

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Validación de un nuevo método de obtención de plasma rico
en plaquetas para su aplicación en úlceras cutáneas crónicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Conde Montero

Directores

José María Martínez González
Ricardo Suárez Fernández
Jesús Millán Núñez-Cortés

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE
OBTENCIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS
PARA SU APLICACIÓN EN
ÚLCERAS CUTÁNEAS CRÓNICAS

TESIS DOCTORAL

ELENA CONDE MONTERO

MADRID, 2016





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

VALIDACIÓN DE UN NUEVO MÉTODO DE OBTENCIÓN
DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS PARA SU APLICACIÓN EN
ÚLCERAS CUTÁNEAS CRÓNICAS

TESIS DOCTORAL

ELENA CONDE MONTERO

DIRECTORES:

PROF. DR. JOSÉ MARÍA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

PROF. DR. RICARDO SUÁREZ FERNÁNDEZ

PROF. DR. JESÚS MILLÁN NÚÑEZ-CORTÉS





A Julio



Agradecimientos



Al **Prof. Dr. José María Martínez González**, por sus valiosos consejos y por haber guiado de manera tan metódica la redacción de esta tesis.

Al **Prof. Dr. Jesús Millán Núñez-Cortés** y al **Dr. Ricardo Suárez** por su labor en la codirección de este trabajo.

A la **Dra. Celia Horcajada** y a **Francisca Martín**, grandes compañeras y mejores amigas. Me emociono al pensar en el entusiasmo con el que empezamos nuestro "equipo plaquetero" en 2012.

A **Enrique Alía Montes**, doctor en Farmacia y especialista en formulación magistral. Tu curiosidad, pericia y afán investigador han sido los motores para la invención que presentamos. Este trabajo se basa en la solución perfecta que diseñaste para un problema que en su día te presenté. Muchas gracias por haberte involucrado al máximo desde el momento en que te pedí ayuda.

A **Beatriz Márquez**, farmacéutica y especialista en bioquímica, por tus innumerables horas dedicadas, tu tolerancia a la frustración, tu ingenio, tu metodología, tu orden. Ha sido un placer haber trabajado contigo. Sabes que si no hubiese sido por tu incansable trabajo, esta tesis no habría salido adelante. Gracias.

A **María Eugenia Santos**, Directora Técnica de la Unidad de Producción Celular en el Hospital Universitario Gregorio Marañón, y a su equipo. Habéis sido la luz en los momentos más críticos y oscuros de este duro camino. Cuando ha habido problemas en el desarrollo del proyecto, siempre me habéis recibido con muchas ganas de colaborar y un amplio abanico de posibles soluciones. María Eugenia, muchas gracias por tu sabio asesoramiento como experta. Eres la principal responsable de que este trabajo haya podido materializarse.

A **Roberto Moure**, por tus horas de riguroso trabajo, que ha sido uno de los pilares de esta tesis.

A **José María Bellón**, matemático y estadístico del Servicio de Medicina Preventiva del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por tu inestimable ayuda con el análisis estadístico de este trabajo.

A la **Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón**, especialmente a la Unidad de Apoyo a la Innovación. Gracias por haber creído en el proyecto.

A la beca FIS PI13/02577 concedida por el Instituto de Salud Carlos III y a la donación de la Fundación Svenson. Sin estas ayudas económicas, este trabajo de investigación no habría sido viable.

Al **Dr. Pablo de la Cueva**, jefe de Servicio del Hospital Universitario Infanta Leonor por el incondicional apoyo que me has dado durante la fase final de la redacción de esta tesis.

A **Soledad Guisado**, por tu ánimo e ilusión, que han hecho menos duros los últimos meses de trabajo.

A mis padres, a mis hermanas y a mis abuelos. Gracias porque, como siempre, habéis apoyado y entendido mi dedicación a este proyecto.

A mis pacientes, por vuestra confianza y porque hacéis de mi trabajo una pasión.

A Julio. Te pongo de último, pero sabes que eres el primero.

