con altas concentraciones (Yamaguchi y cols., 2012).

Vahabi y cols. (2017) estudiaron el efecto de distintas concentraciones de PRP sobre la proliferación de osteoblastos y fibroblastos *in vitro*, apreciando las mayores tasas de proliferación celular en las muestras con PRP al 10% [dilución en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)], aunque no llegaron a obtener diferencias estadísticamente significativas. Además, observaron un mayor efecto del PRP activado frente al no activado.

También se han realizado estudios sobre la influencia de la concentración del concentrado plaquetario sobre la proliferación y diferenciación de otras estirpes celulares. Felthaus (2017) observó un incremento en la diferenciación de células madre de tejido adiposo con concentraciones de PRP de 10% y 20%, afirmando que concentraciones superiores al 20% tenían un efecto inhibitorio. Por otro lado, Kawasumi (2008) sugirió un efecto positivo sobre la proliferación de células mesenquimales del estroma de médula ósea de rata utilizando concentraciones elevadas de PRP, aunque sin efecto aparente sobre la diferenciación osteoblástica. Además, en este último trabajo, la concentración inicial de plaquetas se diluyó un 25% durante el proceso de preparación del cultivo celular.

Respecto a su efecto sobre los queratinocitos y fibroblastos dérmicos, Xian y cols. (2015) observaron en estudio *in vitro* una mayor tasa de crecimiento de los queratinocitos y secreción de HFG y VEGF en las muestras cultivadas con PRP al 10%, mientras que en los cultivos con PRP al 20% apreciaron una mayor expresión de colágeno tipo I y III, así como de factor estimulador de colonias granulocito-macrófago e Il-1 (sustancias proinflamatorias). Concluyeron que concentraciones altas de PRP favorecían la inflamación, mientras que concentraciones bajas estimulaban la cicatrización en todas sus fases.

En la mayoría de los artículos no suele detallarse la concentración de factores de crecimiento del concentrado plaquetario. Esta tiene una dependencia multifactorial (Eppley y cols., 2006). En primer lugar, el contenido de los gránulos alfa de las plaquetas no está exento de variabilidad interindividual. También hay que tener en cuenta las técnicas de procesamiento utilizadas, que ofrecen distintos resultados en la recuperación de plaquetas y también en el grado de activación de aquéllas. Puede haber entonces diferencias asociadas a la proporción de plaquetas activadas en el momento de la cuantificación de los factores, ya que no todos se liberan simultáneamente, de modo regular y uniforme (Eppley y cols., 2004; Weibrich y cols., 2002). Además, hay que tener

en consideración la eventual aportación de factores de crecimiento procedentes de los glóbulos blancos. Como consecuencia de todo ello, no hay unanimidad en los resultados de la correlación entre la concentración de factores y el recuento de plaquetas (Everts y cols., 2008; Borzini y cols., 2007; Eppley y cols., 2004; Weibrich y cols., 2002). Ciertamente, la cuantificación de los factores de crecimiento, utilizando protocolos que optimicen su presencia como elementos solubles, representa el indicador más adecuado para establecer criterios comparativos en el análisis de resultados.

### **1.8. Edad**

Se ha sugerido que este factor biológico podría influir en la composición del PRP y su capacidad terapéutica. No obstante, estudios como los llevados a cabo por Weibrich (2002) y Anitua (2016) no mostraron diferencias significativas en la concentración plaquetaria y de factores de crecimiento entre distintos grupos de edad. En este último se observó además que la edad de los donantes no interfiere con el potencial trófico de los fibroblastos dérmicos cultivados con concentrado plaquetario.

### **1.9. Pauta de aplicación**

El producto se puede presentar bien como líquido o como gel (coagulado). En el caso del líquido, se pueden añadir inmediatamente antes de la aplicación inductores de la coagulación (cloruro cálcico o/y trombina) o no. Por otro lado, el líquido se puede infiltrar (como sucede en el caso de uso en condropatías, tendinopatías y lesiones musculares) o difundir como aerosol con un mecanismo de espray (para uso tópico). El gel suele emplearse para el tratamiento de úlceras cutáneas, si bien también se ha sugerido el interés de infiltrar el líquido sobrenadante en los bordes de la lesión.

Otro parámetro de relevancia a la hora de abordar análisis comparativos es la dosificación, tanto en lo que se refiere al número de aplicaciones, como a su frecuencia y el volumen de producto utilizado.

### **1.10. Fármacos**

No es infrecuente que los pacientes candidatos al tratamiento con PRP se encuentren en tratamiento farmacológico concomitante. El papel de estos fármacos en los resultados, ya sea del procesamiento como del uso clínico no es bien conocido. Anitua y cols. (2015) estudiaron la posible interferencia de antiagregantes, anticoagulantes y antiinflamatorios

sobre el PRP, mediante el estudio de 20 pacientes (cuatro grupos de 5 pacientes, en tratamiento crónico con ácido acetilsalicílico, acenocumarol, antiinflamatorio no esteroideo o sin tratamiento). No encontraron diferencias estadísticamente significativas en los distintos grupos de tratamiento con respecto al grupo control en cuanto a: activación plaquetaria (mediante cuantificación de P-selectina); retracción del coágulo; concentración de factores de crecimiento (PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, VEGF y HGF); y el proceso de desgranulación plaquetaria. No obstante, en cultivo de tenocitos con PRP objetivaron una menor concentración de VEGF en el grupo de pacientes tratados con acenocumarol, que podría relacionarse con un menor efecto angiogénico del PRP en estos pacientes, y un incremento de síntesis de HGF en los tres grupos de tratamiento con respecto al control. Teniendo en cuenta la importante limitación por su escaso tamaño muestral, sugieren que el consumo crónico de este tipo de fármacos no interfiere en la preparación y el potencial biológico del PRP.

Por su parte, Ramsook y Danesh (2016) insistieron en la importancia de mantener la integridad de la membrana plaquetaria para lograr la adecuada liberación de su contenido. Si las plaquetas se activan durante el procesamiento de PRP, los factores de crecimiento se liberarán en el plasma, parte del cual se descarta durante su preparación, disminuyendo así su eficacia. Estos autores sugirieron que dado que los agentes antitrombóticos afectan a la estabilidad plaquetaria, podrían tener un efecto sobre la eficacia del tratamiento con PRP, por lo que podría ser necesaria una suspensión transitoria de estos fármacos previa a la terapia.

Por otro lado, durante el procesamiento del concentrado plaquetario se utiliza frecuentemente un anticoagulante para prevenir su activación espontánea. Varios agentes se han utilizado con este fin [citrato, citrato dextrosa (ACD), citrato-teofilin-adenosina-dipridamol (CTAD) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)]. El citrato de sodio se ha relacionado con una disminución en el número de gránulos densos y la promoción de una lisis más temprana y una activación plaquetaria más espontánea (Ramsook y cols., 2016). El ACD no altera los gránulos (Pignatelli y cols., 1996), la presencia de glucosa, contribuyendo al metabolismo plaquetario, y la baja concentración de citrato (1,32%) que ayuda a evitar la producción de lactato y por consiguiente la disminución del pH, se han asociado con la integridad plaquetaria (Gulliksson y cols., 2014).

Lei y cols. (2009) llevaron a cabo un estudio del efecto de los anticoagulantes en la calidad y eficacia biológica del PRP. Compararon la activación plaquetaria espontánea, la concentración de TGF- $\beta$ 1 y el efecto del PRP en la proliferación celular tras su preparación con distintos anticoagulantes, heparina, citrato, ACD o CTAD. Observaron superioridad del ACD y CTAD frente a la heparina y el citrato, en la prevención de la activación plaquetaria espontánea y la concentración de TGF- $\beta$ 1 del PRP, sugiriendo ambos anticoagulantes como apropiados para la preparación de los concentrados plaquetarios.

Araki (2012) compara el rendimiento en la recuperación de plaquetas obtenido utilizando como anticoagulante EDTA o bien ACD, observando un valor significativamente inferior cuando se utiliza ACD. Los autores atribuyen este resultado a que el primero es más potente a la hora de prevenir la agregación plaquetaria que se puede producir durante el procesamiento y a una eventual pérdida de la integridad de las plaquetas, con el segundo. Sin embargo, en la descripción de la técnica utilizada no está claro si el uso de ACD conlleva un cierto factor de dilución de la muestra (al tratarse de una solución), lo que reduciría la concentración plaquetaria respecto de la del tubo con EDTA (que parece utilizarse como polvo). Por otro lado, el ACD es un anticoagulante frecuentemente utilizado cuando se desea conservar durante cierto tiempo la funcionalidad de los elementos formes de la sangre y también asegurar el mantenimiento de los factores de coagulación, ya que mantiene un pH próximo al fisiológico. Por todo ello, se ha sugerido como el anticoagulante de elección para la producción de PRP (Lei y cols., 2009).

El EDTA es un potente anticoagulante y quizá por ello ha proporcionado mejores resultados que el ACD en la recuperación de plaquetas (do Amaral y cols., 2016; Pérez y cols., 2014). Sin embargo, este potencial puede suponer alguna dificultad cuando el producto se desea aplicar coagulado o esperando que coagule rápidamente tras la infiltración. También se ha sugerido que el EDTA podría tener un efecto irritante sobre los tejidos. Por otro lado, do Amaral (2016) observa que el tipo de anticoagulante utilizado también podría tener un efecto sobre los factores de crecimiento liberados, con consecuencias sobre la proliferación *in vitro* de células mesenquimales de médula ósea, que sugieren ciertas ventajas con el uso de soluciones citratadas en lugar de EDTA.

El ACD se ha destacado por mantener la capacidad de respuesta plaquetaria (Pignatelli y cols., 1995), y el EDTA podría inducir cambios estructurales irreversibles en las plaquetas

que condicionarían su funcionalidad (White y cols., 2000). No obstante, la potencial relevancia de estas características estaría reducida cuando se pretende obtener un lisado plaquetario.

### **1.11. El paciente quemado**

Lógicamente, el perfil fisiológico asociado a este tipo de patología también debe ser analizado a la hora de decidir sobre la conveniencia de la extracción de sangre para uso autólogo del PRP. La coagulopatía temprana inducida por el traumatismo ha sido descrita en la literatura en los pacientes traumáticos, indicando incidencias en torno al 25% de los pacientes con lesiones más graves. El desarrollo de esta coagulopatía en el paciente quemado presenta una incidencia que varía desde el 0% al 39% (Lu y cols., 2013; Sherren y cols., 2013). Se ha sugerido que esta variabilidad puede ser debida a las diferencias en la superficie corporal total quemada (SCTQ); sin embargo, esta asociación no siempre es aceptada (Lu y cols., 2013).

En el paciente quemado se produce una desregulación de la hemostasia con una alteración de los parámetros hemostáticos y hematológicos, a tener en cuenta a la hora de plantear terapias como el PRP. El consenso general es que los pacientes con quemaduras pueden exhibir una hipercoagulabilidad durante las primeras 24-48 horas a pesar de la disminución observada en el número de plaquetas. Posteriormente, la coagulopatía de consumo prevalece en los pacientes graves (Prat y cols., 2017).

Se ha demostrado que la cinética de las plaquetas sigue un patrón distinto después de la lesión térmica. Se objetiva la concentración plaquetaria más baja el día 3 postquemadura y una trombocitosis máxima de rebote el día 14 después de la lesión, seguida de una trombocitosis temporal que se normaliza gradualmente en torno al día 24 (Marck y cols., 2013). El nadir trombocitopénico podría ser causado por una serie de mecanismos: depresión de la producción en la médula ósea, hemodilución, interacción farmacológica y la activación o consumo sistémico de plaquetas. La trombocitosis de rebote observada, puede explicarse como una respuesta reactiva de la médula ósea al consumo de plaquetas después de la lesión térmica. Es importante tener en cuenta que en los pacientes con lesiones térmicas graves los recuentos de plaquetas pueden elevarse falsamente, debido a varios factores que pueden inducir a error en los métodos tradicionales de conteo, como el recuento erróneo de fragmentos de eritrocitos o micro-esferocitos como plaquetas (Lawrence y cols., 1992). En cuanto a su funcionalidad, se ha observado una mayor



funcionalidad plaquetaria en las primeras 48h y activación plaquetaria al menos 72 horas tras una lesión traumática (Levin y cols., 2010). No obstante, en el estudio llevado a cabo por Wade (2016) se observó en el momento del ingreso una reducción de la activación plaquetaria a través de las vías del ácido araquidónico y la ristocetina, tanto en el grupo de pacientes quemados como traumáticos.

Respecto a la serie roja, los niveles de hematocrito dentro de las 24 horas tras la lesión son comparables con los niveles observados en individuos sanos. Seguidamente, se aprecia una disminución significativa desde el día 3 hasta el segundo mes después de la lesión, que es indicativo de hemodilución potencial (Dinsdale y cols., 2017).

La lesión térmica también produce una marcada disfunción neutrófila, en parte debido a la liberación de granulocitos inmaduros desde la médula ósea en respuesta al estrés. Los neutrófilos inmaduros liberados presentan una función neutrófila defectuosa (Hampson y cols., 2017).

### **1.12. Uso clínico del PRP**

Una simple búsqueda en bases de datos de publicaciones científicas, utilizando como palabra clave *platelet-rich plasma* (en el título o el resumen), ofrece como resultado unas 600-700 referencias anuales en revistas indexadas, durante el último lustro. Sin embargo, apenas hay estudios prospectivos y resulta ciertamente complejo establecer criterios comparativos como consecuencia de la falta de información y de notable diversidad de modalidades de procesamiento. En un buen número de casos, los parámetros de la metodología utilizada se basan en criterios empíricos.

La cirugía periodontal y oral son probablemente los campos en los que más se ha investigado y en los que más resultados se han aportado con el tratamiento de PRP. Desde sus primeros usos como coadyuvante para la inserción de implantes de titanio llevado a cabo por Whitman (1997), quien evidenció una mayor consolidación ósea y adherencia del colgajo mucogingival en los pacientes tratados con PRP, se han sucedido múltiples aplicaciones clínicas.

En una revisión de la literatura llevada a cabo por Albanese y cols. en 2013, se muestra que la aplicación de PRP en el alveolo tras la extracción dental mejora la cicatrización de los tejidos blandos e influye positivamente en la regeneración ósea, aunque este último efecto parece disminuir posteriormente. En cuanto a la utilización del PRP como material

de recubrimiento de implantes dentales se muestran resultados prometedores y en el tratamiento de la osteonecrosis mandibular por bifosfonatos con la combinación de curetaje del hueso necrótico y aplicación de PRP se han demostrado resultados exitosos de forma mínimamente invasiva.

Marx y cols. (2004) fueron los primeros en mostrar el efecto adyuvante del PRP sobre el injerto óseo. Son varios los estudios que muestran un incremento del crecimiento óseo significativo en comparación con el injerto óseo sin PRP (Oyama y cols., 2004; Torres y cols., 2009).

En el campo de la Traumatología el espectro de aplicación del PRP abarca desde el tratamiento de tendinopatías y condropatías hasta su uso como adyuvante en los injertos óseos.

La combinación de PRP y autoinjerto óseo no parece mejorar la eficacia clínica a este último (Mooren y cols., 2010; Aghaloo y cols., 2004). Kanthan (2011) observa cierto efecto beneficioso pero sólo cuando se usa el PRP con soportes osteoconductivos artificiales.

Cohn (2015) revisa 13 ensayos clínicos en Traumatología con PRP (epicondilitis y tendinopatía asociadas a «codo de tenista», lesiones del ligamento cruzado anterior, lesiones del manguito de rotadores). Sólo 4 expresan el enriquecimiento en el factor de concentración plaquetario (entre 3 y 5). Sólo dos comentan como dato más reseñable una reducción del dolor, pero sólo 2 de los ensayos reportan diferencias significativas que apoyen el uso de PRP. Mishra (2014) trata 230 pacientes con «codo de tenista», observando a medio plazo (24 semanas) que la aplicación de PRP (con presencia de glóbulos blancos) proporciona mejoras clínicas significativas.

Una revisión sistemática del efecto del PRP sobre maduración del injerto e integración ósea en reconstrucción del ligamento cruzado anterior realizada por Vavken (2011) muestra que los trabajos en los que se utiliza una concentración mayor de plaquetas no observan mejoras significativas con su uso. De hecho, los autores sugieren reducir la concentración de plaquetas (sin sobrepasar 5x) para evitar los efectos negativos de una sobreexposición a factores de crecimiento (cicatrización caótica y supresión de la generación de osteoclastos). Parece ser que el PRP sí podría acelerar la repoblación del injerto, aunque no parece ayudar a la integración ósea.

En el meta-análisis desarrollado por Sheth (2012) sobre la eficacia del uso de PRP en pacientes con lesiones óseas y de tejidos blandos (ligamentos y tendones), en 21 de los 33 ensayos clínicos incluidos en el estudio no se encontraron evidencias que indicaran mejoras significativas en la evolución clínica de los pacientes con el uso de este producto (incluso en dos de ellos, el grupo control reportó mejores resultados).

En el caso de las tendinopatías hay que tener en cuenta que el trauma mecánico originado por la propia aguja utilizada en la infiltración puede desencadenar los mecanismos de reparación tisular. La mayor evidencia de mejora se ha mostrado en el tratamiento de las lesiones de tendones extensor y flexor común asociadas a la epicondilitis lateral y medial (Peerbooms y cols., 2010, Halpern y cols., 2012).

Nguyen (2017) desarrolla un estudio prospectivo con el uso de la microfractura para el tratamiento de lesiones en el cartílago articular, con la adición de la fracción vascular estromal de tejido adiposo (FVETA) conjuntamente con PRP. Se utiliza como grupo control aquellos pacientes a los que sólo se aplica microfractura como tratamiento, pero no incluyen grupos donde se utilicen individualizadamente cada uno de ellos, lo que resta consistencia a la elaboración de conclusiones. De hecho, Platas (2016) ha observado un efecto anti-inflamatorio con carácter paracrino de células presentes en el FVETA. En el mismo sentido, Tajima (2018) describe las ventajas del uso combinado de PRP y células mesenquimales derivadas de tejido adiposo para regeneración ósea.

Di Martino (2018) realiza un ensayo clínico sobre el tratamiento de la artrosis de rodilla con PRP, evidenciando un efecto beneficioso pero sin diferencias significativas con el tratamiento con ácido hialurónico (aunque la tasa de reintervención sí fue menor en el grupo tratado con PRP). Este grupo utiliza una pauta de aplicación semanal, distribuida en 3 dosis (la primera en fresco y otras dos descongeladas).

Milano (2012) desarrolla un modelo experimental (en oveja) para evaluar el tratamiento de lesiones condrales con PRP, aplicando 5 dosis con una periodicidad semanal (el PRP se obtiene en fresco, cada semana). Obtiene un factor de concentración de unas dos veces el valor basal. Como conclusión, el tejido obtenido con el PRP evidencia un comportamiento biomecánico y aspecto histológico significativamente mejores que el uso de la sola técnica de microfractura.

Khoshbin (2013) realiza una revisión sistemática de publicaciones sobre el tratamiento de la artrosis de rodilla con PRP. En los estudios seleccionados el PRP se dosifica en 2, 3 ó 4 aplicaciones periódicas (separadas entre 1 y 3 semanas). Si bien el uso de PRP podría mejorar el estado clínico de los pacientes, no está claro si realmente es una alternativa más eficaz que, por ejemplo, el ácido hialurónico. De hecho, parece haber una mayor incidencia de los efectos adversos inespecíficos (dolor, rigidez, mareo, dolor de cabeza, náuseas, gastritis, sudoración, y taquicardia) con el uso de PRP. Tampoco la revisión sistemática de Dold (2014) sobre el uso de PRP en patología articular concluye que haya suficientes evidencias que indiquen ventajas clínicas significativas con su uso.

Un meta-análisis desarrollado por Grassi (2018) sobre el tratamiento de lesiones musculares agudas con PRP concluye que las evidencias disponibles son insuficientes para determinar que existe un beneficio con el uso de este producto.

Si el PRP se aplica sobre tejido hemorrágico los factores se pueden dispersar y, consecuentemente, diluir rápidamente. Respecto a un potencial efecto inmunomodulador asociado al PRP, Ubezio (2012) afirma que la concentración de HLA-I y FasL solubles en el PRP son insuficientes para inducir una inmunomodulación mediada por dichas moléculas.

Dentro de la Cirugía Plástica y Reconstructiva destaca la contribución del PRP en la cicatrización de heridas y la viabilidad de los injertos graso y óseo. Estudios *in vitro* muestran su efecto promotor de la proliferación y diferenciación de fibroblastos dérmicos humanos en miofibroblastos, promoviendo así la contracción de la herida (Kushida y cols., 2013; Kakudo y cols., 2008; Graziani y cols., 2006). Estudios *in vivo* muestran una cicatrización de heridas más rápida con respecto al grupo control (Carter y cols., 2011) y se llega a recomendar el uso de PRP como terapia adyuvante para promover la cicatrización de heridas, a parte de los métodos convencionales (Sommeling y cols., 2013). En el estudio llevado a cabo por Dougherty (2008) se compara el coste-efectividad de distintos tratamientos en úlceras de pacientes diabéticos, observándose un menor coste del tratamiento con PRP frente a otros tratamientos convencionales. La última revisión Cochrane acerca del papel del PRP en el tratamiento de las heridas crónicas llevada a cabo en 2016 (Martínez-Zapata y cols., 2016), sugiere que su aplicación podría mejorar la cicatrización de las úlceras en pie diabético, en base a los resultados de 2 ensayos clínicos aleatorizados. No obstante, sugieren que con la evidencia científica existente no

está claro si el PRP es útil en el tratamiento de otro tipo de heridas crónicas, e insisten en el elevado riesgo de sesgos existentes en los ensayos clínicos analizados y en la necesidad de desarrollar ensayos clínicos bien diseñados con una potencia estadística adecuada.

La utilización del injerto de grasa es una técnica utilizada para la restauración del contorno y lesiones atróficas, que ha ganado interés en los últimos años. Son varios los estudios que han investigado el efecto del PRP sobre su viabilidad (Liao y cols., 2013; Li y cols., 2015; Serra-Mestre y cols., 2014; Jin y cols., 2013), mostrándose una acción sinérgica en la cicatrización de los tejidos blandos y una mejora de la supervivencia del injerto graso. Los injertos óseos son utilizados en diversos entornos clínicos dentro de la Cirugía Plástica, tales como la reconstrucción mandibular y la cirugía de paladar hendido.

En definitiva, en la mayoría de las especialidades, si se constata una coincidencia entre los diferentes autores, y es la necesaria realización de más ensayos clínicos que aporten la suficiente evidencia científica que apoye el uso de PRP en la práctica clínica habitual (Ramos-Torrecillas y cols., 2014; Albanese y cols., 2013; Eppley y cols., 2006; Dold y cols., 2014; Halpern y cols., 2012; Sommeling y cols., 2013; Freshwater y cols., 2013; Gentile y cols., 2012; Dhillon y cols., 2012).

## **2. Análisis descriptivo**

A continuación se presenta la descripción de las características de la muestra (tabla 5), las variables de la analítica preoperatoria (tabla 6), las variables de la analítica del día de la intervención (tabla 7), las variables de las muestras de PRP obtenidas (tabla 8) y la concentración de factores de crecimiento de cada muestra del estudio (tabla 9).

<b>Características de la muestra</b>	<b>n = 20</b>
	<b>Media (SD) / n (%)</b> <b>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Cuartil (Q))</b>
<i>Edad</i>	40,05 (12,64) 41 (28; 51,25)
<i>SCTQ</i>	2,76 (2,26) 2 (1,43; 3)
<i>Sexo</i>	Mujer 5 (25%)
	Varón 15 (75%)
<i>Raza</i>	Caucásico 20 (100%)
<i>Fototipo</i>	2 7 (35%)
	3 6 (30%)
	4 5 (25%)
	5 1 (5%)
	6 1 (5%)
<i>Diabetes Mellitus</i>	No 19 (95%)
	Sí 1 (5%)
<i>Hipertensión arterial</i>	No 20 (100%)
<i>Fumador</i>	No 19 (95%)
	Sí 1 (5%)
<i>Etiología</i>	Contacto 3 (15%)
	Dermoabrasión 1 (5%)
	Escaldadura 5 (25%)
	Llama 7 (35%)
	Química 4 (20%)
<i>Acontecimientos adversos</i>	No 20 (100%)
<i>Tiempo hasta intervención (días)</i>	17,95 (9,96)
	15,5 (10,75; 21,25)
<i>Tiempo hasta epitelización total(días)</i>	14,85 (4,2)
	15 (12,75; 17,25)
<i>Tiempo de congelación de las muestras (meses)</i>	14,75 (5,87)
	14 (9; 19)

Tabla 5. Descripción de las características de la muestra.

<b>Variables analítica preoperatoria</b>	<b>n = 20</b>
	<b>Media (SD) / n (%)</b> <b>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</b>
<i>Hemoglobina preoperatoria (g/dl)</i>	14,02 (1,82) 14,5 (12,95; 15,35)
<i>Hematocrito preoperatorio (%)</i>	42,42 (4,44) 43,85 (40,1; 45,3)
<i>Plaquetas preoperatorio (/μl)</i>	278.400 (85.145,32) 269.500 (219.000; 317.000)
<i>Leucocitos preoperatorio (10<sup>3</sup>/ml)</i>	9,7 (3,96) 8,66 (7,21; 11,24)
<i>Neutrófilos preoperatorio (10<sup>3</sup>/ml)</i>	7,04 (3,29) 5,7 (4,81; 8,22)

Tabla 6. Descripción de las variables de la analítica preoperatoria.

<b>Variables analítica intervención</b>	<b>n = 20</b>
	<b>Media (SD) / n (%)</b> <b>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</b>
<i>Hemoglobina intervención (g/dl)</i>	13,56 (1,76) 13,7 (13,1; 14,93)
<i>Hematocrito intervención (%)</i>	41,15 (4,33) 41,9 (39,98; 44,75)
<i>Plaquetas intervención (/μl)</i>	311.400 (91.377,41) 312.000 (250.000; 361.250)
<i>Leucocitos intervención (10<sup>3</sup>/ml)</i>	9,28 (2,68) 8,57 (7,82; 10,39)
<i>Neutrófilos intervención (10<sup>3</sup>/ml)</i>	6,42 (2,68) 5,63 (5,3; 7,27)

Tabla 7. Descripción de las variables de la analítica del día de la intervención.

<b>Variables PRP</b>	<b>n = 20</b>
	<b>Media (SD)</b> <b>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</b>
<i>WBC plasma (μl)</i>	0,4 (0,91) 0,01 (0; 0,1)
<i>RBC plasma (μl)</i>	0,02 (0,02) 0,01 (0;0,03)
<i>HCT plasma (g/dl)</i>	0,07 (0,1) 0 (0; 0,1)
<i>MCV plasma (fl)</i>	29,29 (29,69) 29,15 (0; 57,5)
<i>Plaquetas plasma (μl)</i>	360.150 (159.879,65) 336.500 (264.750; 440.500)
<i>PDW plasma (fl)</i>	9,29 (1,38) 9,1 (8,1; 10,5)
<i>MPV plasma (fl)</i>	9,4 (0,76) 9,2 (8,75; 10)
<i>P-LCR plasma (fl)</i>	18,69 (6,44) 17,6 (13,3; 23,9)
<i>Factor de concentración plaquetaria</i>	1,17 (0,42) 1,14 (0,88; 1,35)

Tabla 8. Descripción de variables de las muestras de PRP.



Paciente	EGF (pg/ml)	TGF- $\beta$ (pg/ml)	FGF (pg/ml)	PDGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	Tiempo congelación muestra (meses)
1	0,020271	0	4,590383	4,803852	0	25
2	18,2439	0,346463	6,539847	71,30255	0	25
3	0,379498	0	4,787493	12,26961	10,8206	22
4	2,026216	0	4,135045	19,08377	0	22
5	1,003204	0	5,721744	15,62525	4,179932	22
6	2,85482	0	6,954385	28,71384	2,910371	18
7	0	0	3,813955	5,175241	0	16
8	0,30711	0	4,135045	12,33431	0	16
9	446,7542	34,66139	15,28746	2163,374	16,66942	15
10	0,278382	0	2,269344	3,117651	0	15
11	10,96467	0	6,954385	101,7394	21,74981	13
12	2,067497	0	10,67794	8,419769	0	13
13	1,671949	0	3,496559	21,12559	0	11
14	1886,201	101,394	219,466	17243,06	606,2804	11
15	1,769655	0	4,329384	18,36406	0	9
16	0	0	3,877884	6,636662	4,264424	9
17	0,08455	0	5,251746	12,52867	0	9
18	66,93949	0	6,471103	1594,196	6,540534	9
19	3,921698	0	4,00618	35,84086	0	8
20	10,24217	0	7,232666	36,02831	0	7
Media (SD)	122,79 (426,79)	6,82 (23,57)	16,5 (47,86)	1070,69 (3850,07)	33,67 (134,92)	
Mediana (1 <sup>er</sup> ; 3 <sup>er</sup> Q)	1,9 (0,3; 10,42)	0 (0; 0)	5,02 (4,1; 6,95)	18,72 (11,31; 44,85)	0 (0; 4,83)	

Tabla 9. Concentración de factores de crecimiento y tiempo de congelación hasta análisis de cada muestra del estudio.

### 3. Coste

#### 3.1. Material utilizado para obtención y aplicación de PRP y PRGF de forma manual

Material fungible por paciente:

- Tubo Vacuette® de 9ml ACD-B.....	0,10€ x 6= 0,60€
- Pipeta Pasteur estéril de 3ml.....	0,01€ x 2 = 0,02€
- Tubo de 1ml de CaCl <sub>2</sub> .....	0,12€
- Tubo de 10ml seco.....	0,08€ x 5 = 0,40€
- Paño estéril.....	0,15€
- Guantes estériles.....	0,05€
- Jeringa estéril de 2,5ml.....	0,01€ x 2 = 0,02€
- Atomizador .....	0,20€
Total.....	1,56€

Material inventariable: se requiere centrífuga y cabina de flujo. No se ha repercutido en el coste, puesto que se ha hecho uso de aparataje ya disponible en el laboratorio de Hematología.

#### 3.2. Otras formas de tratamiento

Tratamiento con Comfeel Plus Transparent:

- Apósito hidrocoloide Comfeel Plus Transparent 20x20 (Coloplast S.L.).....	1,14€
---	-------

Tratamiento con Aquacel Ag:

- Apósito Aquacel Ag 10x10.....	1,99€ x 2 = 3,98€
---------------------------------	-------------------

Tratamiento con Alginato Biatain Ag:

- Apósito Alginato Biatain Ag 10x10.....	2,40€ x 2 = 4,80€
--	-------------------

Tratamiento con Linitul+Furacin:

- Apósito Linitul 15x25.....	0,4€
- Furacin 0.2% 100g.....	4,66€ x 0,5 = 2,33€
Total.....	2,73€

### 3.3. Comparación coste de tratamientos

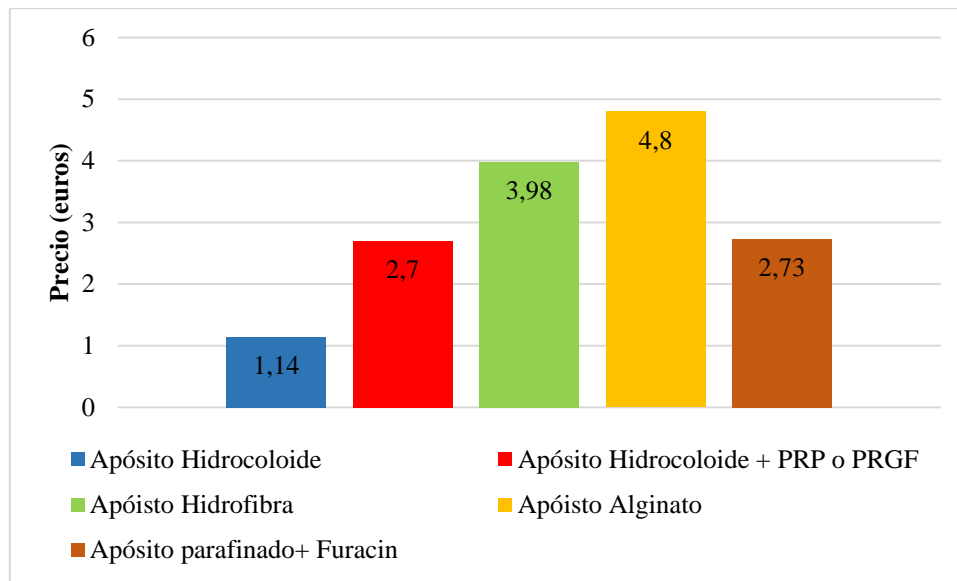


Figura 28. Representación gráfica del coste de los tratamientos de la zona donante de injerto de piel parcial.

## 4. Laboratorio

### 4.1. ¿Existe relación entre el número de plaquetas en el PRP (plaquetas plasma) y el factor de concentración plaquetaria?

En la figura 29 se aprecia inicialmente un incremento lineal de la relación entre ambos parámetros (plaquetas en el recuento basal y factor de concentración alcanzado en el PRP) hasta el punto de cambio estimado de  $342,331 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu$ l. A partir de dicho punto, no se observa incremento en el factor de concentración pese al aumento de las plaquetas en el PRP, lo que indica que estas muestras de PRP se obtuvieron en pacientes con un número de plaquetas en sangre mayor. Esta relación viene expresada en el siguiente modelo estadístico (tabla 10).

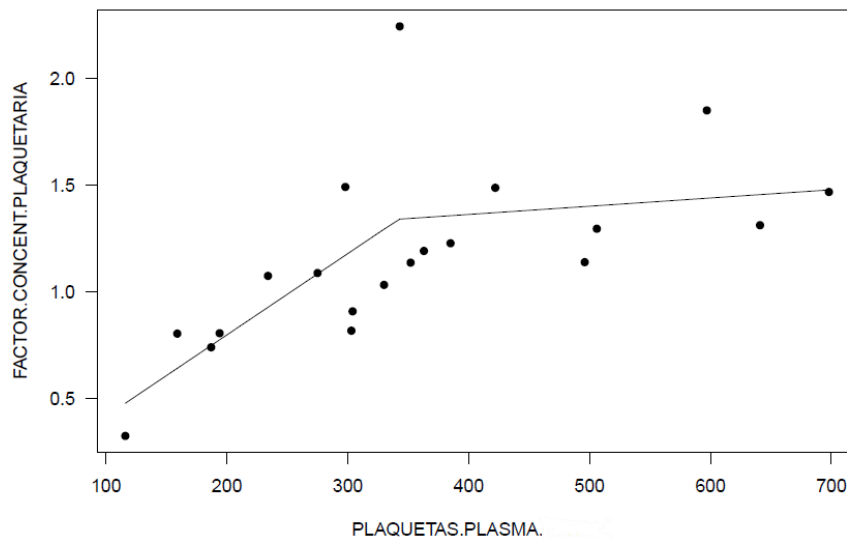


Figura 29. Relación entre el número de plaquetas del PRP ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y su factor de concentración (siendo este la relación entre el número de plaquetas del PRP y el número de plaquetas del paciente).

	Log OR	Error estándar	t Valor	P-Valor
(Intercept)	0,035246	0,366777	0,096	0,0196
PLAQUETAS.PLASMA.	0,003808	0,001469	2,593	0,0196
U1.PLAQUETAS.PLASMA.	-0,003423	0,001687	-2,029	NA
Estimated Break-Point	342,331	69,281		

Tabla 10. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y el factor de concentración plaquetaria.

#### 4.2. ¿Existe correlación entre la concentración de plaquetas y los factores de crecimiento?

##### PDGF

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de PDGF cuantificado (tabla 11).

	Log OR	Error estándar	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
(Intercept)	2,964	1,283	0,269	5,659	0,033
PLAQUETAS.PLASMA.	0,002	0,003	-0,005	0,009	0,601

Tabla 11. Relación entre el número de plaquetas del PRP y la concentración de PDGF.

## EGF

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de EGF cuantificado (tabla 12 y figura 30).

	Log OR	Error estándar	t valor	P-valor
<i>(Intercept)</i>	-3,77051	4,65595	-0,810	0,430
PLAQUETAS.PLASMA.	0,01672	0,02143	0,780	0,447
U1.PLAQUETAS.PLASMA.	-0,01844	0,02263	-0,815	NA
<i>Estimated Break-Point</i>	301,248	148,010		

Tabla 12. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y la concentración de EGF.

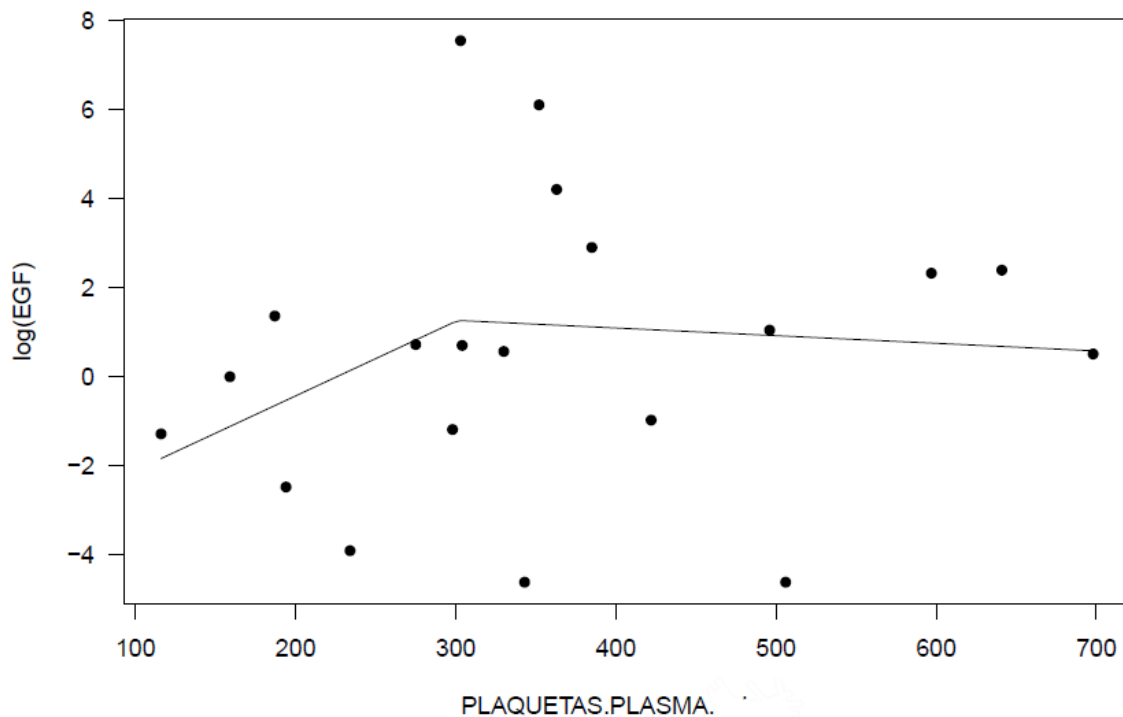


Figura 30. Relación entre el número de plaquetas en el PRP ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y la concentración de EGF ( $\text{pg/ml}$ ).

**FGF**

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de FGF cuantificado (tabla 13 y figura 31).

	<b>Log OR</b>	<b>Error estándar</b>	<b>t valor</b>	<b>P-valor</b>
<i>(Intercept)</i>	0,295658	1,192273	0,248	0,807
PLAQUETAS.PLASMA.	0,006485	0,005189	1,250	0,229
U1.PLAQUETAS.PLASMA.	-0,008676	0,005607	-1,547	NA
<i>Estimated Break-Point</i>	303,408	78,785		

Tabla 13. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y la concentración de FGF.

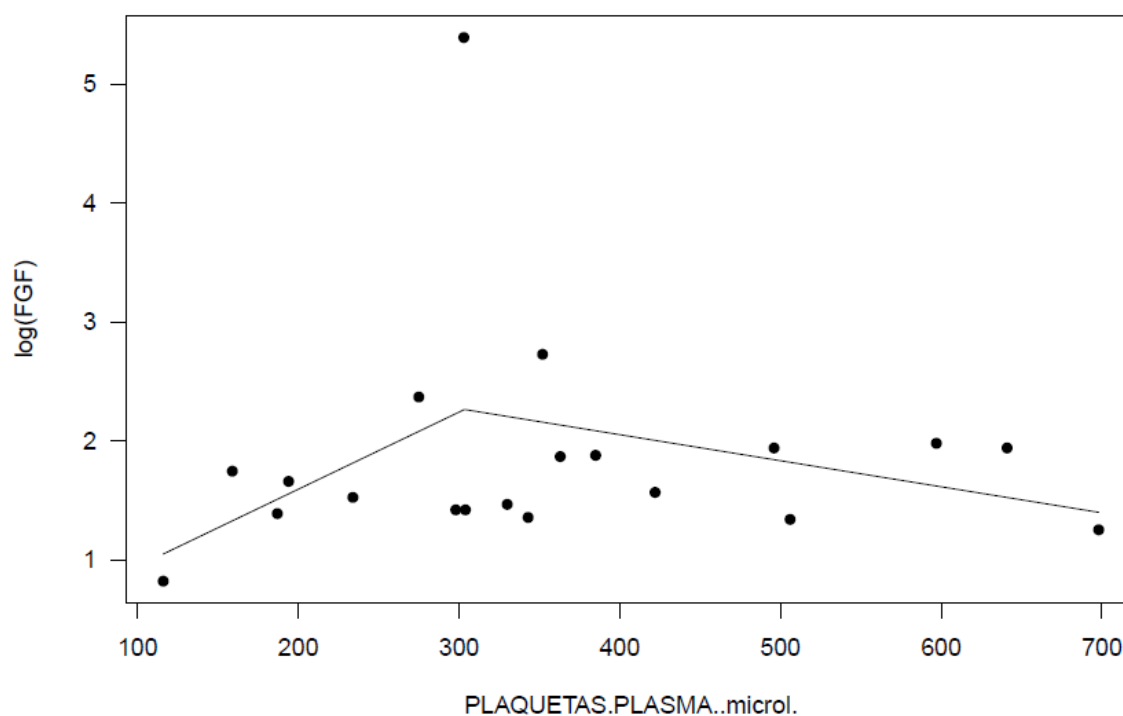


Figura 31. Relación entre el número de plaquetas en el PRP ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y la concentración de FGF (pg/ml).

**VEGF y TGF- $\beta$** 

No se pudo llevar a cabo el análisis estadístico para estos dos factores debido su elevado porcentaje de ausencia en las muestras de PRP cuantificadas, el 60% de las muestras para el VEGF y el 85% de las muestras para el TGF- $\beta$ .

#### 4.3. ¿Existe relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y los factores de crecimiento cuantificados en las muestras?

##### PDGF

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de PDGF cuantificado (tabla 14 y figura 32).

	Log OR	Error estándar	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>(Intercept)</i>	4,154	1,552	0,894	7,414	0,015
FACTOR.CONCENT .PLAQUETARIA	-0,482	1,251	-3,111	2,147	0,705

Tabla 14. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de PDGF.

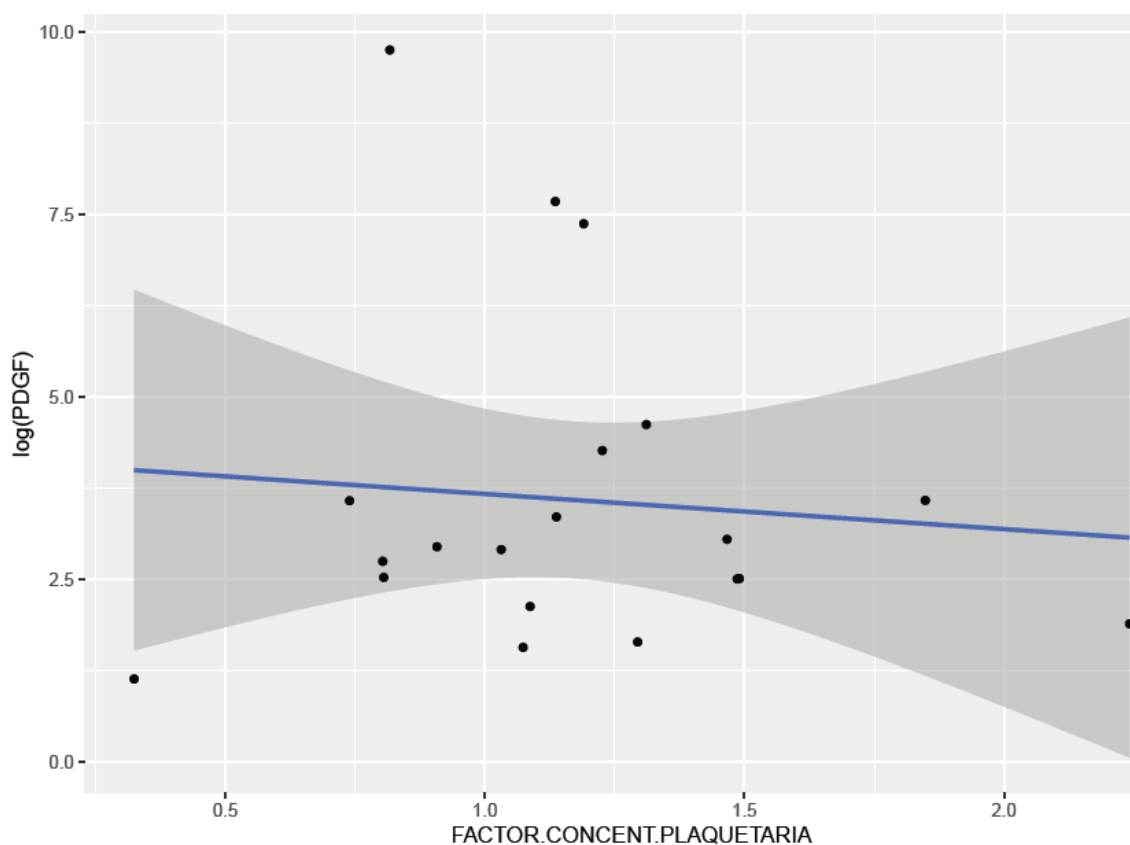


Figura 32. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de PDGF (pg/ml).

**EGF**

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de PDGF cuantificado (tabla 15 y figura 33).

	<b>Log OR</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Inferior al 95%</b>	<b>Superior al 95%</b>	<b>P-valor</b>
<i>(Intercept)</i>	2,445	2,197	-2,169	7,06	0,28
FACTOR.CONCENT .PLAQUETARIA	-1,602	1,771	-5,324	2,12	0,378

Tabla 15. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de EGF.

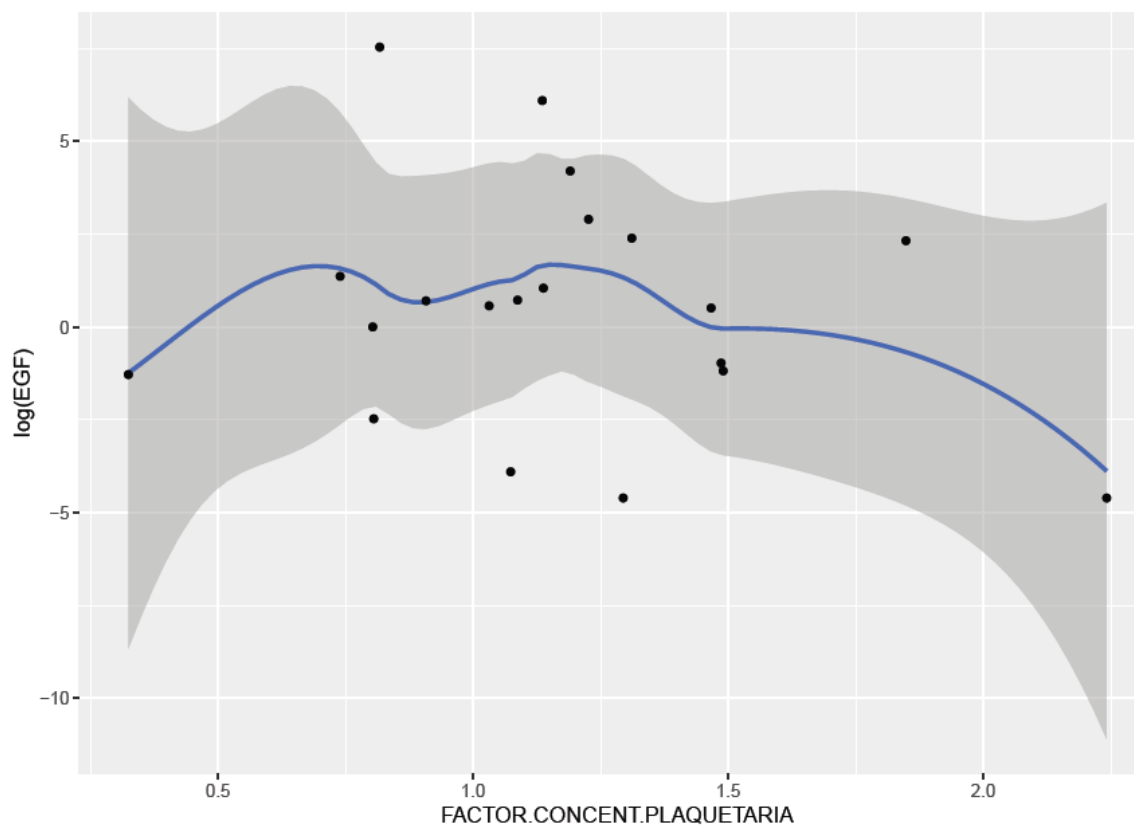


Figura 33. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de EGF (pg/ml).



**FGF**

No se ha encontrado relación entre el número de plaquetas en el PRP y el valor de FGF cuantificado (tabla 16 y figura 34).