Índice



Resumen	17
Summary	27
Résumé	37
1. Antecedentes y justificación	47
2. Hipótesis y objetivos	55
3. Introducción	59
3.1. Heridas cutáneas	61
3.1.1. Clasificación	61
3.1.2. Fisiología de la cicatrización normal	62
3.1.3. Cronificación de las heridas.....	66
3.1.4. Principios generales del tratamiento de las úlceras crónicas.....	69
3.1.5. Terapia avanzada	72
3.2. Plaquetas y factores de crecimiento	75
3.2.1. Las plaquetas.....	75
3.2.2. Los factores de crecimiento en las heridas crónicas.....	76
3.2.3. Clasificación de los factores de crecimiento	78
3.3. Plasma rico en plaquetas	83
3.3.1. Definición y fundamentos biológicos.....	83
3.3.2. Procedimiento de obtención	87
3.3.3. Gelificación	90
3.3.4. Seguridad de la aplicación.....	93
3.3.5. Uso clínico en medicina.....	94
3.3.6. Utilidad en úlceras cutáneas crónicas	96
3.3.7. Otros usos en dermatología	100

4. Material y métodos	105
4.1. Validación del método	107
4.1.1. Material	107
4.1.1.1. <i>Recursos humanos</i>	107
4.1.1.2. <i>Material fungible</i>	107
4.1.1.3. <i>Material físico y aparatos</i>	108
4.1.2. Metodología	109
4.1.2.1. <i>Selección de pacientes</i>	109
4.1.2.2. <i>Estudio cuantitativo</i>	111
4.1.2.2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y CENTRIFUGACIÓN	111
4.1.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL GEL	112
4.1.2.2.3. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDICIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO	113
4.1.2.3. <i>Estudio cualitativo mediante microscopía electrónica</i>	115
4.1.2.4. <i>Análisis estadístico</i>	117
4.2. Aplicación clínica del método	118
4.2.1. Material	118
4.2.1.1. <i>Recursos humanos</i>	118
4.2.1.2. <i>Material fungible</i>	118
4.2.1.3. <i>Material físico y aparatos</i>	119
4.2.2. Metodología	119
4.2.2.1. <i>Selección de pacientes</i>	119
4.2.2.2. <i>Extracción de sangre y centrifugación</i>	120
4.2.2.3. <i>Obtención del gel y modo de aplicación</i>	124
4.2.2.4. <i>Seguimiento</i>	125
4.2.2.5. <i>VARIABLES RECOGIDAS</i>	125
4.2.2.6. <i>Análisis estadístico</i>	126

5. Resultados	129
5.1. Recuento de plaquetas basales y en concentrados	131
5.2. Cuantificación de factores de crecimiento liberados	133
5.3. Observación al microscopio electrónico	140
5.4. Experiencia clínica	150
6. Discusión	163
7. Conclusiones	179
Conclusiones	181
Conclusions	182
8. Bibliografía	183



Resumen



INTRODUCCIÓN

El plasma rico en plaquetas (PRP) es una técnica utilizada en diferentes campos de la medicina con la función de mejorar la regeneración tisular. En dermatología, sus principales aplicaciones en los últimos años han sido el campo de la estética, sobre todo el tratamiento anti-envejecimiento, y la cicatrización de heridas.

El PRP se define por contener una mayor concentración de plaquetas que la sangre total, por lo que representa un reservorio de factores de crecimiento.

Las heridas crónicas se caracterizan por presentar una fase inflamatoria anormalmente prolongada, que implica una destrucción continuada de proteínas de matriz y factores de crecimiento. Los factores de crecimiento estimulan la migración, proliferación y diferenciación celular, que son fundamentales en el proceso de cicatrización.

Ante el reto terapéutico que representan las úlceras cutáneas crónicas en nuestra práctica clínica diaria, el PRP representa una interesante alternativa de tratamiento, cuya eficacia ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo*. En los últimos años se han publicado y comercializado diversos métodos para obtener PRP, que implican el uso de kits desechables, de coste variable.