	Log OR	Error estándar	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>(Intercept)</i>	2,149	0,646	0,793	3,505	0,004
FACTOR.CONCENT.PLAQUETARIA	-0,254	0,521	-1,347	0,84	0,632

Tabla 16. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de FGF

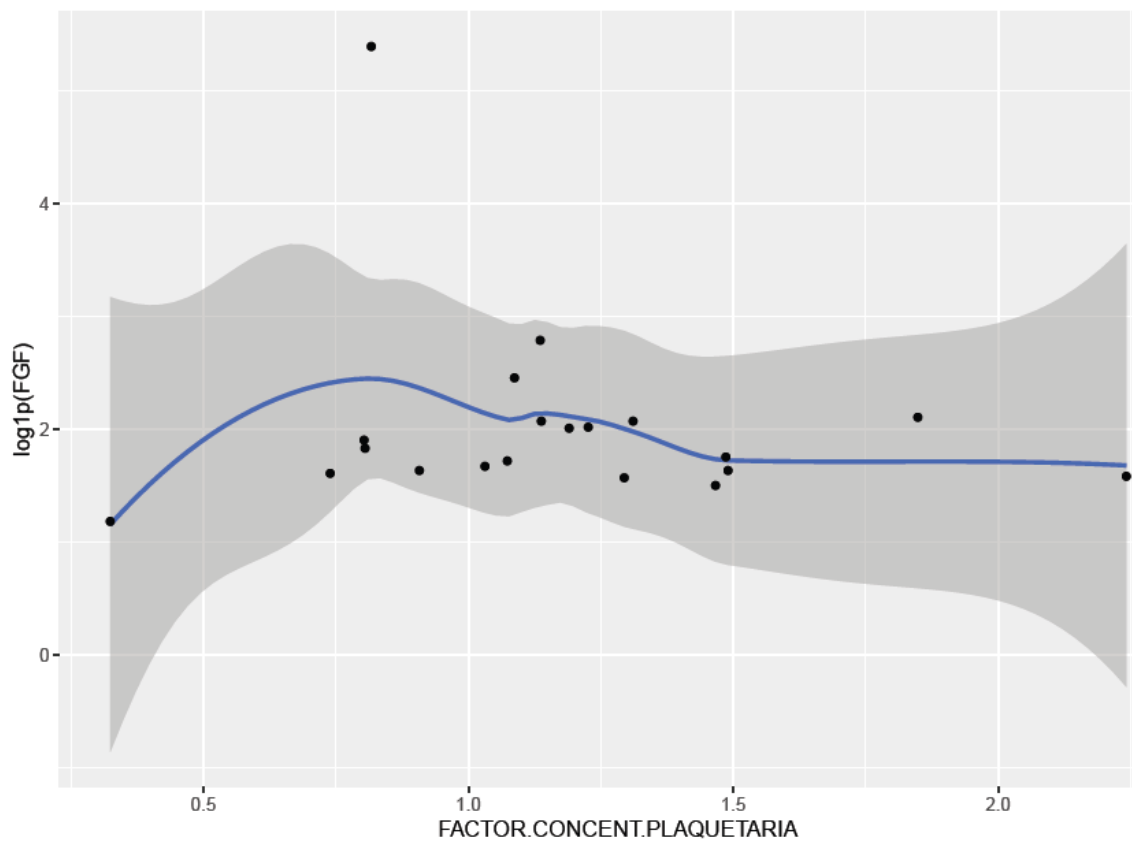


Figura 34. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de FGF (pg/ml).

**VEGF y TGF- $\beta$** 

No se pudo llevar a cabo el análisis estadístico para estos dos factores debido su elevado porcentaje de ausencia en las muestras de PRP cuantificadas.

**4.4. Relación entre las variables edad, SCTQ, plaquetas antes de la intervención, plaquetas en el momento de la intervención, hematocrito antes de la intervención y hematocrito en el momento de la intervención con plaquetas plasma, factor de concentración plaquetaria, factor PDGF, factor TGF- $\beta$ , factor EGF, factor VEGF y factor FGF.**

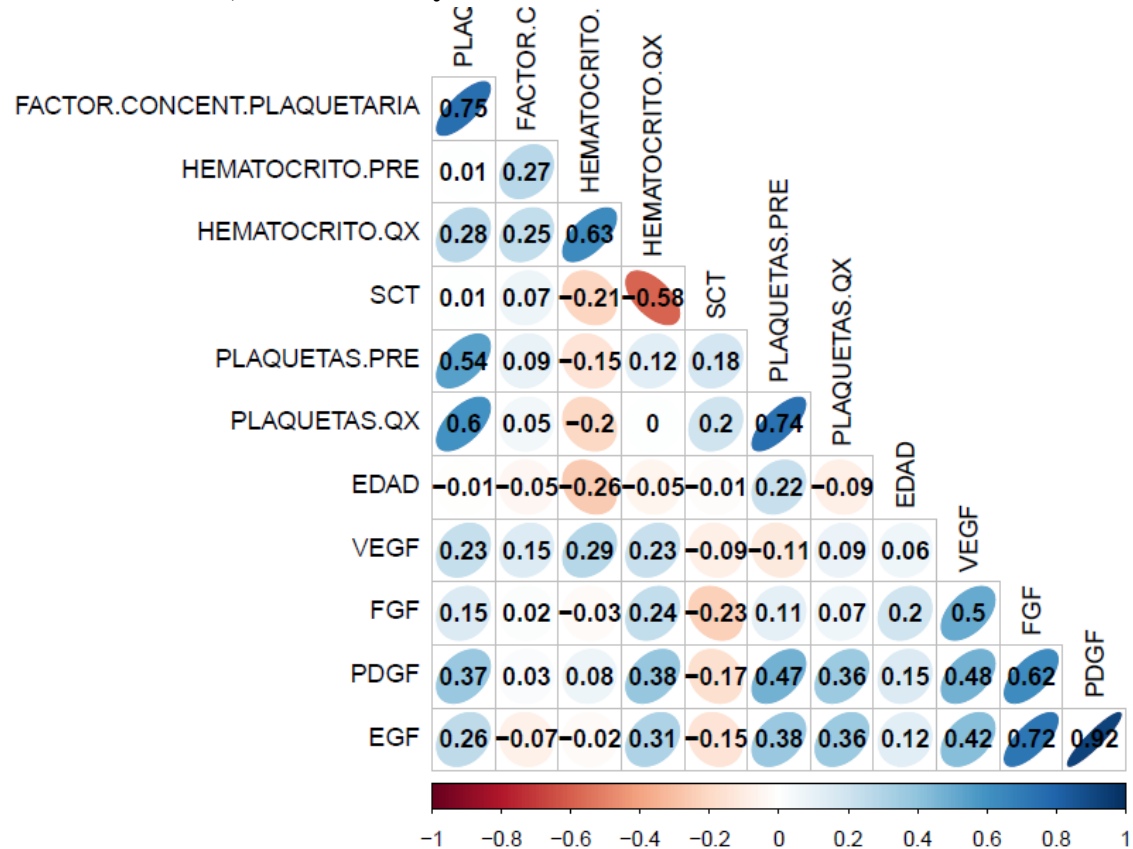


Figura 35. Gráfico de correlación entre variables.

Podemos apreciar una correlación positiva en nuestra muestra entre (figura 35):

- Factor de concentración plaquetaria y el número de plaquetas en el PRP (coeficiente de correlación de Spearman ( $\rho$ ) 0,75).
- Hematocrito en el momento de la intervención y el hematocrito preoperatorio ( $\rho$  0,63).
- Plaquetas del paciente en el momento de la intervención y plaquetas en el PRP ( $\rho$  0,6).
- Plaquetas del paciente en el momento de la intervención y plaquetas del paciente en el preoperatorio ( $\rho$  0,74).
- Factor FGF y VEGF ( $\rho$  0,5).
- Factor PDGF y FGF ( $\rho$  0,62).
- Factor EGF y Factor FGF ( $\rho$  0,72).

- Factor EGF y Factor PDGF ( $\rho$  0,92).

Además se observa una correlación negativa entre la SCTQ y el hematocrito en el momento de la intervención ( $\rho$  -0.58).

## 5. Paciente

### 5.1. Porcentaje de cicatrización de cada zona de tratamiento en cada paciente en función del tiempo.

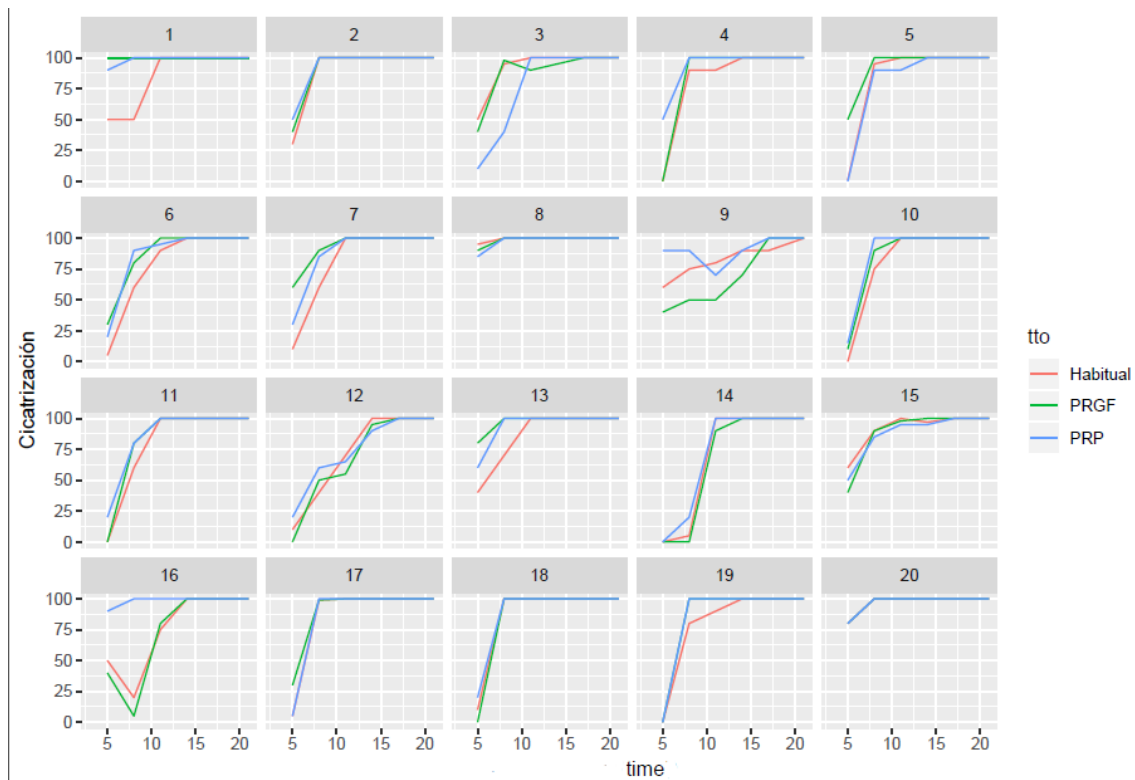


Figura 36. Cicatrización de cada zona de tratamiento en cada paciente en función del tiempo (días).

Podemos apreciar la tendencia a una mayor pendiente de la curva de cicatrización/tiempo para las zonas tratadas con PRGF y PRP en los primeros 8 días (figura 36).

## 5.2. Evolución de la cicatrización en función del tratamiento empleado.

En la siguiente tabla (tabla 17) presentamos el porcentaje de cicatrización de cada grupo de tratamiento en cada visita de estudio durante el periodo de evaluación.

Variable	Habitual n = 20	PRGF n = 20	PRP n = 20
	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup>Q)</i>	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup>Q)</i>	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup>Q)</i>
<i>Cicatrización 5º día</i>	27,8 (30,37) 10 (0,75; 50)	36,5 (32,65) 40 (0; 52,5)	39,25 (33,3) 25 (13,75; 65)
<i>Cicatrización 8º día</i>	73,2 (27,87) 77,5 (60; 96)	81,6 (31,08) 98,5 (80; 100)	87 (22,21) 100 (85; 100)
<i>Cicatrización 11º día</i>	94,75 (9,39) 100 (90; 100)	93,15 (14,85) 100 (96; 100)	95,75 (10,04) 100 (98,75; 100)
<i>Cicatrización 14º día</i>	99,35 (2,3) 100 (100; 100)	98 (6,77) 100 (100; 100)	98,75 (3,19) 100 (100; 100)
<i>Cicatrización 17º día</i>	99,5 (2,24) 100 (100; 100)	100 (0) 100 (100; 100)	100 (0) 100 (100; 100)
<i>Cicatrización 21º día</i>	100 (0) 100 (100; 100)	100 (0) 100 (100; 100)	100 (0) 100 (100; 100)

*Tabla 17. Porcentaje de cicatrización de cada grupo de tratamiento en cada visita de estudio durante el periodo de evaluación.*

En el gráfico de supervivencia se representan el porcentaje de zonas cicatrizadas totalmente de cada tratamiento en función del tiempo (figura 37). Observamos que existe un mayor porcentaje de cicatrización 100% en las zonas tratadas con PRP y PRGF en el intervalo entre el 8º y 11º día. En el 8º día de seguimiento el 55% de las zonas tratadas con PRP y el 45% de las zonas tratadas con PRGF han cicatrizado totalmente frente al 20% de las zonas tratadas con el tratamiento habitual. La mediana de cicatrización 100% es menor en las zonas tratadas con PRP que en las tratadas con PRGF o el tratamiento habitual (tabla 18). No obstante, no se alcanzó significación estadística ( $p = 0,7$ ).

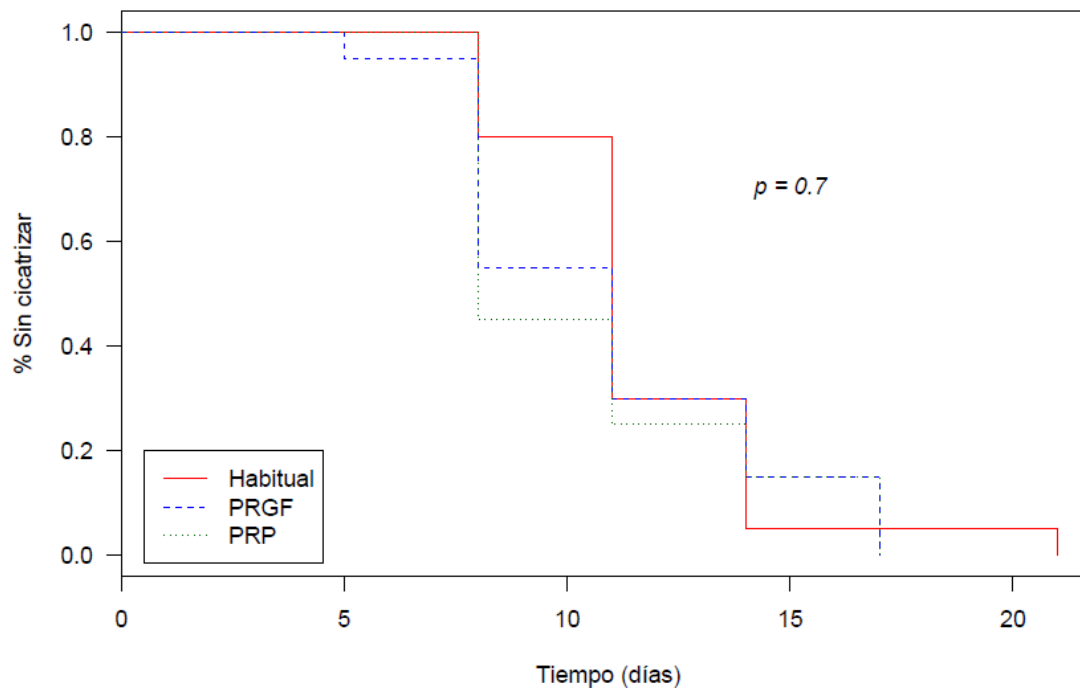


Figura 37. Gráfico de supervivencia: representación del porcentaje de zonas cicatrizadas 100% de cada tratamiento en función del tiempo.

	N	Mediana (días)	Inferior al 95%	Superior al 95%
<i>Habitual</i>	20	11	11	14
<i>PRGF</i>	20	11	8	14
<i>PRP</i>	20	8	8	14

Tabla 18. Tiempo cicatrización 100% con cada tratamiento.

### 5.3. Estimación de los efectos de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual en cada visita de evaluación

Día 5	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	1,408	0,467	4,275	0,542
<i>PRP</i>	1,86	0,631	5,585	0,262

Tabla 19. Efecto sobre la cicatrización de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 5° día postoperatorio.

Tanto el tratamiento con PRGF como el PRP se observaron valores más altos de cicatrización que con el tratamiento habitual, pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a los 5 días de evolución (tabla 19).

Día 8	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	2,47	0,812	7,75	0,114
<i>PRP</i>	3,397	1,104	10,979	0,036

Tabla 20. Efecto sobre la cicatrización de *PRGF* y *PRP* respecto al tratamiento habitual el 8° día postoperatorio.

A los 8 días de evolución, el porcentaje de cicatrización de las zonas tratadas con *PRP* o *PRGF* fue mayor que el alcanzado en las zonas tratadas con el tratamiento habitual (tabla 20). Observamos diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con *PRP* frente al tratamiento habitual ( $p = 0,036$ ).

Día 11	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	0,982	0,255	3,784	0,979
<i>PRP</i>	1,342	0,339	5,495	0,674

Tabla 21. Efecto sobre la cicatrización de *PRGF* y *PRP* respecto al tratamiento habitual el 11° día postoperatorio.

El 11° día el porcentaje de cicatrización de las zonas tratadas con *PRGF* y tratamiento habitual se iguala (tabla 21). No obstante, se continúa observando un mayor porcentaje de cicatrización en las zonas tratadas con *PRP*. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en este caso.

Día 14	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	0,609	0,074	4,092	0,61
<i>PRP</i>	0,6	0,072	4,034	0,599

Tabla 22. Efecto sobre la cicatrización de *PRGF* y *PRP* respecto al tratamiento habitual el 14° día postoperatorio.

El día 14 no se observan diferencias entre los porcentajes de cicatrización de los distintos tratamientos, sin diferencias estadísticamente significativas (tabla 22).

#### 5.4. Dolor

Con respecto a la variable dolor, tanto en las zonas tratadas con *PRGF* como aquellas tratadas con *PRP* se observaron valores medios inferiores en las visitas al 5° y 8° día postoperatorio, con respecto a aquellas tratadas con el tratamiento habitual. El 3° día el dolor medio referido en las zonas tratadas con el tratamiento habitual y las tratadas con *PRP* fue aproximadamente el mismo, 1,15 vs 1,2 respectivamente. En comparación, las

zonas tratadas con PRGF mostraron un dolor medio de 0,65 durante dicha visita postoperatoria (tabla 23).

	<b>grupo Habitual n = 20</b>	<b>grupo PRGF n = 20</b>	<b>grupo PRP n = 20</b>
	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</i>	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</i>	<i>Media (SD)</i> <i>Mediana (1<sup>er</sup>; 3<sup>er</sup> Q)</i>
<i>EVA 3<sup>er</sup> día</i>	1,15 (2,16) 0 (0; 1)	0,65 (1,57) 0 (0; 0,25)	1,2 (2,09) 0 (0; 1,25)
<i>EVA 5<sup>o</sup> día</i>	0,75 (1,16) 0 (0; 1)	0,7 (1,26) 0 (0; 1)	0,5 (1,4) 0 (0; 0)
<i>EVA 8<sup>o</sup> día</i>	0,3 (0,8) 0 (0; 0)	0,1 (0,31) 0 (0; 0)	0 (0) 0 (0; 0)

Tabla 23. Dolor (EVA) en las distintas zonas de tratamiento a los 3, 5 y 8 días postoperatorios.

En el siguiente modelo se analizan las diferencias en cuanto a la variable dolor entre los tratamientos PRGF o PRP con respecto al tratamiento habitual. Aunque se observa una disminución en cuanto a las zonas tratadas con PRGF respecto a las tratadas con el tratamiento habitual, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos (tabla 24). Datos concordantes con el gráfico de barras de error, dolor en función de tratamiento aplicado al 3<sup>er</sup> día (figura 38).

<b>Día 3</b>	<b>OR</b>	<b>Inferior al 95%</b>	<b>Superior al 95%</b>	<b>P-valor</b>
<i>PRGF</i>	0,588	0,146	2,235	0,438
<i>PRP</i>	1,211	0,347	4,293	0,763

Tabla 24. Efecto sobre la variable dolor de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 3<sup>o</sup> día postoperatorio.

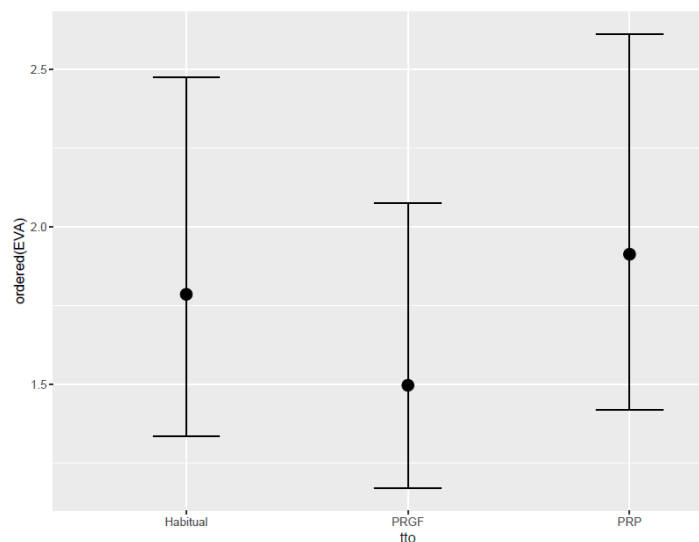


Figura 38. Representación gráfica de la variable dolor (EVA) el 3º día postoperatorio según el tipo de tratamiento.

El 5º día postoperatorio se observaron valores menores de dolor en las zonas tratadas con PRGF o PRP respecto al tratamiento habitual (0,817 y 0,395 respectivamente), siendo en este caso menor en las tratadas con PRP. No obstante, ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas (tabla 25). Representación gráfica del dolor en función de tratamiento aplicado al 5º día (figura 39).

Día 5	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
PRGF	0,817	0,231	2,837	0,75
PRP	0,395	0,09	1,533	0,192

Tabla 25. Efecto sobre la variable dolor de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 5º día postoperatorio.

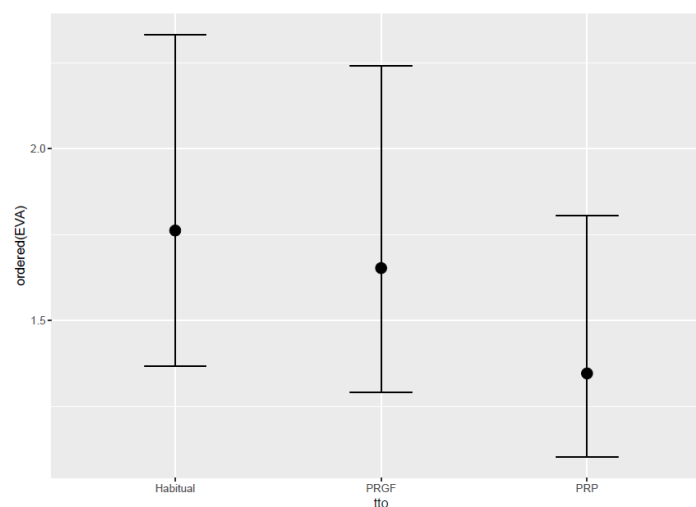


Figura 39. Representación gráfica de la variable dolor (EVA) el 5º día postoperatorio según el tipo de tratamiento.



## 5.5. Tasa de infección

En ninguna de las zonas se objetivó ningún proceso infeccioso en ninguna de las curas, independientemente del tipo de tratamiento aplicado. Por lo tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la tasa de infección entre los distintos tratamientos.

## 5.6. Calidad de cicatrización

### 5.6.1. VSS

En cuanto a la calidad de la cicatrización de las distintas zonas tratadas, se observaron valores inferiores respecto a la escala Vancouver, en las zonas tratadas con PRP y PRGF respecto al tratamiento habitual, siendo más notoria esta diferencia en las tratadas con PRP (figura 40). No obstante, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (tabla 26).

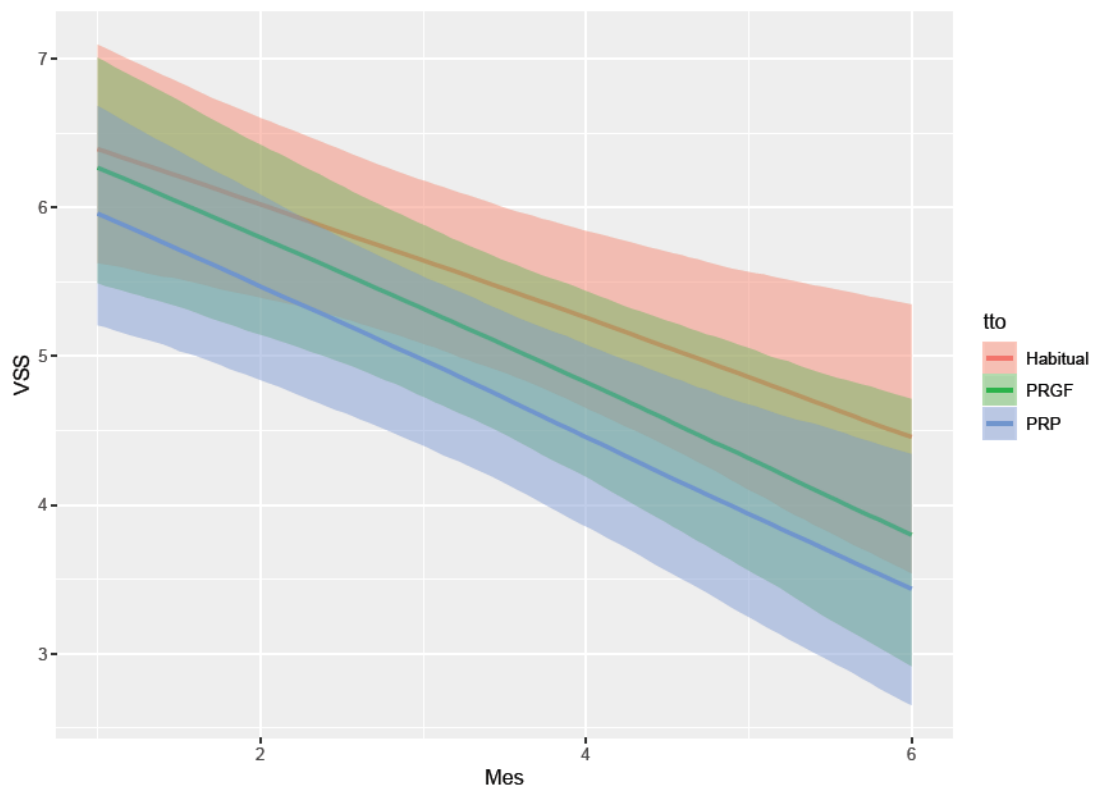


Figura 40. Representación gráfica de la medida de la calidad de cicatrización con VSS de cada tratamiento en función del tiempo (meses).

	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	0,972	0,29	3,255	0,963
<i>PRP</i>	0,72	0,215	2,405	0,593
<i>Mes</i>	0,7	0,556	0,883	0,003
PRGF:Mes	0,912	0,663	1,255	0,574
PRP:Mes	0,909	0,663	1,248	0,556

Tabla 26. Efecto sobre la cicatrización (VSS) de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual.

### 5.6.2. POSAS

Cuando utilizamos la escala POSAS para la cuantificación de la calidad de la cicatrización, se observaron valores inferiores en las zonas tratadas con PRP respecto al tratamiento habitual. Las zonas tratadas con PRGF se comportaron de forma similar al tratamiento habitual (figura 41). No obstante, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (tabla 27).

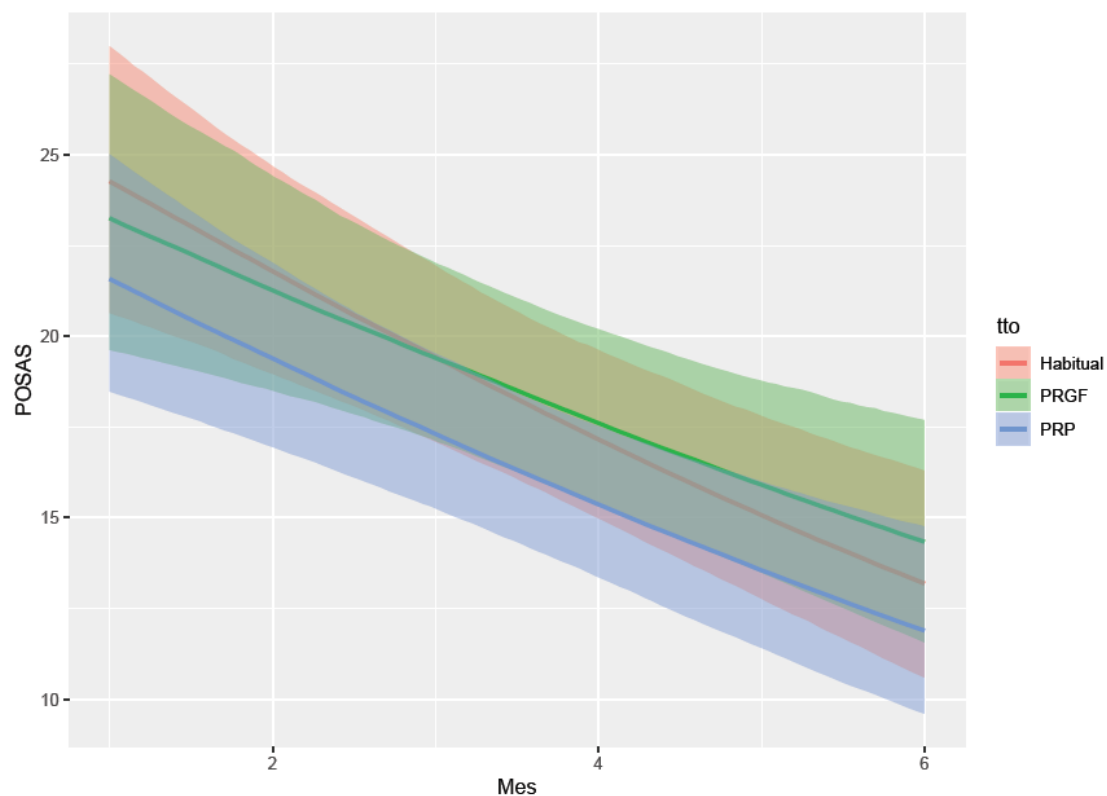


Figura 41. Representación gráfica de la medida de la calidad de cicatrización con POSAS de cada tratamiento en función del tiempo (meses).

	OR	Inferior al 95%	Superior al 95%	P-valor
<i>PRGF</i>	1,026	0,54	1,948	0,938
<i>PRP</i>	0,671	0,36	1,25	0,209
<i>Mes</i>	0,654	0,568	0,753	<0,001

Tabla 27. Efecto sobre la cicatrización (POSAS) de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual.

### 5.6.3. Relación VSS y POSAS en función del tiempo

Los valores de las escalas POSAS y VSS presentan una relación positiva, apreciándose valores inferiores a medida que la cicatrización de las zonas tratadas evoluciona en el tiempo (figura 42).

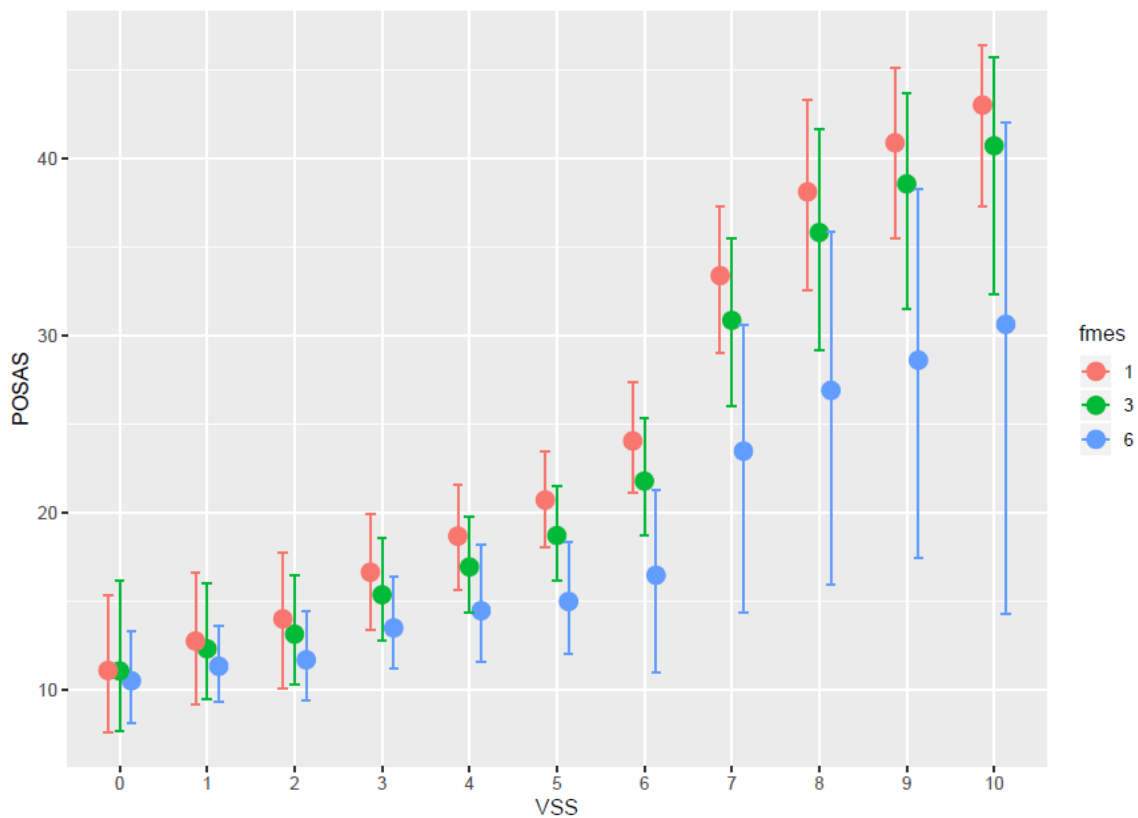


Figura 42. Representación gráfica de la relación entre las escalas POSAS y VSS al mes, 3 meses y 6 meses postoperatorios.



# Discusión



## 1. ¿Por qué hay tantas dificultades para analizar comparativamente los resultados clínicos aportados por grupos diferentes?

Los estudios basados en revisiones bibliográficas y meta-análisis se encuentran frecuentemente con la dificultad añadida de la falta de detalle con la que se describen los protocolos utilizados y también con el inconveniente de que, generalmente, la valoración de resultados no está exenta de una importante componente subjetiva. Por todo ello, la comparación de resultados entre diferentes estudios es ciertamente compleja.

En general, los trabajos disponibles corresponden a reportes de casos o ensayos clínicos retrospectivos, más que prospectivos aleatorios. En cuanto al diseño experimental, en algunos casos no se dispone de grupo control y, en otros, el uso de PRP se enfrenta al placebo, no al *gold standard* utilizado en la patología tratada.

El perfil de los pacientes también puede condicionar los resultados. En general, cuanto más joven es el paciente, más rápida es la recuperación y también se obtienen mejores resultados en el tratamiento de lesiones agudas frente a crónicas (Ahmad y cols., 2012). Y las comorbilidades (diabetes, vasculo-neuropatías, enfermedades autoinmunes e infecciones) se asocian a peor resultado (Borzini y Mazzucco, 2007). Incluso Miller y cols. (2017), en una revisión sobre tratamiento de tendinopatías, observaron más eficacia clínica en el caso de mujeres. En el mismo sentido, Filardo y cols. (2011) trataron condropatías con PRP, observando más efecto beneficioso en los pacientes más jóvenes, con menor índice de masa corporal y menor grado de degeneración condral. En este caso, resultando aparentemente mejor en hombres que en mujeres.

Seguidamente, se detallan otros parámetros que pueden interferir el análisis comparativo de resultados con el uso del PRP:

- Variación interindividual:
  - Concentración basal de plaquetas: cuando se citan concentraciones de 3x, 10x etc. se desconoce qué valores concretos de concentración representan. Por ejemplo, un valor 3x para un paciente con un valor basal de 150.000pq/ $\mu$ L sería análogo a un valor 1x para un paciente con valor basal de 450.000pq/ $\mu$ L.
  - Concentración de factores de crecimiento: el contenido de los gránulos  $\alpha$  no es uniforme. Su determinación tiene un elevado coste, por lo que no

suele indicarse en los artículos, especialmente cuando se trata de trabajos de exposición de resultados clínicos. Se sabe que hay factores de crecimiento que producen respuestas antagónicas en función de su concentración.

- Hematocrito: especialmente en los valores más extremos podría suponer cierta variabilidad en los resultados, sobre todo cuando se utilizan protocolos con una sola centrifugación.
- Parámetros de centrifugación:
  - Número: el riesgo de activación se incrementa con cada procedimiento.
  - FCR: citar las revoluciones por minuto es insuficiente para reproducir un protocolo si se desconoce el radio de centrifugación.
  - Tiempo: el rango es amplio, independientemente del número de centrifugaciones (1 o 2).
  - Recipiente: se debe describir el contenedor utilizado (bolsa o tubo, por ejemplo), así como el volumen de sangre procesado.
  - Temperatura: puede afectar al rendimiento del proceso.
- Tipo de anticoagulante: siendo ACD y EDTA los más utilizados, podría haber diferencias en los resultados del procesamiento asociados a este elemento.
- Presencia de glóbulos blancos: es importante conocer este dato ya que ha sido citado por algunos autores como ventajosa, mientras otros opinan que debe ser evitada.
- Tipo de producto final: las plaquetas no son meros transportadores de factores de crecimiento, sino que participan activamente en el proceso de regeneración tisular.
  - Plasma rico en plaquetas.
  - Plasma rico en factores de crecimiento: ya sea mediante inducción de la activación plaquetaria (con/sin coagulación) o criofractura (cuántos ciclos). En este caso, la ausencia de plaquetas supone que los eventos que se desarrollen no contarán con su participación directa.
- Metodología de uso clínico:
  - Dosificación: volumen, aplicación única o periódica (número, intervalo).
  - Inducción previa de la coagulación.
  - Sistema de aplicación: infiltración, uso tópico (gel, aerosol).



- Evaluación de resultados:
  - El estudio histológico supone un riesgo de morbilidad para el paciente complejo de asumir. Por esta razón, generalmente se utilizan (sobre todo en lo relativo al tejido músculo-esquelético) tablas estandarizadas (WOMAK, IKDK, VAS, etc) para valorar parámetros y establecer también el grado de satisfacción del paciente (con la subjetividad que esto supone, por ejemplo, en cuanto a la tolerancia al dolor).
  - El tiempo de evolución es muy importante, sobre todo a la hora de obtener información a largo plazo.
  - Establecimiento del grupo control. Debe compararse con terapias convencionales, habitualmente empleadas en el tratamiento de la patología concreta.
  - Tipo de patología: agudas vs. crónicas. La evolución de la patología puede llevar asociadas alteraciones en la expresión para determinados ligandos para factores de crecimiento a nivel de membrana celular.
  - Perfil del paciente: edad y sexo también se han apuntado en algunos casos como parámetros a tener en cuenta.

## 2. Umbral terapéutico PRP

Cuando se utiliza el factor por el que se multiplica el valor basal de concentración de plaquetas como evidencia del rendimiento de la técnica, hay que tener presente la variabilidad interindividual. Así, se consideran normales valores entre 150 y 400 x10<sup>9</sup>/L. Por esta razón, se ha decidido establecer un umbral para conseguir efecto terapéutico.

Ciertamente, no ha sido posible encontrar ningún artículo en la literatura científica en el que se demuestre comparativamente que sea necesario concentrar las plaquetas un determinado valor mínimo, en seres humanos. Hom y cols. (2007) sugieren un mayor efecto con más concentración, pero con un tamaño poblacional escaso (8 individuos), siendo además personas sanas y con algunas lagunas en la descripción de la variabilidad interindividual que dificulta la interpretación de los resultados.

Analizando detalladamente aquellos artículos en los que se utiliza un lisado plaquetario o un sobrenadante de plaquetas activadas, como suplemento de un medio de cultivo celular *in vitro*, estos productos tienen un máximo de eficacia sobre el crecimiento celular cuando se utilizan diluidos al 10-20% en el medio de cultivo basal. En alguno de los

casos, esto supone diluir la concentración de factores entre 5 y 10 veces, esto es, dejándola en lo que teóricamente sería su concentración basal o incluso menor (considerando que durante el procesamiento la concentración basal se multiplica entre 5 y 10 veces).

Concretamente, una de las referencias más citada es la propuesta por Marx (2001), según la cual se requiere una concentración de  $10^6$  pq/ $\mu$ l para obtener un efecto terapéutico, no obteniéndose mejores resultados con mayor concentración. Aunque lo cierto es que éste, siendo un estándar con cierto grado de aceptación, se ha establecido con escaso análisis científico comparativo. De hecho, el propio Marx (2004), en un trabajo posterior, justifica que es mejor un incremento 4-5 veces el basal (que es a lo que corresponde aproximadamente la concentración plaquetaria antes citada como umbral), aunque fundamentando su afirmación en un ensayo *in vitro*, utilizando el producto al 10% (por tanto correspondiendo aproximadamente a la mitad de la concentración plaquetaria basal en sangre) como suplemento del medio de cultivo para células mesenquimales.

En un estudio con conejos Weibrich y cols. (2004) observan mayor efecto terapéutico con  $10^6$  pq/ $\mu$ l, pero también un efecto inhibitorio a concentraciones altas.

Precisamente, la citada utilidad como suplemento del medio de cultivo ofrece algunos datos que merecen una reflexión, por su relación con el uso clínico de los factores obtenidos de plaquetas. Así, en el caso de Baik y cols. (2014), el lisado plaquetario al 5% proporciona mayor tasa de proliferación de una línea celular de queratinocitos que al 10%. Crespo-Díaz y cols. (2011) usa el lisado plaquetario (obtenido de plaquetoaféresis caducas) al 1%, 2,5% y 5% en medio especial mínimo con células mesenquimales de médula ósea y grasa, observando que el 5% es la concentración más eficaz (por encima también del SBF al 10%).

Barsotti y cols. (2013) observan que el lisado plaquetario al 10 y 20% incrementa la viabilidad, proliferación, migración y activación de la ruta reparadora en diversos tipos celulares *in vitro*; la angiogénesis sólo con el 20%. Prepara el PRP a partir de sangre total, centrifugando a 1500g para sedimentar las plaquetas, que se resuspenden en salino (a razón de  $1,3 \times 10^9$ /ml) y se someten a 3 ciclos de congelación (-80 °C)-descongelación (37 °C). Un 10-20% del lisado plaquetario se correspondería con el contenido de una concentración de plaquetas en rango fisiológico.

Graziani (2006) informa que siendo el efecto del PRP activado sobre osteoblastos y fibroblastos dosis-dependiente, incrementa la proliferación *in vitro* con valores 2,5x sobre la concentración en sangre total, pero pierde eficacia al aumentar la concentración. Llama la atención en este estudio que la tasa proliferativa de los osteoblastos fue mayor con el uso de suero bovino al 10% que con las distintas concentraciones de PRP utilizadas. De hecho, Schallmoser (2007) observa que el lisado plaquetario puede ser un sustituto (al 10%) del suero bovino fetal para la expansión *ex vivo* de células mesenquimales.

Mazzocca (2015) estudia tenocitos *in vitro* observando el efecto de PRP obtenido con 1 ó 2 centrifugaciones y aplicado con frecuencias variables, al 10% como suplemento del medio de cultivo. Con 1 centrifugación obtienen entre  $195 \times 10^3$  pq/ $\mu$ l y  $281 \times 10^3$  pq/ $\mu$ l y con 2 entre  $131 \times 10^3$  pq/ $\mu$ l y  $523 \times 10^3$  pq/ $\mu$ l. La mayor o menor concentración de plaquetas no generó diferencias, en ambos casos se incrementó la proliferación. El efecto es relevante tras la primera aplicación, aunque también tienen cierto efecto positivo las sucesivas aplicaciones, tanto si se repitió dos veces cada 2 ó 4 días. El PRP se obtiene el mismo día de su aplicación.

Cholewa (2011) expone células mesenquimales de grasa *in vitro* a concentraciones crecientes (1%, 5%, 10%, 20%) de lisado plaquetario obtenido a partir de una concentración de plaquetas entre 1 y  $2 \times 10^{12}$  pq/l. Observa una elevación de la tasa proliferativa dosis-dependiente, sin alteración del potencial adipogénico ni osteogénico.

Giusti (2009) determina que la mejor concentración para estimular la angiogénesis en células endoteliales humanas es  $1,5 \times 10^{12}$  y que concentraciones inferiores o superiores tienen menos efecto. Se trata de un ensayo *in vitro*, con doble centrifugación y coagulación con gluconato cálcico y trombina. Una vez coagulado, en unos 5min, se centrifuga y, el sobrenadante, después de otras centrifugaciones para retirar material residual, se usa para el ensayo. Supone el autor que para la misma concentración de plaquetas hay una misma concentración de factores, lo cual no puede asegurarse, ya que no está clara la correlación entre número de plaquetas y concentración de factores. Por otro lado, tras 5min de coagulación y 10min de centrifugación no está claro que se hayan liberado todos los factores. Tampoco es descartable que el menor efecto con la concentración más alta pudiera deberse a que, lógicamente, el medio basal (DMEM) está más diluido. Los autores deberían haber determinado la concentración de factores para asentar sus conclusiones. El ensayo de cicatrización generando una discontinuidad en el

cultivo revela que la concentración 5 veces menor a la supuestamente óptima fue la más eficaz. Unos años después (Giusti y cols., 2014) expone tenocitos *in vitro* a concentraciones de 0,5% al 5%, en medio de cultivo, de sobrenadante de gel de PRP (partiendo de una concentración plaquetaria entre  $4,3$  y  $5,8 \times 10^{12}$ ) y observa los mejores resultados con la concentración más baja, teniendo además la más elevada un efecto negativo sobre la proliferación celular y la expresión de moléculas asociadas con la síntesis de matriz extracelular propia de la remodelación tendinosa (quizá por sobreestimar la actividad lítica mediada por proteasas). Yoshida 2014 llega a una conclusión similar con tenocitos y PRP porcinos. Esta misma autora (Giusti, 2018) describe en un tercer trabajo cómo una elevada concentración plaquetaria tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre la motilidad de fibroblastos en el modelo de cicatrización.

Kim (2011) estudia el efecto del PRP sobre fibroblastos cultivados *in vitro*, si bien las plaquetas se concentran 9,4 veces respecto del valor basal, se diluyen primero un 10% con el activador (cloruro cálcico y trombina) y finalmente se prepara a concentraciones entre 1,5% y 10% con el medio de cultivo. La concentración del 5% resulta ser la más eficaz, pero también el PPP se muestra efectivo (más que el suero bovino fetal pero menos que el PRP). En cualquier caso, un indicador que evidencia la activación plaquetaria durante el procesamiento.

Eppley (2004) observa que con la activación (trombina bovina y  $\text{CaCl}_2$ ) se incrementa en el PRP la concentración de los factores entre 3,6 y 6,2 veces. Sorprendentemente, el VEGF, que para algunos autores no es detectable, es el que más se incrementa. Hay que tener presente que este autor coagula el PRP y, aunque luego lo centrifuga y recoge el sobrenadante, ya se ha demostrado que una parte significativa de los factores puede quedar embebida en el gel (Su y cols., 2008).

Broderick (2005) indica que una exposición a concentraciones elevadas de  $\text{TGF-}\beta$  tiene un efecto negativo sobre la mineralización de hueso. En nuestro estudio no se ha detectado  $\text{TGF-}\beta$  en el 85% de las muestras de lisado plaquetario. Si bien esta circunstancia no es frecuente en otros estudios, hay algunas citas en las que se asocia una baja concentración de este factor a un eventual efecto deletéreo del proceso de congelación (Ng y cols. 2013).

Respecto al VEGF, que tampoco ha estado presente en todas las muestras evaluadas en el presente estudio, ya se ha citado anteriormente su ausencia en algunos estudios tanto

en plasma, como lisado plaquetar y PRP (Schallmoser y cols., 2007; Amable y cols., 2013).

En un estudio experimental con cerdos Fleming (2014) observa que la reparación del ligamento cruzado anterior ofrece mejor resultado recubriendo los aloinjertos con concentrado de plaquetas y, especialmente cuando se utiliza una concentración 1x frente a 3x y 5x. Sin embargo, el propio Fleming (2009) había observado previamente que el uso de una concentración 5x sí resulta más eficaz que menor concentración. El autor achaca estas diferencias a que los cerdos de este último estudio (2009) eran más jóvenes que en el otro y, por lo tanto, con mayor potencial reparativo.

Martinez-Zapata (2016) participa en un ensayo clínico prospectivo tratando rotura de músculos gastrocnemio y recto femoral, con aplicación de PRP (activado con cloruro cálcico justo antes de su infiltración) obtenido por aféresis (con una concentración plaquetaria 5 veces superior a la basal). En dicho estudio no se encuentran diferencias significativas estadísticamente entre los pacientes tratados con el PRP y los que siguieron la pauta tradicional para estos casos (reposo, frío, analgésicos, elevación del miembro afectado y evacuación del hematoma).

Liu (2002) estudia el potencial proliferativo de fibroblastos utilizando un lisado plaquetario como suplemento en el medio de cultivo y observa que las concentraciones más elevadas resultan menos eficaces, efecto que imputa a cambios en el pH con dichas concentraciones.

En el mismo sentido, Tavassoli-Hojjati (2016), Wang (2017) y Nguyen (2018) también confirman que las concentraciones más altas de PRP no aportan eficacia en la tasa proliferativa de las células.

Mirabet y cols. (2002) observan que el suero de sangre de cordón umbilical es menos eficaz que el suero humano adulto o el suero bovino fetal para el crecimiento de condrocitos humanos. Además, el suero humano adulto no mejora la proliferación celular cuando se incrementa del 10, al 15 ó 20%. Por otro lado, también se observa un efecto beneficioso con el uso de lisado plaquetario como suplemento de la solución crioprotectora utilizada con hepatocitos (Tolosa, 2011).

Los resultados obtenidos en el presente estudio referente al tratamiento con PRP y PRGF de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados, siendo la

concentración media de plaquetas del PRP en la población analizada  $3,6 \times 10^5 \pm 1,6 \times 10^5$  pq/ $\mu$ l, han evidenciado un mayor porcentaje de cicatrización temprana en las zonas tratadas con PRP y PRGF, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento habitual para el caso del PRP.

La guía de recomendaciones sobre el uso clínico del PRP editada por *The International Cellular Medical Society* (2011), en su capítulo 2 (definición y consideraciones sobre la preparación) alerta sobre la falta de evidencias al respecto de que una mayor concentración plaquetaria proporcione mejores resultados clínicos. Se apunta que incluso podría tener un efecto contraproducente respecto del objetivo perseguido.