HIPÓTESIS

La hipótesis de nuestro trabajo es que con nuestra técnica obtenemos moléculas bioactivas funcionales en similar grado que los métodos comerciali-

zados que implican la compra de kits de consumibles y, consecuentemente, un mayor gasto. Dada la elevada prevalencia de esta patología, con una disminución importante de la calidad de vida de los pacientes y un elevado gasto sanitario asociado, la expansión del método que proponemos podría tener un gran impacto sociosanitario.

OBJETIVOS

1. Validar un nuevo sistema de obtención de plasma rico en plaquetas autólogo, ambulatorio, sencillo, barato y reproducible:

- a) Comprobar que éste proporcione la suficiente concentración de plaquetas y determinar si la concentración plaquetaria se correlaciona con la cantidad de factores de crecimiento liberados.
- b) Determinar la cinética de liberación de factores de crecimiento en el gel de hidroxietilcelulosa, y compararla con la del PRP sin añadirle la hidroxietilcelulosa.
- c) Verificar que no active o fragmente las plaquetas por su manipulación, y las mantenga íntegras hasta el momento de su utilización.

2. Determinar la utilidad clínica de la aplicación de este método de obtención de plasma rico en plaquetas en el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas que no han respondido a tratamiento convencional.

MÉTODO

El estudio se compone de dos partes:

1.– Estudio transversal con muestras de donantes sanos para validar la técnica. Las muestras de sangre obtenidas por venopunción se utilizan para: recuento de plaquetas pre y post-centrifugación, medición de la cinética de liberación de factores de crecimiento en el gel de PRP y visualización de la preservación de la morfología plaquetaria tras la manipulación.

2.– Estudio experimental no controlado para evaluar la utilidad clínica del método. Tras el establecimiento de criterios de inclusión y exclusión, se incluyeron once pacientes con 13 úlceras crónicas recalcitrantes. En función del caso, la aplicación se realizó intralesional o tópica tras la gelificación del PRP.

RESULTADOS

1. Estudio de validación:

La media de concentración de plaquetas obtenida fue 1.59 veces superior a la concentración de plaquetas basal (Desviación Típica, DT, 0.39). La concentración media de leucocitos fue 1.130/mm³ (DT 1.110).

Con respecto a la cinética de liberación de factores de crecimiento (medidas registradas a los 20 minutos, 1 hora y 24 horas), se hallaron diferencias entre el PRP solo y mezclado con el gel de hidroxietilcelulosa para todos los factores excepto VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial). EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) y TGF (Factor de Crecimiento Transformante) tuvie-

ron una mayor liberación en el PRP gelificado. Por el contrario, la concentración de PDGF-BB (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas) fue superior en el PRP sin hidroxietilcelulosa. La proteína plasmática IGF (Factor de Crecimiento Insulínico), está presente en mayor cantidad en las muestras con más proporción de plasma (PRP no gelificado con hidroxietilcelulosa). La visualización de las muestras mediante microscopía electrónica verificó la preservación de la integridad y morfología plaquetaria tras centrifugación y gelificación.

2. Estudio clínico:

Se incluyeron once pacientes con 13 úlceras. La duración media de las lesiones fue de 12 meses (rango de 6 a 240). La etiología venosa fue la más frecuente.

La media de sesiones de tratamiento fue de 9 (6-15). Se consiguió la cicatrización completa en 10 úlceras, 1 reepitelización parcial y en 2 pacientes se necesitó la posterior aplicación de microinjertos para lograr la cicatrización completa. El dolor se redujo de manera significativa durante el período de tratamiento con PRP. Los resultados obtenidos en la encuesta de calidad de vida Dermatology Life Quality Index (DLQI) muestran un impacto significativo en la calidad de vida de los pacientes tratados.

DISCUSIÓN

Este estudio se diseñó para validar un nuevo método de obtención de PRP y determinar su beneficio en la práctica clínica.