### **3. Papel de las vesículas extracelulares y la relación entre la concentración plaquetaria y la de factores de crecimiento.**

Además de factores de crecimiento, la activación plaquetaria conlleva la liberación de vesículas extracelulares. Se trata de un mecanismo protector frente a la degradación de las moléculas bioactivas que contienen. De hecho, estas estructuras biológicas se describieron por primera vez en las plaquetas, definidas como partículas procoagulantes (Chargaff y cols., 1946); posteriormente, Wolf (1967) las denominó *polvo de plaquetas*. Posteriormente, se han descrito vesículas extracelulares derivadas de una gran diversidad de tipos celulares, así como de fluidos biológicos (exudado nasal y bronquial, orina, leche materna, fluido seminal, orina y saliva) (Yáñez-Mo y cols., 2015).

La *International Society of Extracellular Vesicles* (ISEV, <http://www.isev.org>), ha propuesto una clasificación en función de su ruta de biogénesis: cuerpos apoptóticos (liberados en el proceso de invaginación de la membrana plasmática durante la apoptosis), microvesículas o ectosomas (liberadas directamente por gemación de la membrana plasmática) y exosomas (se encuentran en los cuerpos vesiculares y se liberan por fusión de estos con la membrana plasmática) (Colombo y cols., 2014).

Los exosomas son importantes elementos de los mecanismos de comunicación entre plaquetas y células (Huber y cols., 2015). Torregliani (2014) ha demostrado un efecto beneficioso de los exosomas plaquetarios sobre la proliferación, migración y diferenciación osteogénica de células mesenquimales de la médula ósea. Y Guo (2017) ha observado, en un modelo experimental con ratas diabéticas, que promueven la reepitelización de úlceras cutáneas.

Chandler (2013) dice que utilizar un sistema de doble centrifugación reduce muy significativamente el contenido de micropartículas. De las 730.000 micropartículas/ $\mu$ l que hay en el PRP de individuos sanos, unas 27.000 son de origen plaquetario. Estas últimas no aumentan con la congelación/descongelación. Heijnen (1999) observa liberación de microvesículas y exosomas a partir de plaquetas activadas. Estos productos juegan también un papel importante en los procesos de reparación y regeneración tisular, aunque poco estudiado en la actualidad.

Respecto al papel que pueden llegar a desempeñar estas vesículas, Prokopi (2009) ha sugerido que algunas células progenitoras endoteliales podrían tener su origen en monocitos «contaminados» con partículas procedentes de las plaquetas.

El hecho de que los factores de crecimiento puedan encontrarse encapsulados en exosomas podría explicar las diferencias encontradas cuando se determina la concentración de estos factores.

El análisis de la relación entre la concentración de plaquetas y la de factores es también objeto de atención en la literatura. Para Zimmermann (2003) hay una evidente correlación entre ambas concentraciones, cuando se comparan PRPs con amplias diferencias en la concentración plaquetaria; pero es más difícil observar esta correlación si la variación entre las concentraciones evaluadas es escasa. Kevy (2001) también detecta una correlación entre la concentración de plaquetas y la de algunos factores (PDGF, TGF- $\beta$ , EGF) pero no para VEGF e IGF (este último, como veremos más adelante tiene escasa dependencia de las plaquetas). En el mismo sentido, Sundman (2011) encuentra una correlación entre la concentración de plaquetas y la de TGF- $\beta$ 1 y PDGF-AB. Amable y cols. (2013) diferencian entre factores presentes en el plasma y factores realmente secretados por las plaquetas activadas (PDGF-AA, AB, BB; TGF- $\beta$ ; TGF- $\beta$ 2; EGF; IFN- $\alpha$ ; IL-4, 6, 13, 17; TNF- $\alpha$ ). IL-4 e IL-13 anti-inflamatorios y IL-8 y IL-17 proinflamatorias. A diferencia de otros autores, estos no detectan VEGF ni en plasma ni en PRP. Schallmoser (2007) coincide en la ausencia de VEGF en el lisado plaquetario, pero sí aparece con el tiempo de cultivo (sintetizado por las propias células mesenquimales). En nuestro estudio no se detectaron los factores TGF- $\beta$  y VEGF en el 85% y 60% de las muestras, respectivamente.

Weibrich y cols. (2002 y 2003) no ven una clara correlación entre ambos parámetros. No obstante, utilizan un solo ciclo de congelación/descongelación, por lo que puede que no

se obtuviera todo el contenido plaquetario de factores. Tampoco es posible establecer alguno de los factores como referencia del conjunto de ellos.

Borzini y Mazzuco (2007) estudian la variabilidad interindividual en la obtención de factores de crecimiento (TGF, VEGF, FGF) partiendo de una misma concentración de plaquetas y observan variaciones en la concentración de estos factores de hasta 8 veces para los dos primeros y hasta 25 veces para el último. Posteriormente, (Mazzuco y cols., 2009) generan geles con distintos procedimientos para obtener el PRP y observa que la concentración final de factores y la propia cinética de liberación de los mismos desde el gel es distinta según el método de obtención. La relación entre concentración de plaquetas, método de coagulación, concentración de factores y eficacia clínica en la actualidad no está clara. Estos autores no ven correlación entre concentración de plaquetas y de factores, quizá esto sea debido al estrés plaquetario durante la manipulación, la eliminación de factores con el PPP o la presencia de microagregados que impidan un correcto recuento.

Wahlström (2007) observa *in vitro* con lisados plaquetarios que un pH más bajo conduce a mayor concentración de PDGF y menor de TGF- $\beta$ . Así, a pH más bajo (5,4) hay más proliferación celular y a más alto (7,6) más actividad fosfatasa alcalina.

Utilizando un modelo *in vitro* para estudiar la osteoartritis, Osterman (2015) observa un efecto anti-inflamatorio que es independiente de la concentración de plaquetas y glóbulos blancos.

Södergren (2018) ha sugerido la existencia de distintas subpoblaciones plaquetarias, con diferentes patrones de activación (las más pequeñas con un fenotipo procoagulante). De confirmarse esta idea, también sería un elemento que incidiría en la variabilidad observada en la concentración de factores.

En nuestra muestra no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el número de plaquetas o el factor de concentración plaquetaria del lisado plaquetario y los factores de crecimiento PDGF( $\rho$ 0,37), FGF( $\rho$ 0,15), EGF ( $\rho$ 0,26), VEGF( $\rho$ 0,23) y TGF- $\beta$ . No obstante, se observó una correlación positiva entre la concentración de los factores FGF y VEGF ( $\rho$  0,5), FGF y PDGF ( $\rho$  0,62), EGF y FGF ( $\rho$  0,72) y EGF y PDGF ( $\rho$  0,92).



Por lo tanto, las diferencias en los resultados entre unos laboratorios y otros puede deberse, además de las cuestiones técnicas asociadas a los protocolos utilizados, a una componente biológica con carácter multifactorial:

1. La concentración de plaquetas.
2. La variación interindividual del contenido de los gránulos plaquetarios.
3. La incorporación de los factores en vesículas extracelulares, escapando a los métodos de detección.
4. La presencia de glóbulos blancos, que pueden aportar su contenido.
5. El grado de activación de las plaquetas en el momento de la toma de la muestra para evaluar la concentración.

#### **4. Sobre la presencia de los glóbulos blancos**

El papel que pueden desempeñar los glóbulos blancos en el producto final también ha sido objeto de discusión. Dohan Ehrenfest y cols. (2009 y 2014) apoyan la presencia de leucocitos (aunque dependiendo de su tipo cantidad y estado de activación) ya que incrementan la producción de factores de crecimiento, liberan mediadores con efecto analgésico, intervienen en la regulación inmune y tienen actividad anti-microbiana y favorecen la estabilidad del gel. Comentan además que las células T y B reguladoras son elementos importantes en la modulación de síntesis de citocinas inflamatorias por parte de monocitos/macrófagos. Las plaquetas tienen factores angiogénicos (VEGF) pero también antagonistas de ellos (endostatina y trombospodina-1), y los leucocitos producen VEGF, lo que podría ayudar al efecto angiogénico.

Según Zimmermann (2003) la presencia de leucocitos incrementa la concentración de factores (PDGF-BB y TGF- $\beta$ ) aunque la de PDGF-AB depende fundamentalmente de la concentración de plaquetas.

En sentido contrario, Schnabel (2007) opina que pueden incrementar la respuesta inflamatoria al aportar metaloproteasas, proteasas inflamatorias e hidrolasas ácidas.

El uso de protocolos con una sola centrifugación reduce muy significativamente la presencia de glóbulos blancos, aproximadamente hasta un 5-10% de la cifra inicial. Además, correspondiendo un  $58,7\pm 19,9\%$  a linfocitos y un  $31,5\pm 18,5\%$  a granulocitos. Algunos (Pérez y cols., 2014; Toumi y cols., 2003) sugieren que la presencia de neutrófilos puede resultar perjudicial al inducir la destrucción de tejido sano mediante la

síntesis de radicales libres. La expresión de genes catabólicos, que se asocia con la presencia de glóbulos blancos puede afectar negativamente al proceso de reparación, al menos en el caso de tendones y ligamentos. No obstante, el propio Toumi (2003) reconoce que también los neutrófilos ejercen también funciones positivas, como la fagocitosis. Sundman (2011) describe una correlación entre la concentración de neutrófilos en el PRP y la de ciertas citocinas catabólicas (metaloproteinasa-9 de la matriz e interleucina-1 $\beta$ , estando esta última también relacionada con la presencia de monocitos).

También para Anitua y cols. (2105) la presencia de glóbulos blancos en el gel no es deseable, ya que contienen interleucinas proinflamatorias y enzimas degradadores de la matriz extracelular. Estos autores describen una mayor fragilidad del PRP con glóbulos blancos (3x la concentración inicial en ST) debido a la presencia de células que dificultaba el entrelazado fibrilar. Dicen también que la presencia de glóbulos blancos incrementa la actividad inflamatoria y la degradación de la matriz en un entorno inflamatorio. La estimulación de la reacción inflamatoria reduce la proliferación celular. No obstante, Dohan (2014) discute la durabilidad de las membranas y coágulos del PRGF que describe el grupo de Anitua.

Un factor que presenta cierta incertidumbre es si la presencia de leucocitos del donante en el PRP alogénico podría tener consecuencias negativas. En un trabajo sobre modelo animal, en el que se estudia la inmunogenicidad de la infiltración alogénica de PRP en hueso y músculo de conejos, no se ha observado reacción inmunológica significativa (Zhang y cols., 2013).

En cualquier caso, nuestro protocolo de centrifugación está diseñado para llevar granulocitos y monocitos hasta el *buffy-coat* que se produce en la capa superior del concentrado de hematíes. Apenas se recupera un 5% de la cifra inicial de glóbulos blancos en la sangre total y corresponden mayoritariamente a linfocitos. También hay que tener en cuenta que los granulocitos son muy sensibles al proceso de congelación (para el caso de utilizar un protocolo de criofractura).

## 5. Sobre la liberación de factores desde el coágulo

No hay unanimidad a la hora de definir la cinética de liberación de los factores. Según Marx (2001) en los primeros 10min tras la formación del coágulo se produce la liberación del 90% del contenido de factores de crecimiento.

Para Senzel (2009) la liberación de factores es intensa durante la primera hora de la activación, pero sigue durante 1 semana la síntesis de factores desde la reserva del ARNm. Este concepto podría apoyar el uso de PRP frente a PRGF, especialmente si el producto se dosifica en una sola aplicación (como es nuestro caso).

Su (2008) observa que los factores plaquetarios difunden desde el gel, que contiene la gran mayoría de las plaquetas, observándose entre un 35 y un 50% del total de contenido de factores en el exudado del suero a las 2h de la formación del coágulo. Pero no se incrementa su concentración con 3 horas más de incubación. Es decir, en el gel quedan bien plaquetas pendientes de activar o bien factores que se liberarán cuando desaparezca el coágulo.

Landesberg (2005) detecta liberación de factores desde las plaquetas al entorno del coágulo hasta 7 días después de su generación.

Anitua (2005) evaluando la liberación de factores en sobrenadante de gel observa que solo hay liberación de VEGF y HGF si el coágulo contiene plaquetas (no con plasma solo). Además la IGF-I está presente en el plasma, no parece haber aportación plaquetaria. Utiliza ese sobrenadante al 20% para suplementar medio de cultivo de tenocitos (durante el cultivo estas células secretan VEGF y HGF).

## 6. Sobre el lisado plaquetario

La utilización de la congelación para producir una crio fractura de las plaquetas y los glóbulos blancos (si los hay) se basa en un enfriamiento rápido, para permitir la generación de cristales de hielo en su interior. No obstante, Baik (2014) observó que se lisa aproximadamente un 25% de las plaquetas tras la primera congelación (a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante varias semanas) y un 50% tras la segunda. Además, comprueba *in vitro* que, suplementado el medio de cultivo de queratinocitos con un lisado con dos ciclos, el resultado es mejor que si se obtiene con un solo ciclo, con un aumento insignificante tras la tercera.

Strandberg (2017) sugiere de 3 a 5 ciclos de congelación/descongelación, pero sin superar esta cifra, ya que se produce un deterioro de algunos factores con más ciclos. No obstante, hay otros autores que abogan por 1 ó 2 ciclos (Doucet y cols., 2005; Laitinen y cols., 2016). Además, Strandberg sugiere ventajas al utilizar plasma frente a concentrados de plaquetas suspendidas en soluciones definidas (tipo PAS, *platelet additive solution*) al

contar con más concentración de factores presentes en el plasma (como el HGF e IGF-1). En general, EGF, PDGF y PF-4 aumentan su concentración con los ciclos; TGF- $\beta$ 1 y FGF-2 decrecen a partir de 5 ciclos; mientras que VEGF y BMP-2, no aumentaron al incrementar el número de ciclos.

Sin embargo, Marx (2004) indica que algunas de las proteínas contenidas en los gránulos  $\alpha$  se encuentran incompletas, no siendo solubles cuando se extraen utilizando la congelación. Según el autor, dicha condición se adquiere al fusionarse los gránulos con la membrana plasmática durante el proceso de desgranulación tras la activación plaquetaria, añadiéndose histonas y cadenas laterales de carbohidratos. Además, afirma que las plaquetas dañadas o no viables aportarían moléculas en un estado no bioactivo. Entonces, se podría plantear que los métodos que sugieren la criofractura plaquetaria por congelación/descongelación repetida para obtener los factores de crecimiento podrían no ser eficientes, salvo que las plaquetas se activen con el frío durante la congelación y liberen el contenido de los gránulos.

Respecto al papel que pudieran desempeñar las histonas, Semeraro (2011) ha observado que su presencia influye positivamente en el potencial procoagulante de las plaquetas, mejorando la generación de trombina en el PRP.

Reid (1999) observó que durante el enfriamiento de las plaquetas se produce una reorganización del citoesqueleto y una transición de fase lipídica en la membrana (de líquido cristalino a gel). Estas alteraciones provocan daños irreversibles.

Barsotti (2013) estudia el efecto del lisado plaquetario sobre células endoteliales, monocitos, fibroblastos y queratinocitos, evaluando viabilidad, proliferación, migración, angiogénesis y activación de la ruta de reparación tisular, no apreciando en sus conclusiones que pudiera haber algún efecto deletéreo sobre los factores extraídos.

No se ha encontrado ningún estudio comparativo que haya puesto de manifiesto diferencias entre el rendimiento en la concentración de factores plaquetarios obtenido con un método mediado por criofractura y otro que utilice la simple activación. En esta tesis se ha evidenciado un efecto positivo con el uso de PRGF y PRP, con significación estadística en este último caso. Por otro lado, el PRGF ofrece la posibilidad de reducir el potencial antigénico del producto, ya sea por centrifugación y/o filtración. Esta característica puede resultar de interés a la hora de evaluar un potencial uso alogénico en

pacientes en los que no esté indicada la extracción de cierto volumen de sangre (para obtener PRP), como es el caso de los grandes quemados.

## **7. Papel del PRP en la reparación cutánea**

Respecto a la revisión de estudios realizados sobre el efecto del PRP en el proceso de reparación cutánea, frecuentemente proceden de la evaluación de tratamientos terapéuticos para úlceras en pacientes diabéticos, en los que dicho proceso está mediado por la patología de base del paciente, por lo que el papel de los factores de crecimiento resulta más difícil de analizar. Gandhi (2003) observa que en los pacientes con diabetes mellitus la concentración de PDGF y TGF- $\beta$  estaba reducida respecto de la población normal. Este podría ser uno de los mecanismos por los que estos pacientes presentan dificultad para la reparación de heridas.

Por otro lado, no se puede obviar la aportación de sustancias bioactivas que tiene su origen en los queratinocitos, fibroblastos y glóbulos blancos.

Algunos autores han estudiado el perfil del secretoma presente en las heridas durante el proceso de reparación tisular. Así, Vogt (1998) observa una gran variabilidad en la concentración de factores de crecimiento en las heridas agudas llegando a alcanzar, por ejemplo, el IGF-1 a alcanzar un rango entre 21.000 y 41.000pg/ml, mientras que el EGF se queda entre 3 y 88pg/ml. Además, se observa una cinética a lo largo del proceso de curación, variando las concentraciones de los diferentes factores a lo largo del proceso (hasta alcanzar los niveles basales cuando se recupera finalmente la función de barrera). Unos empiezan altos y van bajando (IGF-1, IGF-1, IGF-3, bFGF, EGF, PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1) y otros a la inversa (IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 2). Por otro lado, IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en ningún momento del proceso alcanzan valores séricos. En general, PDGF es abundante en las heridas agudas y decrece en las crónicas (Robson y cols., 1997; Vogt y cols., 1998). De acuerdo con todo ello, estos autores sugieren adaptar la composición y concentración de los factores a la etapa del proceso de curación y, en el caso de Robson (1997) propone para el uso de factores de crecimiento con fines terapéuticos las siguientes consideraciones: (1) el factor utilizado debe tener una presencia predominante en el mecanismo de curación de la lesión que se pretende tratar (por ejemplo, un factor que estimule la epitelización será de poca utilidad a la hora de reponer la matriz extracelular de tejido conectivo); (2) seguidamente, hay que asegurarse de que realmente con la adición externa de ese factor vamos a recuperar una deficiencia del mismo en la lesión; y

(3) finalmente, hay que asegurarse que el factor se añada en cantidad suficiente y durante un tiempo adecuado para ejercer su función. El primero de los criterios a considerar propuesto por Robson requiere matizar que realmente un mismo factor, en función del momento en el que actúe o de su concentración, puede desencadenar acciones distintas. Thomas (2001) también sostiene además la idea de que los factores de crecimiento interactúan durante el proceso de reparación de un modo secuencial y ordenado.

Greppy (2011) utiliza gel de plaquetas alogénico para tratar úlceras recalcitrantes en personas mayores, con dificultad para el uso autólogo, con buenos resultados. Cervelli (2009) observa mejores resultados clínicos en tratamiento de úlceras cutáneas con el uso combinado de grasa (técnica de Coleman) y PRP que con colágeno y ácido hialurónico. Martínez-Zapata (2012) efectúa una revisión de ensayos clínicos controlados sobre el uso de PRP en el tratamiento de úlceras diabéticas, concluyendo que no hay evidencias que sugieran que el uso de PRP proporcione ventajas terapéuticas.

Tadini (2015) trata lesiones cutáneas en tres niños con epidermolisis ampollosa utilizando gel de PRP ( $1,5-2 \times 10^{12}$  pq/ml) de sangre de cordón umbilical, con prometedores resultados. Parazzi (2015) ha estudiado comparativamente el contenido de sustancias bioactivas del PRP de sangre periférica y de sangre de cordón, sugiriendo que el primero (más rico en TGF- $\beta$ ) estaría más indicado para inducir la osteogénesis y el segundo (con más VEGF y PDGF) para estimular la angiogénesis y mecanismos de reparación tisular. Quizá por eso el PRP de sangre de cordón umbilical funciona con células mesenquimales pero no es superior al de sangre periférica con condrocitos (Mirabet y cols., 2002).

La presencia de receptores de membrana para los factores de crecimiento también debe ser tenida en consideración. Crespo-Díaz (2011) observa que la expresión del receptor de EGF está significativamente aumentada tras una lesión. Isihara (2000) y Tuan (1998) evidencian que los fibroblastos queloideos tienen una sobreexpresión de ligandos para algunos factores de crecimiento, como el PDGF y el TGF- $\beta$ , por lo que una excesiva concentración de estos factores podría favorecer la generación de queloides.

En lo que se refiere al uso en zonas donantes, Monteleone (2000) ya describe un efecto beneficioso del PRP al aplicarlo sobre zonas donantes, acelerando el proceso de reparación tisular. Danielsen (2008) no observa diferencias con el control al aplicar PRP en zonas donantes para tratar úlceras ni tampoco en la epitelización tras el autotrasplante en la zona injertada. A diferencia de Kakudo (2011) este autor sólo aplica PRP al principio

(como en el caso de esta tesis). Según Kakudo esa es precisamente la razón de que no observara diferencias. Aunque esta afirmación genera la duda sobre si vale la pena aplicar al principio un gel (como el propio Kakudo hizo) o bien simplemente limitarse a pulverizar PRP en las curas. También hay que tener presente que la zona donante y una úlcera representan dos escenarios fisiológicamente distintos. No es infrecuente que las personas cuyas úlceras se tratan con PRP tengan otras patologías asociadas. Por otro lado, Danielsen presenta 20 casos, Kakudo sólo 1.

Grant Venter y cols. (2018) estudian en modelo de rata el efecto del PRP (4-5x) sobre quemaduras de 2 grado profundo y 3r grado, no observando efecto en el caso del 3r grado en cuanto a más rápida cobertura (quizá por la falta de sustrato celular epidérmico).

Kazakos (2009) describe mejoras (tasa de curación y desarrollo de un tejido regenerativo para luego proceder a cirugía reconstructiva) con la aplicación de PRP en lesiones cutáneas traumáticas (fracturas abiertas o cerradas, con necrosis cutánea, y quemaduras por fricción).

En un ensayo prospectivo de aplicación tópica (como aerosol) de PRP sobre la zona cutánea donante de una extracción de vena safena (para realización de *bypass* coronario), no mejoró el resultado cosmético ni se reduce el riesgo de infección (Almadahl y cols., 2011).

Hom (2007) realiza un ensayo con voluntarios sanos a los que genera unas lesiones cutáneas de espesor completo, de 4 mm de diámetro. Observa en algunos casos (5 de 8 sujetos) que un valor de concentración de plaquetas 6 veces por encima del recuento basal proporciona un mejor resultado (especialmente, a nivel histológico, con mayor consistencia), pero se desconoce la concentración plaquetaria en los otros 3 casos.

Respecto al papel del PRP en la diferenciación miofibroblástica, tampoco este apartado es ajeno a la controversia. En principio, el papel de los miofibroblastos en el mecanismo de reparación tisular tiene su relevancia, la contracción (ya sea del coágulo o de la propia matriz con miofibroblastos) va a facilitar la concentración de recursos (como los factores de crecimiento) y el cierre de las heridas. Sin embargo, estos miofibroblastos deben desaparecer conforme avanzan las fases de los mecanismos regeneradores. No obstante, si se mantienen activos, en casos de patologías fibróticas, la estructura tisular se ve alterada por una irregular deposición de densa matriz extracelular. De hecho, la propia

matriz es hasta cierto punto responsable de modular, mediante mecanismos de señalización mecano-químicos, la relación ente macrófagos y fibroblastos (Pahshir y cols., 2018). Chellini (2018) observa que el PRP es capaz de inhibir, e incluso revertir, la diferenciación miofibroblástica inducida por TGF- $\beta$ 1. Pero, no es menos cierto que otros autores han demostrado que el PRP promueve la diferenciación miofibroblástica (Kushida y cols., 2013; Ramos-Torrecillas y cols., 2014; Rothan y cols., 2014). Una vez más se imputa, también esta controversia, a la variabilidad a la heterogeneidad en los protocolos de preparación. Hay que tener presente que, en el conjunto de factores liberados con la desgranulación plaquetaria coexisten, por ejemplo, el TGF- $\beta$  (con carácter profibrótico) y el FGF-2 (anti-fibrótico, promoviendo la apoptosis de miofibroblastos) (Dolivo y cols., 2017). Pero, además, las dosis aplicadas también van a aportar mayor variabilidad, ya que algunas respuestas celulares son dosis-dependientes. Por ejemplo, Xian (2015) observa un mayor potencial proinflamatorio y de síntesis de matriz (con deposición de colágeno tipo 1 y tipo 3) con concentraciones más elevadas de PRP y, por otro lado, una tendencia a promover el remodelado de las heridas con concentraciones menores (incrementando la tasa de crecimiento de los queratinocitos).

### **7.1. PRP en el paciente quemado**

La reposición de la piel continúa siendo un reto no alcanzado en la actualidad. Cuando la extensión y la profundidad de la pérdida cutánea requieren el uso de cobertura terapéutica, el autoinjerto, cuando es posible, es la única alternativa para reponer este tejido en su integridad.

Hace ya 60 años desde que Rheinwald y Green (1957) describieron una metodología para la expansión *ex vivo* de los queratinocitos. Sin embargo, poco se ha avanzado en este campo desde entonces. Se han incorporado metodologías para dotar de un análogo dérmico a los queratinocitos en crecimiento, pero lo cierto es que dada la complejidad estructural de la piel, con sus anejos, no se ha conseguido reproducir todavía en el laboratorio, en su integridad histológica.

Es por ello que la piel de donantes fallecidos sigue siendo un recurso para el tratamiento provisional de los grandes quemados, y el autoinjerto, como ya se ha dicho, se presenta como el *gold standard* en la actualidad para conseguir una recuperación total de la funcionalidad cutánea. Sin embargo, la toma de autoinjertos no está exenta de cierta morbilidad y supone una lesión adicional que debe ser tenida en consideración.



Diversos estudios han demostrado que la aplicación del PRP en las heridas contribuye a su cicatrización, promoviendo la quimiotaxis, la adhesión celular, mitogénesis, proliferación y angiogénesis gracias, en gran parte, a la liberación de los factores de crecimiento contenidos en sus gránulos (Mazzucco y cols., 2010). Además se le han atribuido efectos antimicrobianos, así como cualidades para aliviar el dolor (Nurden y cols., 2008). Todas estas características hacen que las plaquetas tengan un potencial uso terapéutico en el tratamiento del paciente quemado, tanto en el tratamiento de la quemadura como de la zona donante de injerto de piel parcial.

Existen diversos estudios en la literatura en los que se observan efectos positivos tras la aplicación del concentrado plaquetario en la quemadura, tanto en modelo animal (Ozcelik y cols., 2016; Venter y cols., 2016) como en humanos (Picard y cols., 2015; Rossani y cols., 2014; Yeung y cols., 2018). En teoría, una quemadura dérmica profunda puede beneficiarse de este tratamiento dadas sus cualidades hemostáticas, que podrían disminuir la pérdida de sangre perioperatoria y mejorar la tasa de prendimiento de los injertos de piel al disminuir el sangrado subyacente, además de funcionar como un adhesivo fibrina y proporcionar un lecho bien vascularizado por sus propiedades angiogénicas. Por otro lado, también se han descrito efectos positivos en la cicatrización de las heridas, tanto en modelos *in vitro* como en el tratamiento de heridas crónicas y agudas (Mohammadi y cols., 2017; Suthar y cols., 2017; Sclafani y cols., 2015). En otros estudios se han observado mejores resultados (epitelización y prendimiento del injerto) que con el tratamiento estándar, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Danielsen y cols., 2008; Marck y cols., 2016).

Klosová y cols. (2013) realizan un estudio con 23 pacientes con quemaduras profundas en los que evaluó la calidad de la cicatriz tras injerto de piel parcial de la zona quemada. Utilizan el dispositivo Cutometer MPA 580 realizando evaluaciones de cada paciente al mes y a los 3, 6 y 12 meses. Observan que en aquellas quemaduras tratadas con injerto de piel parcial y concentrado plaquetario autólogo se reducía el tiempo de recuperación de las propiedades viscoelásticas de la cicatriz en comparación con las quemaduras tratadas únicamente con injerto de piel parcial. Obtienen diferencias estadísticamente significativas para los parámetros R2 y Q1.

Marck y cols. (2016) llevan a cabo un ensayo clínico aleatorizado doble ciego, siendo el mismo paciente el propio control, con 52 pacientes con quemaduras profundas a los que

se trató mediante injerto de piel parcial o injerto de piel parcial + PRP. Se evalúa la calidad de la cicatrización a los 3, 6 y 12 meses mediante la escala POSAS y el dispositivo Cutometer MPA 580, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las formas de tratamiento.

Evidentemente, la situación clínica de un gran quemado no permite la obtención de sangre con carácter autólogo, pero del mismo modo que se indica la transfusión de otros componentes sanguíneos, podría contemplarse la utilización no transfusional de concentrados de plaquetas (PRP) alogénicos. Los resultados observados en el presente estudio (resultados con PRP análogos a los de PRGF, aunque únicamente significativos para el PRP) sugieren un potencial uso alogénico del PRGF (acelular) con un bajo riesgo desde el punto de vista de la transmisión de enfermedades (aplicando las actuales técnicas de detección de ácidos nucleicos) y buena tolerancia desde el punto de vista inmunológico. El trasplante alogénico de piel representa un elevado riesgo de incompatibilidad del sistema HLA (del inglés, *human leukocyte antigen*), por lo que parece razonable implementar estrategias que no incrementen dicho riesgo.

La aplicación de PRP tras el desbridamiento se presenta como una posible opción terapéutica para obtener algunos efectos ventajosos, para preparar el lecho cruento para la posterior cobertura cutánea: hemostático, anti-microbiano, favorecedor del desarrollo de tejido de granulación. Así como su aplicación sobre la zona donante de injerto de piel parcial para favorecer su epitelización y su calidad cicatricial.

De acuerdo con ello y con la experiencia desarrollada en la presente tesis, se ha elaborado la siguiente propuesta de modelo de actuación:

1. Obtener un PRP (ya sea a través del procesamiento de una donación de sangre completa o bien directamente, por un procedimiento de plaquetoaféresis), con un criterio de compatibilidad frente al grupo sanguíneo (ABO).
2. Someter el producto a un par de ciclos de congelación/descongelación para inducir la criofractura de las plaquetas.
3. Centrifugar a 1000g 10min.
4. Retirar el sobrenadante y alicuotar en el volumen adecuado.
5. Almacenar por congelación a  $\leq -30^{\circ}\text{C}$ .
6. Llegado el momento de su uso, descongelar (no superar los  $40^{\circ}\text{C}$ ).
7. Trasvasar el producto a un frasco provisto de difusor para generar un aerosol.

## 8. Aplicar en toda la superficie.

La utilización de PRP alogénico o también denominado homólogo, se ha postulado como posible alternativa a la aplicación del PRP autólogo ante determinadas limitaciones como pacientes inmunodeprimidos, recién nacidos y neonatos, ancianos, pacientes con trastornos hematológicos, y casos en los que se requieran grandes cantidades de sangre (Anitua y cols., 2017). Aporta ventajas como su disponibilidad y una concentración plaquetaria independiente a la variabilidad interindividual.

Aún son escasos los estudios existentes sobre su aplicación, algunos de ellos reportan resultados positivos y seguros en el ámbito de la osteoartritis de rodilla (Bottegoni y cols., 2016), la alopecia androgénica (Ince y cols., 2018), tratamiento de heridas crónicas, periodontitis y defectos óseos, aunque se trata de estudios con un nivel de evidencia limitado.

### **7.2. Papel del PRP y PRGF en la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados: tiempo y calidad de la cicatrización**

La mayoría de los estudios llevados a cabo en este campo están dirigidos a la evaluación del confort del paciente, porcentaje de complicaciones y tiempo de cicatrización con los apósitos utilizados habitualmente (Sinha y cols., 2017; Schulz y cols., 2015; Masella y cols., 2013; Solanki y cols., 2012; Dornseifer y cols., 2011; Demirtas y cols., 2010; Barnea y cols., 2004). Brölmann y cols. (2013) llevan a cabo un estudio multicéntrico en el que comparan seis apósitos distintos utilizados en el manejo de la zona donante de injerto de piel parcial y evalúan la calidad de la cicatrización mediante las escalas VSS y POSAS. Observan que aquellos pacientes tratados con apósito tipo *film* son los menos satisfechos en cuando a la calidad de la cicatriz.

El análisis bibliográfico efectuado ha reportado un único artículo (en el que se describe un solo caso) en que se aborde el uso del plasma rico en plaquetas en seres humanos para el tratamiento de las zonas donantes en pacientes quemados. Kakudo y cols. (2011) aplican un gel de PRP sobre zona donante de injerto de piel parcial y, en los días siguientes (durante las curas), pulverizan sobre la zona tratada PRP líquido (obtenido como sobrenadante de un gel de PRP centrifugado a 4000g). El análisis histológico en el día 13 postcirugía de la zona donante tratada con PRP evidencia un mayor grosor epidérmico y

número de vasos en la dermis respecto al control. También refieren en dicha zona menor dolor en el cambio de apósitos y una epitelización más rápida.

Takabayashi y cols. (2015) describieron en un modelo murino un efecto promotor de la epitelización y vascularización en la zona donante de injerto tratada con concentrado plaquetario respecto al control.

El desarrollo de un producto con el potencial de coagulación intacto se presenta como una estrategia adecuada para el tratamiento de heridas cutáneas. El colágeno es uno de los principales inductores de la coagulación (Zhang y cols., 2019), por lo que la pulverización del PRGF sobre el lecho cruento (con la adición de la trombina endógena aportada por el activador) desencadena este fenómeno, fijando las gotas coaguladas a la superficie tratada. El propio coágulo actúa estructuralmente como un concentrador de factores.

En el protocolo utilizado en el presente estudio incorpora una única aplicación (a diferencia del caso de Kakudo, que repetía la aplicación en cada cura), con el fin de evaluar el efecto de la liberación progresiva de los factores atrapados en el producto coagulado. Se ha observado un mayor porcentaje de epitelización precoz de las zonas donante de injerto de piel parcial tratadas con PRP o PRGF. El 5º día postoperatorio se observan valores más altos de cicatrización tanto en las zonas tratadas con PRGF como con PRP respecto a aquellas tratadas con el tratamiento habitual. El 8º día postoperatorio el 55% de las zonas tratadas con PRP y el 45% de las zonas tratadas con PRGF han cicatrizado totalmente frente al 20% de las zonas tratadas con el tratamiento habitual, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre PRP y tratamiento habitual ( $p = 0.036$ ). El 11º día el porcentaje de cicatrización de las zonas tratadas con PRGF y tratamiento habitual se iguala. No obstante, se continúa observando un mayor porcentaje de cicatrización en las zonas tratadas con PRP, sin diferencias estadísticamente significativas.

En el presente estudio se evalúa la calidad de la cicatrización de las zonas donantes de injerto de piel parcial tratadas mediante PRP, PRGF y apósito hidrocoloide, mediante las escalas VSS y POSAS, al mes, a los 3 meses y a los 6 meses postcirugía, siendo el mismo paciente el propio control. Se observó una mejor calidad cicatricial evaluada mediante la escala VSS en las zonas tratadas con PRP y PRGF respecto al tratamiento habitual, siendo más notoria esta diferencia en las tratadas con PRP. En cuanto a la escala POSAS, se

objetivaron valores inferiores en las zonas tratadas con PRP respecto al tratamiento habitual. Las zonas tratadas con PRGF obtuvieron valores similares a las tratadas con apósito hidrocólicoide. Ninguna de estas diferencias resultó estadísticamente significativa.

## 8. Dolor

Miller y cols. (2015) concentran las plaquetas entre 10 y 12 veces el valor basal, utilizando un método de aféresis, haciendo un gel para zonas donantes en 5 pacientes diabéticos con úlceras. Observa que reduce el dolor y por tanto el consumo de analgésicos, además también se reduce la estancia hospitalaria.

Healy y cols. (2013) llevan a cabo un ensayo clínico con 50 pacientes sobre el dolor de la zona donante de injerto de piel parcial tras la aplicación de fibrina. Observan una reducción del dolor en las zonas tratadas con fibrina frente al tratamiento sin fibrina (0,42 versus 1,60  $p < 0,001$ ).

En el presente estudio se observan valores medios de EVA inferiores en las zonas tratadas con PRP y PRGF frente a aquellas tratadas con el tratamiento habitual el 5º y 8º días postoperatorios. El 3º día postoperatorio las zonas tratadas con PRGF proporcionan una puntuación EVA inferior a aquellas tratadas con PRP o apósito hidrocólicoide, aunque sin significación estadística.

## 9. Infección

En cuanto a las complicaciones infecciosas, no se detectó ningún caso en los pacientes tratados.

Respecto al potencial microbicida del PRP, Brinkmann (2010) describe unas estructuras llamadas *extracelular traps* (formadas por bandas de DNA, histonas y proteínas granulares) procedentes de granulocitos con cierto potencial microbicida (especialmente con bacterias que expresan DNAasas). Estas *extracelular traps* se pueden generar también a partir del núcleo de células dañadas (por ejemplo, por la congelación). Edelblute (2015) observa un efecto antibacteriano del PRP activado.

Drago (2014) cita un efecto antibacteriano del PRP desleucocitado, pero se requiere activación plaquetaria y la cooperación de componentes plasmáticos para que el efecto tenga lugar (las plaquetas solas no lo tienen). Para explicar este efecto se han sugerido varios candidatos: proteínas antimicrobianas de las plaquetas, péptidos del sistema

inmune de defensa innato, proteínas fijadoras de complemento, interacción directa de las plaquetas con los microorganismos, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, liberación de mieloperoxidasa, activación de respuesta antioxidantes. La variedad de propuestas evidencia la dificultad para identificar los factores que realmente controlan este efecto.

Los monocitos y granulocitos contienen gránulos con mieloperoxidasa, sustancia que interviene en la actividad antimicrobiana (Lincoln y cols., 1995). Cheng (2013) cita el papel en la actividad microbicida de algunas proteínas presentes en los gránulos plaquetarios (PMPs) para explicar el potencial antimicrobiano del PRP. De hecho, este último observa efecto contra *S aureus* (aunque no frente a *E coli* y *P aeruginosa*) imputable a las plaquetas activadas. En este mismo sentido, Bielecki (2007) detecta efecto del gel de plaquetas contra *S aureus* sensible a meticilina y también contra la variedad resistente, pero no frente a *K pneumoniae*, *E faecalis* ni *P aeruginosa*. Incluso, para el caso de *Pseudomonas* parece que tenga un efecto estimulante (por lo que dicen estaría contraindicado su uso en pacientes con úlceras cutáneas infectadas con este microorganismo). Kachel (2010) ve menos tasa de infección en el tratamiento de úlceras diabéticas cuando utiliza gel de plaquetas.

Mariani (2015) estudia una serie de moléculas asociadas a efecto antimicrobiano en PRP rico y pobre en leucocitos encontrando una fuerte correlación entre la concentración de estos factores y la inhibición del crecimiento bacteriano. Este efecto antibacteriano se pierde después de 18h, aunque la congelación del producto no afecta a esta capacidad. La presencia de leucocitos en el preparado no afecta al potencial antimicrobiano del PRP, así que las moléculas responsables de esta actividad proceden principalmente de las plaquetas.

## 10. Coste

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la utilización del PRP o PRGF como tratamiento de la zona donante de injerto de piel parcial no supone un incremento de gasto significativo, en lo que se refiere a material fungible, en comparación con el resto de tratamientos disponibles en la actualidad. Suponiendo un aumento de 1,56€ por paciente, utilizado en combinación con el apósito hidrocólicoide suma un total de 2,70 €, siendo este coste inferior al resto de tratamientos utilizados como la hidrofibra, el alginato o la gasa parafinada con antibiótico.

## **11. Limitaciones**

Como limitación fundamental del estudio encontramos el pequeño tamaño muestral alcanzado finalmente. El número total de pacientes reclutados fue de 20 frente a los 35 pacientes calculados inicialmente como tamaño muestral. Ello fue debido a un menor reclutamiento de lo esperado, pese a la prolongación del periodo de reclutamiento inicial de 12 meses a 18 meses, el número de pacientes que cumplieron los criterios de inclusión durante este tiempo fue inferior a lo estimado. Esto limita nuestra capacidad de realizar inferencias sobre la población.

No obstante, teniendo en consideración que la única referencia bibliográfica sobre el tema disponible incluye un solo paciente, el presente trabajo representa una aportación con mayor base clínica.





# Conclusiones



1. El tratamiento de las zonas donante de injerto autólogo de piel parcial en el paciente quemado con plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento, en comparación con el tratamiento con apósito hidrocoloide:
  - Disminuye la morbilidad.
  - Favorece la epitelización precoz.
  - Mejora la calidad cicatricial, evaluada mediante las escalas VSS y POSAS al mes, 3 meses y 6 meses postoperatorios.
  - Disminuye el dolor.
  - No supone un incremento de complicaciones, incluyendo entre ellas la infección de la herida quirúrgica.
  - No supone un incremento en el coste terapéutico en comparación con otras formas de tratamiento habitual.
2. Actualmente, no se dispone de evidencias clínicas suficientemente contrastadas que justifiquen la utilización de un umbral mínimo para la concentración plaquetaria en el PRP de  $10^6$  pq/ $\mu$ l para garantizar efecto terapéutico.
3. El coágulo generado con el PRGF evidencia una consistencia más frágil que la que proporciona el de PRP. Este hallazgo puede estar relacionado con un anormal comportamiento dinámico del citoesqueleto plaquetario, como consecuencia de la congelación previa a la coagulación. El uso de un atomizador para la aplicación clínica minimiza esta circunstancia.
4. Se ha propuesto un protocolo para el potencial uso alogénico de PRGF para aquellos casos en lo que no esté indicada la extracción de sangre del paciente, como sucede en el tratamiento de quemaduras en pacientes con una amplia extensión de piel afectada.



# **Referencias bibliográficas**



AEMPS. Informe V1/23052013 de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas. Mayo, 2013.

Affleck DG, Bull DA, Bailey SH, Albanil A, Connors R, Stringham JC, Karwande SV. PDGF(BB) increases myocardial production of VEGF: shift in VEGF mRNA splice variants after direct injection of bFGF, PDGF(BB), and PDGF(AB). *J Surg Res.* 2002;107(2):203-9.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with anorganic bovine bone in the rabbit cranium: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004;19(1):59-65.

Ahmad Z, Howard D, Brooks RA, Wardale J, Henson FM, Getgood A, Rushton N. The role of platelet rich plasma in musculoskeletal science. *JRSM Short Rep.* 2012;3(6):40.

Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing.* 2013;10(1):23.

Almdahl SM, Veel T, Halvorsen P, Vold MB, Mølsted P. Randomized prospective trial of saphenous vein harvest site infection after wound closure with and without topical application of autologous platelet-rich plasma. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2011;39(1):44-8.

Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, da Cruz Pacheco Í, Corrêa do Amaral RJF, Granjeiro JM, y cols. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):67.

Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res.* 2005;23(2):281-6.

Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007;28(31):4551-60.

Anitua E, Muruzabal F, Pino A, Merayo-Lloves J, Orive G. Biological stability of plasma rich in growth factors eye drops after storage of 3 months. *Cornea*. 2013;32(10):1380-6.

Anitua E, Troya M, Zalduendo M, Orive G. Effects of anti-aggregant, anti-inflammatory and anti-coagulant drug consumption on the preparation and therapeutic potential of plasma rich in growth factors (PRGF). *Growth Factors*. 2015;33(1):57-64.

Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121713.i

Anitua E, Pino A, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes dermal fibroblast proliferation, migration and biosynthetic activity. *J Wound Care*. 2016;25(11):680-7.

Anitua E, Prado R, Orive G. Allogeneic Platelet-Rich Plasma: At the dawn of an off-the-shelf therapy? *Trends Biotechnol*. 2017;35(2):91–93.

Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, Doi K, Yatomi Y, Yoshimura K. Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(3):176-85.

Baik SY, Lim YA, Kang SJ, Ahn SH, Lee WG, Kim CH. Effects of platelet lysate preparations on the proliferation of HaCaT cells. *Ann Lab Med*. 2014;34(1):43-50.

Barnea Y, Amir A, Leshem D, Zaretski A, Weiss J, Shafir R, y cols. Clinical comparative study of aquacel and paraffin gauze dressing for split-skin donor site treatment: *Ann Plast Surg*. 2004;53(2):132-6.

Barsotti MC, Losi P, Briganti E, Sanguinetti E, Magera A, Al Kayal T, Feriani R, Di Stefano R, Soldani G. Effect of platelet lysate on human cells involved in different phases of wound healing. *PLoS One*. 2013 Dec 27;8(12):e84753.

Beausang E, Floyd H, Dunn KW, Orton CI, Ferguson MW. A new quantitative scale for clinical scar assessment. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102(6):1954-61.

Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Król W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(3):417-20.



Borzini P, Mazzucco I. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet derivatives for topical therapy. What is true from the biologic view point? *ISBT Sci Ser.* 2007;2(1):272–281.

Bottegoni C, Dei Giudici L, Salvemini S, Chiurazzi E, Bencivenga R, Gigante A. Homologous platelet-rich plasma for the treatment of knee osteoarthritis in selected elderly patients: an open-label, uncontrolled, pilot study. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(2):35–41.

Brinkmann V, Laube B, Abu Abed U, Goosmann C, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp.* 2010;(36):1274.

Broderick E, Infanger S, Turner TM, Sumner DR. Depressed bone mineralization following high dose TGF-beta1 application in an orthopedic implant model. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(5):379-84.

Brölmann FE, Eskes AM, Goslings JC, Niessen FB, de Bree R, Vahl AC, y cols. Randomized clinical trial of donor-site wound dressings after split-skin grafting: Donor-site wound dressings after split-skin grafting. *Br J Surg.* 2013;100(5):619-27.

Burnouf T, Chou M-L, Wu Y-W, Su C-Y, Lee L-W. Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria: ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PLASMA AND PLT GEL. *Transfusion (Paris).* 2013;53(1):138-46.

Cantais E, Goutorbe P, Asencio Y, Montcriol A, Meaudre-Desgouttes E. Reanimación y anestesia en el quemado adulto. *EMC-Anest-Reanim.* 2008;34(1):1–16.

Carr ME Jr, Zekert SL. Measurement of platelet-mediated force development during plasma clot formation. *Am J Med Sci.* 1991;302(1):13-8.

Carter CA, Jolly DG, Worden Sr. CE, Hendren DG, Kane CJM. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(3):244-55.

Carter MJ, Fylling CP, Parnell LKS. Use of Platelet Rich Plasma Gel on Wound Healing: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eplasty.* 2011;11:e38.

Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, y cols. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *BioMed Res Int.* 2016;1-7.

Ceci C, Niada S, Del Fabbro M, Lolato A, Taschieri S, Giannasi C, y cols. Does freeze-thawing influence the effects of platelet concentrates? An in vitro study on human adipose-derived stem cells. *J Craniofac Surg.* 2016;27(2):398-404.

Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. Regenerative surgery: use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(3):340-5.

Chandler WI. Microparticle counts in platelet-rich and platelet-free plasma, effect of centrifugation and sample-processing protocols. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013;24(2):125-32.

Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166(1):189-97.

Chellini F, Tani A, Vallone L, Nosi D, Pavan P, Bambi F, Zecchi Orlandini S, Sassoli C. Platelet-rich plasma prevents in vitro transforming growth factor- $\beta$ 1-induced fibroblast to myofibroblast transition: Involvement of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A/VEGF receptor-1-mediated signaling. *Cells.* 2018;7(9). pii: E142.

Chen L, Wang C, Liu H, Liu G, Ran X. Antibacterial effect of autologous platelet-rich gel derived from subjects with diabetic dermal ulcers in vitro. *J Diabetes Res.* 2013;2013:269527.

Cho HS, Song IH, Park S-Y, Sung MC, Ahn M-W, Song KE. Individual Variation in Growth Factor Concentrations in Platelet-rich Plasma and Its Influence on Human Mesenchymal Stem Cells. *Korean J Lab Med.* 2011;31(3):212.

Cholewa D, Stiehl T, Schellenberg A, Bokermann G, Jousen S, Koch C, Walenda T, Pallua N, Marciniak-Czochra A, Suschek CV, Wagner W. Expansion of adipose mesenchymal stromal cells is affected by human platelet lysate and plating density. *Cell Transplant.* 2011;20(9):1409-22.

Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy.

Cohn CS, Lockhart E, McCullough JJ. The use of autologous platelet-rich plasma in the orthopedic setting. *Transfusion*. 2015;55(7):1812-20.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2014;30(1): 255-89.

Conde-Montero E, Horcajada-Reales C, Suárez-Fernández R. Utilidad del plasma rico en plaquetas en el tratamiento de las úlceras crónicas de la piel. *Piel Form Contin En Dermatol*. 2014;29(04):248-54.

Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, SarrMG, Bartunek J, Dietz AB, Terzic A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*.2011;20(6):797-811.

Crocker DJ, Murad TM, Geer JC. Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp Mol Pathol*. 1970;13(1):51-65.

D'asta F, Halstead F, Harrison P, Zecchi Orlandini S, Moiemmen N, Lord J. The contribution of leucocytes to the antimicrobial activity of platelet-rich plasma preparations: a systematic review. *Platelets*. 2017;1-12.

DanielsenP, Jørgensen B, Karlsmark T, Jorgensen LN, Agren MS. Effect of topical autologousplatelet-rich fibrin versus no intervention on epithelialization of donor sites and meshed split-thickness skin autografts: a randomized clinical trial. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(5):1431-40.

DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2012;28(7):998-1009.

Demirtas Y, Yagmur C, Soylemez F, Ozturk N, Demir A. Management of split-thickness skin graft donor site: A prospective clinical trial for comparison of five different dressing materials. *Burns*. 2010;36(7):999-1005.

Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):219.

Di Martino A, Di Matteo B, Papio T, Tentoni F, Selleri F, Cenacchi A, Kon E, Filardo G. Platelet-Rich Plasma Versus Hyaluronic Acid Injections for the Treatment of Knee Osteoarthritis: Results at 5 Years of a Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2018;47(2):347-354.

Dinsdale RJ, Devi A, Hampson P, Wearn CM, Bamford AL, Hazeldine J y cols. Changes in novel haematological parameters following thermal injury: A prospective observational cohort study. *Sci Rep.* 2017;7(1).

do Amaral RJ, da Silva NP, Haddad NF, Lopes LS, Ferreira FD, Filho RB, Cappelletti PA, de Mello W, Cordeiro-Spinetti E, Balduino A. Platelet-rich plasma obtained with different anticoagulants and their effect on platelet numbers and mesenchymal stromal cells behavior in vitro. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7414036.

Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167.

Dohan Ehrenfest DM, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Merchants shall be expelled from the Temple: the PRGF(®) (Plasma-Preparation Rich in Growth Factors)-Endoret(®) case. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(4):473-7.

Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3-9.

Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, y cols. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2017;1-14.

Dold AP, Zywiell MG, Taylor DW, Dwyer T, Theodoropoulos J. Platelet-rich plasma in the management of articular cartilage pathology: a systematic review. *Clin J Sport Med.* 2014;24(1):31-43.

Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Fibroblast growth factor 2 as an antifibrotic: antagonism of myofibroblast differentiation and suppression of profibrotic gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;38:49-58.

Dornseifer U, Lonic D, Gerstung TI, Herter F, Fichter AM, Holm C, y cols. The Ideal Split-Thickness Skin Graft Donor-Site Dressing: A Clinical Comparative Trial of a Modified Polyurethane Dressing and Aquacel. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128(4):918-24.

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005;205(2):228-36.

Dougherty EJ. An evidence-based model comparing the cost-effectiveness of platelet-rich plasma gel to alternative therapies for patients with nonhealing diabetic foot ulcers. *Adv Skin Wound Care.* 2008;21(12):568-75.

Draaijers LJ, Tempelman FRH, Botman YAM, Tuinebreijer WE, Middelkoop E, Kreis RW, y cols. The patient and observer scar assessment scale: a reliable and feasible tool for scar evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2004;113(7):1960-5.

Drago L, Bortolin M, Vassena C, Romanò CL, Taschieri S, Del Fabbro M. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. *PLoS One.* 2014;9(9):e107813.

Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002;31(6):615-19.

Duncan JAL, Bond JS, Mason T, Ludlow A, Cridland P, O'Kane S, y cols. Visual analogue scale scoring and ranking: a suitable and sensitive method for assessing scar quality? *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(4):909-18.

Edelblute CM, Donate AL, Hargrave BY, Heller LC. Human platelet gel supernatant inactivates opportunistic wound pathogens on skin. *Platelets.* 2015;26(1):13-6.

Elder BD, Holmes C, Goodwin CR, Lo S-F, Puvanesarajah V, Kosztowski TA, y cols. A Systematic Assessment of the Use of Platelet-Rich Plasma in Spinal Fusion. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(5):1057-70.

El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, y cols. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. *J Periodontol.* 2007;78(4):661-9.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(6):1502–1508.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery: *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(6):147e-159e.

Everts PAM, van Zundert A, Schönberger JPAM, Devilee RJJ, Knape JTA. What do we use: Platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *J Biomed Mater Res A.* 2008;85A(4):1135-6.

Farré AL, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2013;13:2–7.

Fearmonti R, Bond J, Erdmann D, Levinson H. A review of scar scales and scar measuring devices. *Eplasty.* 2010;10.

Felthaus O, Prantl L, Skaff-Schwarze M, Klein S, Anker A, Ranieri M, y cols. Effects of different concentrations of Platelet-rich Plasma and Platelet-Poor Plasma on vitality and differentiation of autologous Adipose tissue-derived stem cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;66(1):47-55.

Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19(4):528-35.

Fleming BC, Spindler KP, Palmer MP, Magarian EM, Murray MM. Collagen-platelet composites improve the biomechanical properties of healing anterior cruciate ligament grafts in a porcine model. *Am J Sports Med.* 2009;37(8):1554-63.

Fleming BC, Proffen BL, Vavken P, Shalvoy MR, Machan JT, Murray MM. Increased platelet concentration does not improve functional graft healing in bio-enhanced ACL reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23(4):1161-70.

Freshwater MF. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery remains unproven. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(3):311-2.

Gandhi A, Gebauer G, Berberian WS, y cols. Reductions in growth factors in the fracture hematoma of diabetic patients. Transactions of the 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, LA, February 2–5, 2003, poster no. 541.

Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Pasquali CD, Bocchini I, Cervelli V. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic and Clinical Implications for Tissue Engineering Therapies in Regenerative Surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):230-6.

Giusti I, D'Ascenzo S, Mancò A, Di Stefano G, Di Francesco M, Rughetti A, Dal Mas A, Properzi G, Calvisi V, Dolo V. Platelet concentration in platelet-rich plasma affects tenocyte behavior in vitro. *Biomed Res Int.* 2014;2014:630870.

Giusti I, Rughetti A, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Pavan A, Dell'Orso L, Dolo V. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion.* 2009;49(4):771-8.

Giusti I, Di Francesco M, D'Ascenzo S, Palumbo P, Rughetti A, Dell'Orso L, Varasano PA, Pressanti GL, Dolo V. Leukocyte depletion does not affect the *in vitro* healing ability of platelet rich plasma. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):4029-38.

Go RS, Ritman EL, Owen WG. Angiogenesis in rat aortic rings stimulated by very low concentrations of serum and plasma. *Angiogenesis.* 2003;6(1):25-9.

Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29(3):153-62.

Góngora-Biachi RA. La sangre en la historia de la humanidad. *Rev Bioméd.* 2005;16(4):281–288.

Grassi A, Napoli F, Romandini I, Samuelsson K, Zaffagnini S, Candrian C, Filardo G. Is Platelet-Rich Plasma (PRP) Effective in the treatment of acute muscle injuries? A systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* 2018;48(4):971-98.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(2):212-9.

Greppi N, Mazzucco L, Galetti G, Bona F, Petrillo E, Smacchia C, Raspollini E, Cossovich P, Caprioli R, Borzini P, Rebulli P, Marconi M. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals.* 2011;39(2):73-80.

Griffin XL, Wallace D, Parsons N, Costa ML. Platelet rich therapies for long bone healing in adults. Cochrane Bone, Joint and Muscle Trauma Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012.

Gulliksson H. Platelet storage media. *Vox Sang.* octubre de 2014;107(3):205-12.

Guo SC, Tao SC, Yin WJ, Qi X, Yuan T, Zhang CQ. Exosomes derived from platelet-rich plasma promote the re-epithelization of chronic cutaneous wounds via activation of YAP in a diabetic rat model. *Theranostics.* 2017;7(1):81-96.

Halpern BC, Chaudhury S, Rodeo SA. The Role of Platelet-Rich Plasma in Inducing Musculoskeletal Tissue Healing. *HSS J* ®. 2012;8(2):137-45.

Hampson P, Dinsdale RJ, Wearn CM, Bamford AL, Bishop JRB, Hazeldine J, y cols. Neutrophil Dysfunction, Immature Granulocytes, and Cell-free DNA are Early Biomarkers of Sepsis in Burn-injured Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Ann Surg.* 2017;265(6):1241-9.

Han B, Woodell-May J, Ponticciello M, Yang Z, Nimni M. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(6):1459-70.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules *Blood.* 1999;94(11):3791-9.

Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2001;153(3):543-53.



Henderson JL, Cupp CL, Ross EV, Shick PC, Keefe MA, Wester DC, Hannon T, McConnell D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear Nose Throat J.* 2003;82(8):598-602.

Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res.* 1999;84(3):298-305.

Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg.* 2007;9(3):174-83.

Huber HJ, Holvoet P. Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(5):412-9.

Ince B, Yildirim MEC, Dadaci M, Avunduk MC, Savaci N. Comparison of the Efficacy of Homologous and Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) for Treating Androgenic Alopecia. *Aesthetic Plast Surg.* 2018;42(1):297-303.

Ishihara H, Yoshimoto H, Fujioka M, Murakami R, Hirano A, Fujii T, Ohtsuru A, Namba H, Yamashita S. Keloid fibroblasts resist ceramide-induced apoptosis by overexpression of insulin-like growth factor I receptor. *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):1065-71.

Izaguirre-Ávila R, de Micheli A. Evolución del conocimiento sobre la sangre y su movimiento: Parte II. El saber sobre su composición. *Iatroquímica de la sangre. Rev Investig Clínica.* 2005;57(1):85-97.

Jin R, Zhang L, Zhang Y-G. Does platelet-rich plasma enhance the survival of grafted fat? An update review. *Int J Clin Exp Med.* 2013;6(4):252-8.

Jones IA, Togashi RC, Thomas Vangsness C Jr. The economics and regulation of PRP in the evolving field of orthopedic biologics. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2018;11(4):558-65.

Kachel E, Callum J, Moussa F, Goldstein J, Fremes S. Treatment of deep sternal wound infections after coronary artery bypass grafting by means of injection of platelet gel: an evolving technology. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(6):e118-20.

Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-Promoting Effect of Platelet-Rich Plasma on Human Adipose-Derived Stem Cells and Human Dermal Fibroblasts: *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(5):1352-60.

Kakudo N, Kushida S, Kusumoto K. Platelet-Rich Plasma: The importance of platelet separation and concentration. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(3): 1135-1136.

Kakudo N, Kushida S, Minakata T, Suzuki K, Kusumoto K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. *Med Mol Morphol*. 2011;44(4):233-6.

Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DS, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury*. 2011;42(8):782-9.

Kantrowitz DE, Padaki AS, Ahmad CS, Lynch TS. Defining platelet-rich plasma usage by team physicians in elite athletes. *Orthop J Sports Med*. 2018;6(4):2325967118767077.

Kaps C, Loch A, Haisch A, Smolian H, Burmester GR, Häupl T, y cols. Human platelet supernatant promotes proliferation but not differentiation of articular chondrocytes. *Med Biol Eng Comput*. 2002;40(4):485-90.

Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(7):966-972.

Kawazoe T, Kim HH. Tissue augmentation by white blood cell-containing platelet-rich plasma. *Cell Transplant*. 2012;21(2-3):601-7.

Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury*. 2009;40(8):801-5.

Kevy SV, Jacobson MS, Kadiyala S. Characterization of growth factor levels in platelet concentrates. *5th Annual Hilton Head Workshop on Engineering Tissues*: 2001

Khoshbin A, Leroux T, Wasserstein D, Marks P, Theodoropoulos J, Ogilvie-Harris D, Gandhi R, Takhar K, Lum G, Chahal J. The efficacy of platelet-rich plasma in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review with quantitative synthesis. *Arthroscopy*. 2013;29(12):2037-48.

Kim DH, Je YJ, Kim CD, Lee YH, Seo YJ, Lee JH, Lee Y. Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human dermal fibroblast. *Ann Dermatol.* 2011;23(4):424-31.

Klosová H, Štětinský J, Bryjová I, Hledík S, Klein L. Objective evaluation of the effect of autologous platelet concentrate on post-operative scarring in deep burns. *Burns.* 2013;39(6):1263-76.

Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Marcacci M. PRP For the Treatment of Cartilage Pathology. *Open Orthop J.* 2013;7:120.

Kotsovilis S, Markou N, Pepelassi E, Nikolidakis D. The adjunctive use of platelet-rich plasma in the therapy of periodontal intraosseous defects: a systematic review. *J Periodontal Res.* 2010;45(3):428-43.

Kushida, S.; Kakudo, N.; Suzuki, K.; Kusumoto, K. Effects of platelet-rich plasma on proliferation and myofibroblastic differentiation in human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg.* 2013;71(2):219-24.

Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Möller J, Laitinen S, Korhonen M, Nystedt J. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology.* 2016;68(4):891-906.

Landesberg R, Burke A, Pinsky D, Katz R, Vo J, Eisig SB, Lu H. Activation of platelet rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(4):529-35.

Lawrence C, Atac B. Hematologic changes in massive burn injury. *Crit Care Med.* 1992;20(9):1284-8.

Lei H, Gui L, Xiao R. The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin Biochem.* 2009;42(13–14):1452-60.

Levin GY, Egorihina MN. The role of fibrinogen in aggregation of platelets in burn injury. *Burns J Int Soc Burn Inj.* 2010;36(6):806-10.

Li F, Guo W, Li K, Yu M, Tang W, Wang H, y cols. Improved Fat Graft Survival by Different Volume Fractions of Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Stem Cells. *Aesthet Surg J.* 2015;35(3):319-33.

Li H, Hamza T, Tidwell JE, Clovis N, Li B. Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection. *Adv Healthc Mater.* 2013;2(9):1277-84.

Li M, Zhang C, Ai Z, Yuan T, Feng Y, Jia W. Therapeutic effectiveness of intra-knee-articular injection of platelet-rich plasma on knee articular cartilage degeneration. *Chin J Reparative Reconstr Surg.* 2011;25(10):1192-6.

Liao H-T, Marra KG, Rubin JP. Application of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Fat Grafting: Basic Science and Literature Review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;20(4):267-76.

Lincoln JA, Lefkowitz DL, Cain T, Castro A, Mills KC, Lefkowitz SS, Moguilevsky N, Bollen A. Exogenous myeloperoxidase enhances bacterial phagocytosis and intracellular killing by macrophages. *Infect Immun.* 1995;63(8):3042-7.

Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 1997;277(5323):242-5.

Liu Y, Kalén A, Risto O, Wahlström O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen.* 2002;10(5):336-40.

Lu RP, Ni A, Lin F-C, Ortiz-Pujols SM, Adams SD, Monroe DM, y cols. Major burn injury is not associated with acute traumatic coagulopathy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013;74(6):1474-9.

Macey M, Azam U, McCarthy D, Webb L, Chapman ES, Okrongly D, y cols. Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the ADVIA 120 hematology system. *Clin Chem.* 2002;48(6):891–899.

Maghsoudi H, Nezami N, Mirzajanzadeh M. Enhancement of burn wounds healing by platelet dressing. *Int J Burns Trauma.* 2013;3(2):96.

Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2013;133(2):153-65.

Marck RE, Montagne HL, Tuinebreijer WE, Breederveld RS. Time course of thrombocytes in burn patients and its predictive value for outcome. *Burns*. 2013;39(4):714-22.

Marck RE, Middelkoop E, Breederveld RS. Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. *J Burn Care Res*. 2014;35(3):219-27.

Marck RE, Gardien KL, Stekelenburg CM, Vehmeijer M, Baas D, Tuinebreijer WE, Breederveld RS, Middelkoop E. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study. *Wound Repair Regen*. 2016;24(4):712-20.

Mariani E, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Di Matteo B, Filardo G. Leukocyte presence does not increase microbicidal activity of Platelet-rich Plasma in vitro. *BMC Microbiol*. 2015 Jul 30;15:149.

Marlovits S, Mousavi M, Gäbler C, Erdös J, Vécsei V. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J Off Publ Eur Spine Soc Eur Spinal Deform Soc Eur Sect Cerv Spine Res Soc*. 2004;13 Suppl 1:S102-106.

Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: Kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials*. 2004;25(18):4489-502.

Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L, García J. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;10:CD006899.

Martinez-Zapata MJ, Orozco L, Balias R, Soler R, Bosch A, Rodas G, Til L, Peirau X, Urrútia G, Gich I, Bonfill X; PRP-RICE group. Efficacy of autologous platelet-rich plasma for the treatment of muscle rupture with haematoma: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Blood Transfus*. 2016;14(2):245-54.

Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? In: *Implant Dentistry* Vol. 10 No. 4 2001. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. P: 225-228.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(4):489-96.

Masella PC, Balent EM, Carlson TL, Lee KW, Pierce LM. Evaluation of six split-thickness skin graft donor-site dressing materials in a swine Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2013;1(9).

Matras, HMM. Die wirkungen vershiedener fibrinpreparate auf kontinuierat-strennungen der rattenhaut. *Osterr Z Stomatol.* 1970;67:338– 359.

Mazzocca AD, O'Malley M, Beitzel K, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Bradley JP, Romeo A, Arciero RA. Effects of repetitive platelet-rich plasma application on human tenocyte proliferation. *Orthopedics.* 2015;38(1):e19-24.

Mazzucco L, Balbo V, Cattana E, Guaschino R, Borzini P. Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: Fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. *Vox Sang.* 2009;97(2):110-8.

Mazzucco L, Borzini P, Gope R. Platelet-derived factors involved in tissue repair-From signal to function. *Transfus Med Rev.* 2010;24(3):218-34.

Mazzucco L, Balbo V, Guaschino R. Reasonable compromise to define the quality standards of platelet concentrate for non-transfusion use (CPunT). *Transfus Apher Sci.* 2012;47(2):207-11.

Milano G, Deriu L, Sanna Passino E, Masala G, Manunta A, Postacchini R, Saccomanno MF, Fabbriani C. Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. *Arthroscopy.* 2012;28(5):688-701.

Miller JD, Rankin TM, Hua NT, Ontiveros T, Giovinco NA, Mills JL, Armstrong DG. Reduction of pain via platelet-rich plasma in split-thickness skin graft donor sites: a series of matched pairs. *Diabet Foot Ankle.* 2015;6:24972.

Miller LE, Parrish WR, Roides B, Bhattacharyya S. Efficacy of platelet-rich plasma injections for symptomatic tendinopathy: systematic review and meta-analysis of randomised injection-controlled trials. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2017;3(1):e000237.

Mirabet V, Vaca P, Pertusa JF, Lequerica JL, Sanz E. In vitro engineered cartilage. *Advances in tissue banking*. World Scientific. 2002;6:161-176.

Mishra AK, Skrepnik NV, Edwards SG, Jones GL, Sampson S, Vermillion DA, Ramsey ML, Karli DC, Rettig AC. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients. *Am J Sports Med*. 2014;42(2):463-71.

Mohammadi MH, Molavi B, Mohammadi S, Nikbakht M, Mohammadi AM, Mostafaei S, y cols. Evaluation of wound healing in diabetic foot ulcer using platelet-rich plasma gel: A single-arm clinical trial. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(2):160-4.

Monteleone K, Marx R, Ghurani R. Wound repair/cosmetic surgery healing enhancement of skin graft donor sites with platelet-rich plasma. Presented at the 82nd Annual American Academy of Oral and Maxillofacial Surgery Meeting. September 22, 2000, San Francisco, CA.

Moojen DJF, Everts PAM, Schure R-M, Overdeest EP, van Zundert A, Knape JTA, y cols. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res*. 2008;26(3):404-10.

Mooren RE, Dankers AC, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(4):371-8.

Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Bone, Joint and Muscle Trauma Group*, editor. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014.

Ng MH, Chai ZT, Mohd Hazlin J, Norfadila MZ, Teoh RY, Zainal Abidin SZ, Leong CF, Noor Hamidah H. Effect of freezing on the clotting and growth factor profiles of platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma: its implication in tissue engineering. *Regen Res*. 2013; 2(2):48-56.

Nguyen PD, Tran TD, Nguyen T, Vu HT, Le PT, Phan NL, Vu NB, Phan NK, Van Pham P. Comparative clinical observation of arthroscopic microfracture in the presence

and absence of a stromal vascular fraction injection for osteoarthritis. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(1):187-95.

Nguyen PA, Pham TAV. Effects of platelet-rich plasma on human gingival fibroblast proliferation and migration in vitro. *J Appl Oral Sci.* 2018;10;26:e20180077.

Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008;13:3532-48.

Osterman C, McCarthy MB, Cote MP, Beitzel K, Bradley J, Polkowski G, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma increases anti-inflammatory markers in a human coculture model for osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2015;43(6):1474-84.

Ostvar O, Shadvar S, Yahaghi E, Azma K, Fayyaz AF, Ahmadi K, y cols. Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. *Diagn Pathol.* 2015;10:85.

Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(5):555-8.

Ozcelik U, Ekici Y, Bircan HY, Aydogan C, Turkoglu S, Ozen O, y cols. Effect of Topical Platelet-Rich Plasma on Burn Healing After Partial-Thickness Burn Injury. *Med Sci Monit.* 2016;22:1903-9.

Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* 2018;68-69:81-93.

Pallua N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns.* 2010;36(1):4-8.

Parazzi V, Lavazza C, Boldrin V, Montelatici E, Pallotti F, Marconi M, Lazzari L. Extensive characterization of platelet gel releasate from cord blood in regenerative medicine. *Cell Transplant.* 2015;24(12):2573-84.

Patel S, Dhillon MS, Aggarwal S, Marwaha N, Jain A. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial. *Am J Sports Med.* 2013;41(2):356-64.

Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-



rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2010;38(2):255-62.

Pérez AG, Lana JF, Rodrigues AA, Luzo AC, Belangero WD, Santana MH. Relevant aspects of centrifugation step in the preparation of platelet-rich plasma. *ISRN Hematol.* 2014; 25;2014:176060.

Pérez AG, Rodrigues AA, Luzo AC, Lana JF, Belangero WD, Santana MH. Fibrin network architectures in pure platelet-rich plasma as characterized by fiber radius and correlated with clotting time. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(8):1967-77.

Perez AG, Lana JFSD, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *ISRN Hematol.* 2014;2014:1-8.

Perut F, Filardo G, Mariani E, Cenacchi A, Pratelli L, Devescovi V, y cols. Preparation method and growth factor content of platelet concentrate influence the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15(7):830-9.

Picard F, Hersant B, Bosc R, Meningaud J-P. Should we use platelet-rich plasma as an adjunct therapy to treat «acute wounds», «burns», and «laser therapies»: A review and a proposal of a quality criteria checklist for further studies. *Wound Repair Regen.* 2015;23(2):163-70.

Pietramaggiore G, Kaipainen A, Czezugala JM, Wagner CT, Orgill DP. Freeze-dried platelet-rich plasma shows beneficial healing properties in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2006;14(5):573-80.

Pietramaggiore G, Scherer SS, Mathews JC, Gennaoui T, Lancerotto L, Ragno G, y cols. Quiescent platelets stimulate angiogenesis and diabetic wound repair. *J Surg Res.* 2010;160(1):169-77.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Ciatti F, Pesciotti M, Sebastiani S, Ferroni P, Gazzaniga PP. Acid citrate dextrose (ACD) formula A as a new anticoagulant in the measurement of in vitro platelet aggregation. *J Clin Lab Anal.* 1995;9(2):138-40.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Ciatti F, Pesciotti M, Ferroni P, Gazzaniga PP. Effects of storage on in vitro platelet responses: comparison of ACD and Na citrate anticoagulated samples. *J Clin Lab Anal.* 1996;10(3):134-9.

Pintucci G, Froum S, Pinnell J, Mignatti P, Rafii S, Green D. Trophic effects of platelets on cultured endothelial cells are mediated by platelet-associated fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Thromb Haemost.* 2002;88(5):834-42.

Platas J, Guillén MI, Pérez Del Caz MD, Gomar F, Castejón MA, Mirabet V, Alcaraz MJ. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY)* 2016;8(8):1703-17.

Prat NJ, Herzig MC, Kreyer S, Montgomery RK, Parida BK, Linden K, y cols. Platelet and coagulation function before and after burn and smoke inhalation injury in sheep: *J Trauma Acute Care Surg.* 2017;83:S59-65.

Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, Boulanger CM, Westwood N, Urbich C, Willeit J, Steiner M, Breuss J, Xu Q, Kiechl S, Mayr M. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. *Blood.* 2009;114(3):723-32.

Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, García-Martínez O, Ruiz C. Clinical utility of growth factors and platelet-rich plasma in tissue regeneration: a review. *Wounds Compend Clin Res Pract.* 2014;26(7):207-13.

Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos E, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C. Human fibroblast-like cultures in the presence of platelet-rich plasma as a single growth factor source: Clinical implications. *Adv Skin Wound Care.* 2014;27(3):114-20.

Ramsook RR, Danesh H. Timing of Platelet Rich Plasma Injections During Antithrombotic Therapy. *Pain Physician.* 2016;19(7):E1055-1061.

Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, y cols. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(9):2052-64.

Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. BOE 2005;225:31288-304.

Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE 2014;163:52716-60.

Reid TJ, LaRussa VF, Esteban G, Clear M, Davies L, Shea S, Gorogias M. Cooling and freezing damage platelet membrane integrity. *Cryobiology*.1999;38(3):209-24.

Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, Bucana CD, McMahon G, Gallick GE, Ellis LM. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J*. 2001;15(7):1239-41.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-43.

Robson MC. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1997; 5: 12-7.

Roffi A, Filardo G, Assirelli E, Cavallo C, Cenacchi A, Facchini A, y cols. Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *BioMed Res Int*. 2014;2014:692913.

Rossani G, Hernández I, Alcolea JM, Castro-Sierra R, Pérez-Soto W, Trelles MA. Tratamiento de quemaduras mediante plasma rico en plaquetas (PRP): parte I. *Cir Plástica Ibero-Latinoam*. 2014;40(2):229–238.

Rothan HA, Djordjevic I, Bahrani H, Paydar M, Ibrahim F, Abd Rahmanh N, Yusof R. Three-dimensional culture environment increases the efficacy of platelet rich plasma releasate in prompting skin fibroblast differentiation and extracellular matrix formation. *Int J Med Sci*. 2014;11(10):1029-38.

Sae Yun Baik, Young Ae Lim, Seon Joo Kang, Sun Hyun Ahn, Wee Gyo Lee, Chul Ho Kim. Effects of platelet lysate preparations on the proliferation of HaCaT cells. *Ann Lab Med.* 2014;34(1):43-50.

Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, Drexler C, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2007;47(8):1436-46.

Scherer SS, Tobalem M, Vigato E, Heit Y, Modarressi A, Hinz B, y cols. Nonactivated versus thrombin-activated platelets on wound healing and fibroblast-to-myofibroblast differentiation in vivo and in vitro. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(1):46e-54e.

Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, y cols. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* 2007;25(2):230-240.

Schulz A, Depner C, Lefering R, Kricheldorf J, Kästner S, Fuchs PC, y cols. A prospective clinical trial comparing Biobrane® Dressilk® and PolyMem® dressings on partial-thickness skin graft donor sites. *Burns.* 2015;42(2):345-55.