Hemos observado que, a pesar de conseguir una menor concentración de plaquetas que otros sistemas, nuestro método obtiene concentraciones de factores de crecimiento similares e incluso superiores. El empleo de una centrifugación única con fuerza baja podría explicar este resultado, dado que las plaquetas están expuestas a un menor estrés mecánico y preservan su viabilidad, como hemos confirmado en las imágenes de microscopía electrónica. Por lo tanto, coincidimos con otros autores al proponer que el mantenimiento de la integridad de la plaqueta es más importante que la concentración de plaquetas obtenida. Por otro lado, nuestro método incluye leucocitos, lo que aumenta la liberación de factores de crecimiento. Hasta el momento actual no se ha encontrado una correlación entre los resultados clínicos, la concentración de plaquetas y factores de crecimiento y el volumen de PRP por área tratada. Con respecto a la composición ideal del PRP tampoco hay consenso.

Proponemos un método de gelificación del PRP que implica la adición de un polímero de celulosa para promover una liberación sostenida de factores de crecimiento y facilitar su aplicación tópica. En la literatura científica se han propuesto diferentes polímeros; sin embargo, el gel de hidroxietilcelulosa que hemos diseñado presenta varias ventajas: una rápida gelificación que posibilita la inmediata aplicación tras la mezcla con el PRP, la ausencia de componentes irritantes y el mantenimiento del ambiente húmedo que promueve la cicatrización. Las mediciones que realizamos tuvieron como objetivo observar y comparar la cinética de liberación de factores de crecimiento entre el PRP solo y la mezcla con el polímero celulósico. Encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto a la liberación de EGF, PDGF-BB, TGF e IGF. Las concentraciones de EGF y TGF fueron superiores en las muestras mezcladas con el

polímero. Por el contrario, la cantidad de PDGF-BB e IGF son superiores en el PRP solo. Dado que IGF es una proteína plasmática y el PRP gelificado con el polímero tiene menos plasma, esta diferencia es fácilmente explicable. La menor cantidad de PDGF-BB liberada durante las primeras 24 horas tras la formación del gel podría deberse a un atrapamiento en la malla polimérica, con una posterior liberación. Estos resultados indican que la liberación de citoquinas en nuestro gel depende de cada factor de crecimiento.

Varios estudios previos concluyen que la liberación de factores de crecimiento depende del método empleado. Sin embargo, sería interesante determinar si estas diferencias tienen repercusión en la clínica.

Nuestro estudio experimental, con un reducido número de pacientes, muestra resultados clínicos prometedores, que son similares y en algunos casos mejores que los de otras series publicadas. Además, solo hemos encontrado un trabajo publicado que refleje la disminución del dolor y la mejoría de la calidad de vida como variables resultado en la aplicación clínica del PRP, lo que hemos observado en nuestros pacientes.

Este estudio tiene varias limitaciones. La medida mediante ELISA de los factores de crecimiento no confirma su actividad biológica. Además, no hemos realizado determinaciones *in vivo* para estudiar las interacciones moleculares que puedan tener lugar en el lecho de la herida.

Con respecto a nuestra experiencia clínica, se trata de una serie pequeña sin grupo control. Para evaluar la utilidad real de nuestro método, debemos realizar un ensayo clínico aleatorizado bien diseñado.

CONCLUSIONES

1. El sistema de obtención de plasma rico en plaquetas propuesto es autólogo, ambulatorio, sencillo, económico y reproducible.
2. El método presentado obtiene una concentración de plaquetas superior a la basal. La cantidad de factores de crecimiento liberados no se correlaciona con la concentración de plaquetas.
3. Las diferencias entre la cinética de liberación de factores de crecimiento en PRP con gel de hidroxietilcelulosa y la del PRP sin añadir el polímero bioactivo es factor dependiente.
4. Al no haber diferencias significativas en los hallazgos de microscopía electrónica entre los diferentes preparados (sangre total, PRP y PRP gel), se puede concluir que la técnica de obtención y gelificación de PRP preserva la integridad de las plaquetas y no induce una activación precoz de las mismas.
5. Este método de obtención y aplicación de PRP representa una alternativa de tratamiento eficaz para el manejo de úlceras crónicas que no responden a tratamiento convencional, tanto de manera aislada como en combinación con otras técnicas regeneradoras.
6. Para establecer unas claras indicaciones de uso y extender su empleo en la práctica clínica habitual, se precisan ensayos clínicos bien diseñados que apoyen su utilidad.



Summary



INTRODUCTION

Platelet rich plasma (PRP) is a widespread technique throughout diverse fields of Medicine for improving tissue regeneration. In dermatology, the main applications during the last years have mainly been anti-aging treatments and wound healing.

PRP contains platelets in higher concentration than whole blood and, consequently, represents a growth factor pool. Chronic wounds are characterized by a prolonged inflammatory phase, involving a continuous destruction of matrix proteins and growth factors. Growth factors promote cell migration, proliferation and differentiation, which are essential for wound healing.

Regarding the therapeutic challenge that chronic ulcers represent in our daily clinical practice, PRP may be considered a suitable treatment option, whose efficacy has been proven both *in vivo* and *in vitro*. In the last years, several methods for obtaining PRP have been published and commercialized, with disposal kits at different prices. Products from these commercially available systems produce differing concentration of growth factors and other bioactive molecules. Moreover, different techniques have been suggested to obtain PRP gel for topical application, such as healing during non-negligible time. In our department, we have created a compassionate protocol in order to treat chronic cutaneous ulcers with PRP, which we obtain with economic material and an easily reproducible technique. In addition to these advantages, the polymer that we propose for gelification enables an immediate production of PRP gel. The benefits of our method are key points when considering including PRP treatment in our daily clinical practice.

HYPOTHESIS

Our technique achieves similar bioactive molecules than other commercialized methods which represent higher costs. The protocolization and extension of our technique at hospital level could represent a significant impact on the quality of life of our patients and healthcare costs.

OBJECTIVES

1. To validate our new easy, economic and reliable system for obtaining autologous PRP:

- a) To verify that this method provides sufficient platelet concentration and determine if platelet concentration correlates with growth factor release.
- b) To determine growth factor release kinetics from PRP gel and compare it with isolated PRP.
- c) To verify that platelets do not get activated or fragmented during manipulation, and do maintain integrity until application.

2. To determine clinical usefulness of this new PRP method for treating chronic cutaneous ulcers that are non-responders to conventional management.

METHODS

This study is composed of two parts:

1. Cross-sectional study with healthy donors in order to validate the technique. Blood samples obtained by venipuncture are used for: pre and post-centrifugation recount of platelets, quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel, and microscopic checking of the platelet morphology preservation after manipulation.

2. Experimental uncontrolled study, so that clinical utility of the method can be evaluated. Eleven patients with recalcitrant chronic ulcers were recruited. Inclusion and exclusion criteria were defined. Depending on the case, PRP application was intralesional or topical after gelification.

RESULTS

1. Validation study:

The overall average PRP platelet concentration was 1.59 higher than the baseline whole blood platelet concentration (Standard Deviation, SD, 0.39). Mean white blood cell concentration was 1.130/mm³ (SD1.11).

Regarding kinetics of growth factor release (measures at 20 minutes, 1 hour and 24 hours), differences were found between PRP and gelified PRP, except for VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). EGF (Epidermal Growth Factor) and TGF (Transforming Growth Factor) were released in higher concentration in gelified PRP. On the contrary, PDGF-BB (Platelet Derived Growth Factor) concentration was higher in PRP without gel. IGF (Insulin Growth Factor), a plasmatic protein, is present in higher quantity in samples with more plasma (non gelified PRP).

Images with electronic microscopy verified that platelet morphology was preserved after both centrifugation and gelification.

2. Clinical study:

Eleven patients with 13 ulcers were included. Average ulcer duration was 12 months (6-240). Venous aethiology was the most frequent.