Sclafani AP, Azzi J. Platelet Preparations for Use in Facial Rejuvenation and Wound Healing: A Critical Review of Current Literature. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39(4):495-505.

Semeraro F, Ammollo CT, Morrissey JH, Dale GL, Friese P, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood.* 2011;118(7):1952-61.

Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol.* 2009;16(5):329-333.

Serebrakian AT, Pickrell BB, Varon DE, Mohamadi A, Grinstaff MW, Rodriguez EK, Nazarian A, Halvorson EG, Sinha I. Meta-analysis and Systematic Review of Skin Graft Donor-site Dressings with Future Guidelines. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2018 Sep 24;6(9):e1928.

Serra-Mestre JM, Serra-Renom JM, Martinez L, Almadori A, D'Andrea F. Platelet-Rich Plasma Mixed-Fat Grafting: A Reasonable Prosurvival Strategy for Fat Grafts? *Aesthetic Plast Surg.* 2014;38(5):1041-9.

Sherren PB, Hussey J, Martin R, Kundishora T, Parker M, Emerson B. Acute burn induced coagulopathy. *Burns J Int Soc Burn Inj.* 2013;39(6):1157-61.

Sheth U, Simunovic N, Klein G, Fu F, Einhorn TA, Schemitsch E, Ayeni OR, Bhandari M. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(4):298-307.

Sinha S, Schreiner AJ, Biernaskie J, Nickerson D, Gabriel VA. Treating pain on skin graft donor sites: Review and clinical recommendations. *J Trauma Acute Care Surg.* 2017;83(5):954-64.

Södergren AL, Ramström S. Platelet subpopulations remain despite strong dual agonist stimulation and can be characterised using a novel six-colour flow cytometry protocol. *Sci Rep.* 2018 23;8(1):1441.

Solanki NS, Mackie IP, Greenwood JE. A randomised prospective study of split skin graft donor site dressings: AWBAT-D<sup>TM</sup> vs. Duoderm®. *Burns.* 2012;38(6):889-98.

Sommeling CE, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Stillaert FB, Monstrey S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2013;66(3):301-11.

Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995;15(7 Pt 1):4738-47.

Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, Ronaghi M, Lubenow N, Knutson F, Berglund D. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion.* 2017;57(4):1058-1065..

Su CY, Kuo YP, Nieh HL, Tseng YH, Burnouf T. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion.* 2008;48(11):2414-20.

Sullivan T, Smith J, Kermodé J, McIver E, Courtemanche DJ. Rating the burn scar. *J Burn Care Rehabil.* 1990;11(3):256-60.

Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth factor and catabolic cytokine concentrations are influenced by the cellular composition of platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2011;39(10):2135-40.

Suthar M, Gupta S, Bukhari S, Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *J Biomed Sci.* 2017;24.

Sweeny J, Grossman BJ. Blood collection, storage and component preparation methods. In: Brecher M, editor. *Technical Manual*. 14th ed. Bethesda MD: American Association of Blood Banks (AABB); 2002: 955–8.

Tadini G, Guez S, Pezzani L, Marconi M, Greppi N, Manzoni F, Rebullà P, Esposito S. Preliminary evaluation of cord blood platelet gel for the treatment of skin lesions in children with dystrophic epidermolysis bullosa. *Blood Transfus.* 2015;13(1):153-8.

Tajima S, Tobita M, Mizuno H. Bone regeneration with a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma. *Methods Mol Biol.* 2018;1773:261-272.

Tamimi FM, Montalvo S, Tresguerres I, Blanco Jerez L. A comparative study of 2 methods for obtaining platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(6):1084-93.

Tavassoli-Hojjati S, Sattari M, Ghasemi T, Ahmadi R, Mashayekhi A. Effect of platelet-rich plasma concentrations on the proliferation of periodontal cells: An *in vitro* study. *Eur J Dent.* 2016;10(4):469-74.

The International Cellular Medical Society. Platelet rich plasma guidelines. *Best Practices Standards in Cell Based Medicine*. Section X. 2011.

Thomas DR. Age-related changes in wound healing. *Drugs Aging.* 2001;18(8):607-20.

Tolosa L, Bonora-Centelles A, Donato MT, Mirabet V, Pareja E, Negro A, López S, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Influence of platelet lysate on the recovery and metabolic performance of cryopreserved human hepatocytes upon thawing. *Transplantation.* 2011;91(12):1340-6.

Torreggiani E, Perut F, Roncuzzi L, Zini N, Baglio SR, Baldini N. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity. *Eur Cell Mater.* 2014;28:137-51.

Torres J, Tamimi F, Martinez P-P, Alkhraisat MH, Linares R, Hernández G, y cols. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2009;36(8):677-87.

Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med.* 2003;37(4):284-6.

Tuan TL, Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. *Mol Med Today.* 1998;4(1):19-24.

Ubezio G, Ghio M, Contini P, Bertorello R, Marino G, Tomasini A, Tripodi G. Biomodulators in platelet-rich plasma: a comparison of the amounts in products from healthy donors and patients produced with three different techniques. *Blood Transfus.* 2014;12 Suppl 1:s214-20.

Vahabi S, Yadegari Z, Mohammad-Rahimi H. Comparison of the effect of activated or non-activated PRP in various concentrations on osteoblast and fibroblast cell line proliferation. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(3):347-53.

Vavken P, Sadoghi P, Murray MM. The effect of platelet concentrates on graft maturation and graft-bone interface healing in anterior cruciate ligament reconstruction in human patients: a systematic review of controlled trials. *Arthroscopy.* 2011;27(11):1573-83.

Venter NG, Marques RG, Santos JS dos, Monte-Alto-Costa A. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. *Burns.* 2016;42(4):807-14.

Villela DL, Santos VLCG. Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review. *Growth Factors Chur Switz.* 2010;28(2):111-6.

Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D, Jansen V, Krieg M, Steinau HU. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg.* 1998; 102: 117-23.

Voineskos SH, Ayeni OA, McKnight L, Thoma A. Systematic Review of Skin Graft Donor-Site Dressings: *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(1):298-306.

Wahlström O, Linder C, Kalén A, Magnusson P. Variation of pH in lysed platelet concentrates influence proliferation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-like cells. *Platelets*. 2007;18(2):113-8.

Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Behavior of gingival fibroblasts on titanium implant surfaces in combination with either Injectable-PRF or PRP. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2).

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*. 2002;30(2):97-102.

Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE, Wagner W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):357-62.

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34(4):665-71.

White JG. EDTA-induced changes in platelet structure and function: clot retraction. *Platelets*. 2000;11(1):49-55.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55(11):1294-9.

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3): 269-88.

Wu X, Ren J, Yuan Y, Luan J, Yao G, Li J. Antimicrobial properties of single-donor-derived, platelet-leukocyte fibrin for fistula occlusion: An in vitro study. *Platelets*. 2013;24(8):632-6.

Xian LJ, Chowdhury SR, Bin Saim A, Idrus RB. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy*. 2015; 17(3):293-300.



Xian LJ, Roy Chowdhury S, Bin Saim A, Bt Hj Idrus R. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. *Cytotherapy*. 2015;17(3):293-300.

Yamaguchi R, Terashima H, Yoneyama S, Tadano S, Ohkohchi N. Effects of Platelet-Rich Plasma on Intestinal Anastomotic Healing in Rats: PRP Concentration is a Key Factor. *J Surg Res*. 2012;173(2):258-66.

Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, y cols. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

Yeung C-Y, Hsieh P-S, Wei L-G, Hsia L-C, Dai L-G, Fu K-Y, y cols. Efficacy of Lyophilised Platelet-Rich Plasma Powder on Healing Rate in Patients With Deep Second Degree Burn Injury: A Prospective Double-Blind Randomized Clinical Trial. *Ann Plast Surg*. 2018;80(2S Suppl 1):S66-S69.

Yol S, Tekin A, Yilmaz H, Küçükkartallar T, Esen H, Caglayan O, y cols. Effects of platelet rich plasma on colonic anastomosis. *J Surg Res*. 2008;146(2):190-4.

Yoshida R, Cheng M, Murray MM. Increasing platelet concentration in platelet-rich plasma inhibits anterior cruciate ligament cell function in three-dimensional culture. *J Orthop Res*. 2014;32(2):291-5.

Zhang Z-Y, Huang A-W, Fan JJ, Wei K, Jin D, Chen B, y cols. The potential use of allogeneic platelet-rich plasma for large bone defect treatment: immunogenicity and defect healing efficacy. *Cell Transplant*. 2013;22(1):175-87.

Zhang N, Wang K, Li Z, Luo T. Comparative study of different anticoagulants and coagulants in the evaluation of clinical application of platelet-rich plasma (PRP) standardization. *Cell Tissue Bank* 2019;20(1):61-75.

Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, Ringwald J, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sang*. 2003;85(4):283-9.



# **Anexos**



## 1. Listado de Tablas

Tabla 1. Escala de Vancouver. ....	48
Tabla 2. Escala del Observador y Paciente para Evaluación de Cicatrices. ....	49
Tabla 3. Calendario del estudio. ....	59
Tabla 4. Parámetros utilizados en cada uno los modelos de centrífuga. ....	74
Tabla 5. Descripción de las características de la muestra. ....	94
Tabla 6. Descripción de las variables de la analítica preoperatoria. ....	95
Tabla 7. Descripción de las variables de la analítica del día de la intervención. ....	95
Tabla 8. Descripción de variables de las muestras de PRP. ....	96
Tabla 9. Concentración de factores de crecimiento y tiempo de congelación hasta análisis de cada muestra del estudio. ....	97
Tabla 10. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y el factor de concentración plaquetaria. ....	100
Tabla 11. Relación entre el número de plaquetas del PRP y la concentración de PDGF. ....	100
Tabla 12. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y la concentración de EGF. ....	101
Tabla 13. Relación entre el número de plaquetas en el PRP y la concentración de FGF. ....	102
Tabla 14. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de PDGF. ....	103
Tabla 15. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de EGF. ....	104
Tabla 16. Relación entre el factor de concentración plaquetaria del PRP y la concentración de FGF. ....	105

---

Tabla 17. Porcentaje de cicatrización de cada grupo de tratamiento en cada visita de estudio durante el periodo de evaluación. ....	108
Tabla 18. Tiempo cicatrización 100% con cada tratamiento.....	109
Tabla 19. Efecto sobre la cicatrización de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 5° día postoperatorio. ....	109
Tabla 20. Efecto sobre la cicatrización de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 8° día postoperatorio. ....	110
Tabla 21. Efecto sobre la cicatrización de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 11° día postoperatorio. ....	110
Tabla 22. Efecto sobre la cicatrización de PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 14° día postoperatorio. ....	110
Tabla 23. Dolor (EVA) en las distintas zonas de tratamiento a los 3, 5 y 8 días postoperatorios. ....	111
Tabla 24. Efecto sobre la variable dolor de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 3° día postoperatorio. ....	111
Tabla 25. Efecto sobre la variable dolor de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual el 5° día postoperatorio. ....	112
Tabla 26. Efecto sobre la cicatrización (VSS) de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual. ....	114
Tabla 27. Efecto sobre la cicatrización (POSAS) de los tratamientos PRGF y PRP respecto al tratamiento habitual. ....	115

## 2. Listado de Figuras

Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de barrido: plaqueta (superior), glóbulo blanco (inferior izquierda) y eritrocito (inferior derecha). .....	24
Figura 2. Etapas de la reparación tisular.....	25
Figura 3. Coágulo de fibrina obtenido por el método descrito por Choukroun. ....	30
Figura 4. Escala visual analógica. ....	47
Figura 5. Diagrama del ensayo clínico. ....	51
Figura 6. Centrifugadora Heraeus Multifuge 4KR.....	52
Figura 7. Campana de flujo laminar. ....	52
Figura 8. Baño de agua PolyScience. ....	53
Figura 9. Material utilizado durante el procesamiento de las muestras.....	53
Figura 10. Atomizador.....	54
Figura 11. Gasa bañada en PRP coagulado. ....	56
Figura 12. Izquierda-derecha: activador, PRGF y PRP.....	57
Figura 13. Aplicación del tratamiento individualizado a cada zona mediante atomizador. ....	57
Figura 14. Izquierda: marcación zona donante. Derecha: herida tras obtención de injerto de piel parcial.....	58
Figura 15. Esquema de centrifuga en reposo (izquierda) y en funcionamiento (derecha). ....	68
Figura 16. Elementos formes de la sangre.....	69
Figura 17. Rangos de densidad de las células sanguíneas.....	69
Figura 18. (A) Estratificación de la muestra sanguínea tras centrifugación a régimen de revoluciones alto. (B) Régimen de revoluciones bajo.....	70

Figura 19 Estratificación de la muestra sanguínea tras la centrifugación. ....	70
Figura 20. Efecto del hematocrito sobre el rendimiento utilizando un único procedimiento de centrifugación, aplicando un régimen bajo de fuerza centrífuga. Barra gris: proporción que representa el volumen de plasma sobrenadante (PRP + PPP) respecto del volumen de sangre total (ST). Barra blanca: rendimiento de la recuperación de plaquetas en el PRP respecto del contenido plaquetario en la muestra de sangre total (ST).....	72
Figura 21. A: factor de incremento de la concentración plaquetaria en el PRP respecto del recuento obtenido en la sangre total (ST). ....	73
Figura 22. Efecto sobre la concentración plaquetaria [PQ], para un mismo volumen de uso terapéutico (VUT) requerido para una indicación clínica específica, en función del hematocrito (HTC) de la sangre total. ....	73
Figura 23. Nomograma sobre el que se establece la fuerza gravitacional (g) que se aplica a lo largo de cada recipiente, en función de sus respectivos radios mínimos (Rmin) y máximos (Rmax).....	74
Figura 24. Cambio morfológico de las plaquetas tras su activación. A, forma discoidal. B, forma irregular tras su activación .....	77
Figura 25. Comparación de la matriz y arquitectura celular de P-PRP, L-PRP, P-PRF y L-PRF. ....	79
Figura 26. Cambios del coágulo en función de las diferentes condiciones de temperatura. ....	81
Figura 27. Manipulación del coágulo. A: producto fresco; B: producto congelado/descongelado.....	81
Figura 28. Representación gráfica del coste de los tratamientos de la zona donante de injerto de piel parcial. ....	99
Figura 29. Relación entre el número de plaquetas del PRP( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y su factor de concentración (siendo este la relación entre el número de plaquetas del PRP y el número de plaquetas del paciente).....	100



Figura 30. Relación entre el número de plaquetas en el PRP ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y la concentración de EGF (pg/ml). .....	101
Figura 31. Relación entre el número de plaquetas en el PRP ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) y la concentración de FGF (pg/ml).....	102
Figura 32. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de PDGF (pg/ml). .....	103
Figura 33. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de EGF (pg/ml).....	104
Figura 34. Representación gráfica de la relación entre el factor de concentración plaquetaria y la concentración de FGF (pg/ml). .....	105
Figura 35. Gráfico de correlación entre variables. ....	106
Figura 36. Cicatrización de cada zona de tratamiento en cada paciente en función del tiempo (días). .....	107
Figura 37. Gráfico de supervivencia: representación del porcentaje de zonas cicatrizadas 100% de cada tratamiento en función del tiempo.....	109
Figura 38. Representación gráfica de la variable dolor (EVA) el 3° día postoperatorio según el tipo de tratamiento.....	112
Figura 39. Representación gráfica de la variable dolor (EVA) el 5° día postoperatorio según el tipo de tratamiento.....	112
Figura 40. Representación gráfica de la medida de la calidad de cicatrización con VSS de cada tratamiento en función del tiempo (meses). ....	113
Figura 41. Representación gráfica de la medida de la calidad de cicatrización con POSAS de cada tratamiento en función del tiempo (meses). .....	114
Figura 42. Representación gráfica de la relación entre las escalas POSAS y VSS al mes, 3 meses y 6 meses postoperatorios. ....	115

### 3. Dictamen del comité de ética de la investigación con medicamentos



#### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Don Serafin Rodriguez Capellán, Secretario del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

#### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la siguiente propuesta de ensayo clínico:

Código de protocolo del promotor: **PRPZDSKIN**

Nº EUDRACT: 2016-000968-42

Título: **"ESTUDIO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE LA ZONA DONANTE DE INJERTO DE PIEL PARCIAL EN PACIENTES QUEMADOS TRAS APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS O PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO FRENTE A LA FORMA TERAPÉUTICA HABITUAL."**

Promotor: **INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE**

PROTOCOLO: **1.1/ 24 de mayo de 2016**

HIP/CI: **1.1/ 24 de mayo de 2016**

PROCEDIMIENTOS Y MATERIAL UTILIZADO PARA EL RECLUTAMIENTO DE LOS SUJETOS: **04 de marzo de 2016**

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte I de la solicitud de autorización del ensayo, ha valorado las respuestas del promotor a las aclaraciones solicitadas (si las hubiera) y ha transmitido a la Agencia Española de medicamentos su opinión final sobre la parte I.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte II de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el art 7 del reglamento (UE) 536/2014 y considera que:

El procedimiento para obtener el consentimiento informado (incluyendo las hojas de información al sujeto de ensayo y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previstos en el capítulo II del Real Decreto 1090/2015.

- Las compensaciones previstas a los participantes son adecuadas, así como las previsiones de indemnización por daños y perjuicios que pueda sufrir el participante.
- El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- El uso futuro de las muestras biológicas obtenidas durante el ensayo se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.
- Para la realización del ensayo se consideran adecuados los centros e Investigadores previstos en el anexo II a este dictamen, teniendo en cuenta las declaraciones de idoneidad emitidas por el promotor y por los responsables de las instituciones correspondientes.



Que este Comité decidió emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día 8 de junio de 2016 (acta 1º 379).

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente Real Decreto 1090/2015 – para que la decisión del citado CEIm sea válida.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Valencia, a 8 de junio de 2016



Fdo.: Serafin Rodriguez Capellán  
Secretario del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos



### Anexo I Dictamen inicial sobre la Parte II COMPOSICIÓN DEL CEIm

**Presidente:**

Dra. ADELA CAÑETE NIETO (Oncología Pediátrica)

**Vicepresidenta - Farmacólogo Clínico:**

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

**Secretario- Licenciado en Derecho:**

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Licenciado en derecho-Ajeno profesión sanitaria)

**Miembros:**

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)  
 Dr. MARINO BLANES JULIA (Unidad de Enfermedades Infecciosas)  
 Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)  
 Dr. BONAVENTURA CASANOVA ESTRUCH (Neurología)  
 Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Hepatology Experimental)  
 Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)  
 Dra. MARIA ISABEL IZQUIERDO MACIÁN (Neonatología)  
 Dr. LUIS MARTINEZ DOLZ (Cardiología)  
 Dra. PAULA RAMIREZ GALLEYMORE (UCI general)  
 Dr. JOAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)  
 Dr. MAXIMO VENTO TORRES (Neonatología)  
 Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)  
 Dra. SARA BRUGGER FRIGOLS (Radiodiagnóstico)  
 Dra. EUGENIA PAREJA IBARS (Cirugía General y Aparato Digestivo)  
 Dr. FELIPE QUEROL FUENTES (Rehabilitación)  
 Dra. MARIA LUISA MARTINEZ TRIGUERO (Análisis Clínicos)  
 Dra. MARIA TORDERA BAVIERA (Farmacéutica del Hospital)  
 Dr. CESAR DIAZ GARCIA (Reproducción - Miembro de la Comisión de Investigación)  
 Dr. SANTIAGO DOMINGO DEL POZO (Jefe Clínico-Oncología Ginecológica)  
 Dr. JOAQUIN ERNESTO HINGJOSA DE VAL (Medicina Digestiva - Hospital de Manises)  
 Dra. M<sup>a</sup> ANGELI ES CANOS VERDECHO (Unidad del Dolor)  
 Dña. ANA MARIA V VAS BROSETA (Diplomada en Enfermería)  
 Dña. MARIA VICTORIA PARICIO GOMEZ (Área de Enfermería)  
 Dr. OSCAR JOSÉ JUAN VIDAL (Oncología Médica)  
 Dr. JOSÉ MARÍA CANELLES GAMIR (Farmacéutico de Atención Primaria)  
 Dña. AMPARO FUERTES VIDAL (Subdirectora Económica)  
 Dr. JOSÉ IVORRA CORTES (Reumatología)  
 Dr. MATTEO FRASSON (Cirugía General y Aparato Digestivo)  
 Dr. JOSÉ VICENTE SOLANAS PRATS (Atención Primaria)  
 Dña. PILAR ROBLES VILLALBA (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia Miembro ajeno a la profesión sanitaria)  
 Dr. JAVIER LLUNA GONZÁLEZ (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial)  
 Dra. MONICA ALMIÑANA RIQUE (Gerente del Dpto. de Salud Valencia La Fe)  
 D. MIGUEL ÁNGEL CANO TORRES (Secretario de ASLEUVAL Representante de los pacientes)



**Anexo II Dictamen Inicial sobre la parte II**  
**CENTROS E INVESTIGADORES PRINCIPALES PARTICIPANTES EN ESPAÑA**

Código de protocolo del promotor: **PRPZDSKIN**

Nº EUDRACT: **2016-000988-42**

Título: **"ESTUDIO SOBRE LA CICATRIZACIÓN DE LA ZONA DONANTE DE INJERTO DE PIEL PARCIAL EN PACIENTES QUEMADOS TRAS APLICACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS O PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO FRENTE A LA FORMA TERAPÉUTICA HABITUAL."**

Promotor: **INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE**

#### 4. Autorización del ensayo clínico por la AEMPS



DEPARTAMENTO  
DE MEDICAMENTOS  
DE USO HUMANO  
Área de Ensayos Clínicos

Referencia: MUH/CLINEC

**ASUNTO:** RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE UN ENSAYO CLÍNICO

**DESTINATARIO:** INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE  
Avenida Fernando Abril Martorell, 106  
null Valencia (España)

Solicitud de autorización del Ensayo clínico N° EudraCT 2016-000968-42 y título Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual y calificación de producto en fase de investigación clínica para el/los medicamentos: el medicamento Platelet-rich plasma (PRP) como producto en fase de investigación clínica, asignándole el N° de PEI 16-042 con la indicación cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial de pacientes quemados, el medicamento Plasma rich in growth factors como producto en fase de investigación clínica, asignándole el N° de PEI 16-043 con la indicación cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial de pacientes quemados.

**PROMOTOR:** INSTITUTO DE INVESTIGACION SANITARIA LA FE  
Avenida Fernando Abril Martorell, 106  
46026 Valencia (España)

**FECHA SOLICITUD VÁLIDA:** 15/04/2016

Una vez evaluada la solicitud de autorización de ensayo clínico previamente indicada, se considera que cumple con los requisitos indicados en el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos y demás legislación aplicable\*.

Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias RESUELVE:

AUTORIZAR el ensayo clínico solicitado y CALIFICAR el medicamento Platelet-rich plasma (PRP) como producto en fase de investigación clínica, asignándole el N° de PEI 16-042 con la indicación cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial de pacientes quemados, el medicamento Plasma rich in growth factors como producto en fase de investigación clínica, asignándole el N° de PEI 16-043 con la indicación cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial de pacientes

\* Texto refundido de la Ley de Garantías y Uso Racional de los medicamentos y productos sanitarios, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio.  
Real Decreto 1275/2011, de 18 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y se aprueba su Estatuto".

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	Localizador: RD7KT78B81
Fecha de la firma: 23/06/2016	

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO  
smhaem@aemps.es

Página 1 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8  
28022 MADRID  
Tel.: 918225073  
Fax: 918225043



quemados.

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en el artículo 116 y 117 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones públicas y del Procedimiento Administrativo Común, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA  
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

D<sup>a</sup>. Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	Localizador: RD7KT7SB81
Fecha de la firma: 23/06/2016	

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO  
smhaem@aemps.es

Página 2 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8  
28022 MADRID  
Tel.: 918225073  
Fax: 918225043

## 5. Resolución de ayudas económicas



### RESOLUCIÓN XI CONVOCATORIA AYUDAS ECONÓMICAS PARA DESARROLLO DE ENSAYOS CLÍNICOS DEL IIS LA FE ANUALIDAD 2017

El Comité Evaluador, reunido en sesión deliberatoria el 17 de enero de 2018, habiendo examinado las solicitudes presentadas y valoradas, la calidad científica del proyecto, la capacidad del grupo receptor para desarrollar y sostener la investigación propuesta, así como, los méritos de los candidatos, decidió aprobar la concesión de ayudas a los siguientes estudios de investigación presentados en el IIS La Fe:

**Código de Protocolo:** PRPZDSKIN

**Título:** Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual

**Investigador Principal:** M<sup>a</sup> Dolores Pérez del Ca<sup>2</sup>

**Código de Protocolo:** SKINHEALTEX

**Título:** Estudio clínico prospectivo, controlado y aleatorizado, con evaluación enmascarada, para comparar intraindividualmente la eficacia y tolerabilidad de SKINHEALTEX PLGA, frente al tratamiento quirúrgico habitual con autoinjerto en pacientes con quemaduras

**Investigador Principal:** Pilar Sepúlveda

El desarrollo de los Estudios de Investigación estará sujeto a la aprobación del Comité Ético de Investigación del Hospital U y P La Fe, CEIm La Fe.

Valencia, a 9 de febrero de 2018



Dr. José M<sup>a</sup> Millán Salvador  
Director General del IIS La Fe