Median number of treatment sessions was 9 (6-15). Complete healing was achieved in 10 ulcers, 1 partial reepitelization in one case, and punch grafts were needed in 2 patients in order to achieve complete healing. Pain was significantly reduced during PRP treatment. Dermatology Life Quality Index (DLQI) results revealed a significant impact of this intervention on quality of life.

DISCUSSION

This study was designed to validate a new method of obtaining PRP and explore its clinical benefits.

We observed that, despite the lower platelet concentration, our method achieves similar and even higher growth factor concentration than other systems. This result could be explained by the fact that we use a low force single-step centrifugation. Consequently, platelets are exposed to less mechanical forces and maintain their viability, as we confirmed with electronic microscopy images. We agree with other authors and propose that platelet integrity is more important than platelet concentration. Secondly, our method includes white blood cells, which increase growth factor release. Up to date, no correlation has

been found between clinical results, platelet and growth factor concentration and PRP volume per treated area. Moreover, no consensus exists considering ideal PRP composition.

Our method suggests PRP gelification by adding a bioactive cellulose polymer, in order to promote a sustained growth factor release and facilitate topical application. Different polymers have been suggested in the literature. However, the hydroxyethylcellulose gel that we have created presents several advantages: high speed of gel formation allows immediate application of the gel right after the mixture between plasma and polymer, the gel does not cause irritation nor chemical reactions and maintains humidity conditions that promote healing.

Measures were taken in order to observe and compare the kinetics of growth factor release between PRP alone and mixed with the cellulose polymer. Statistically significant differences have been observed considering release of EGF, PDGF-BB, TGF and IGF. EGF and TGF concentrations are higher after polymer mixture. On the other hand, PDGF-BB and IGF concentrations are superior without the gel. As IGF is a plasmatic protein and PRP gel has less plasma, this difference could be easily explained. Lower amount of PDGF-BB released during the first 24 hours in the gel might be related to a possible gel entrapment and later release. These results perfectly show that protein release in our gel is growth factor-dependent.

As previous studies conclude, growth factor release varies depending on the method. However, it would be interesting to determine the possible clinical consequences of these differences.

Our small interventional study demonstrates promising clinical results of our method, which are similar or even better than other published series. As far as we know, just a single previous study has assessed amelioration of pain and quality of life with PRP application in chronic ulcers, with the same findings that we have observed in our patients.

There are several limitations of this study. ELISA measurement of growth factors does not confirm biological activity of these proteins. Moreover, no *in vivo* studies have been made and no data regarding molecular interactions in the wound have been collected.

Considering clinical experience, we present a limited uncontrolled case series. A well-designed randomized clinical trial is needed to evaluate the real utility of our new method.

CONCLUSIONS

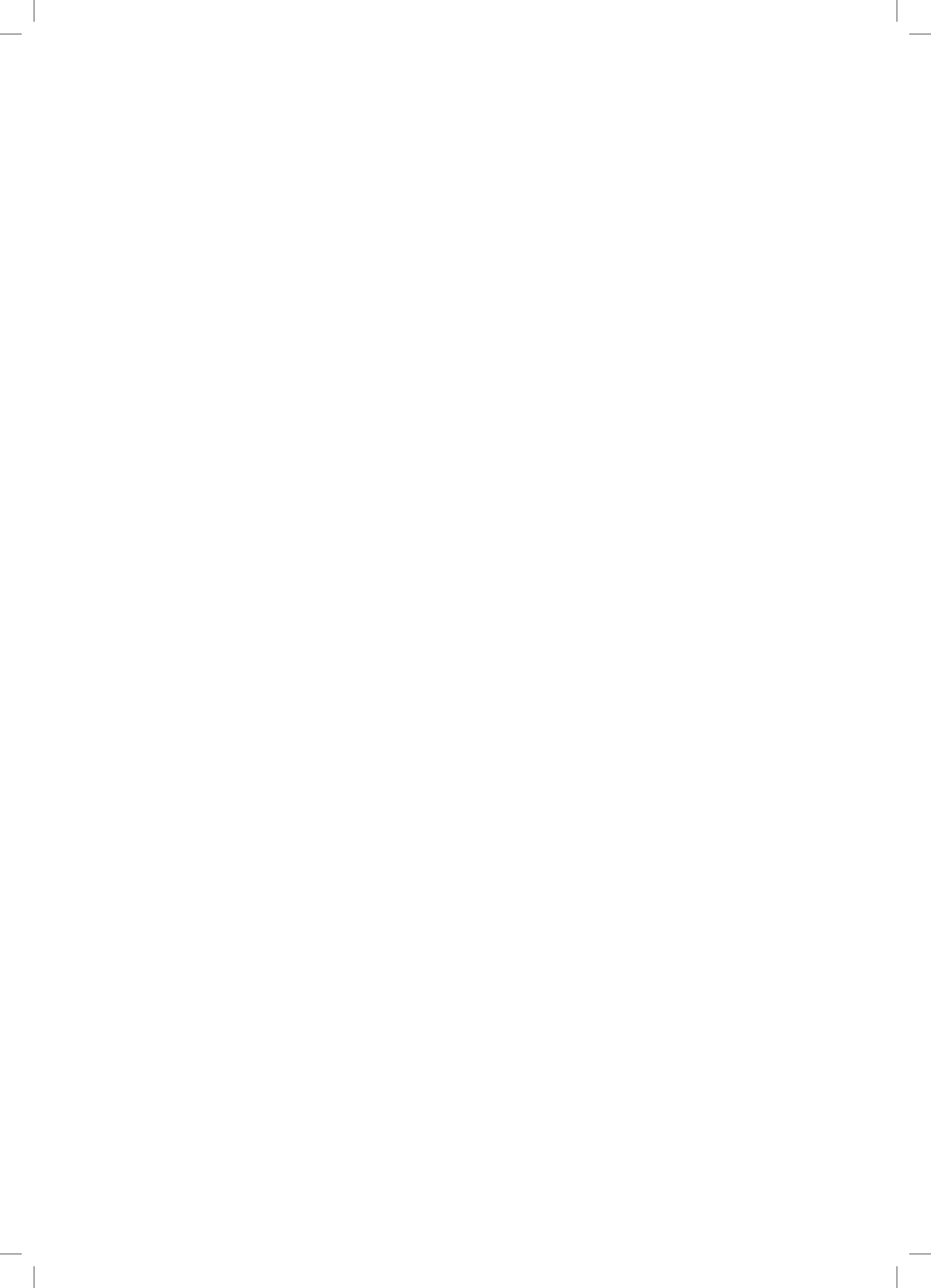
1. The method that is suggested for obtaining PRP is autologous, easy, economic and reproducible, on an outpatient basis.
2. Platelet concentration achieved with this system is superior to baseline whole blood concentration. Growth factor release does not correlate with platelet concentration.
3. Kinetics of growth factor release in PRP differs when the hydroxyethylcellulose polymer is added. This variability is growth factor-dependent.
4. Considering that no significant differences in platelet morphology were

found during examination with electronic microscopy of whole blood, PRP and PRP mixed with cellulose polymer, we can conclude that this procedure does not destroy and early activate platelets.

5. The method that is proposed for obtaining and application of PRP represents a viable treatment alternative for recalcitrant chronic ulcers, both as isolated therapy and in combination with other regenerative techniques.
6. Stronger scientific evidence is required to support its potential benefit for use in chronic wounds.



Résumé



Le plasma riche en plaquettes (PRP) est une technique utilisée dans plusieurs domaines de la médecine afin d'améliorer la régénération tissulaire. En Dermatologie, les principales applications pendant ces dernières années sont le domaine de l'esthétique, notamment le traitement anti-âge, et la cicatrisation des plaies.

Le PRP se caractérise pour avoir une concentration de plaquettes supérieure à celle du sang complet, donc il représente un réservoir de facteurs de croissance.

Les plaies chroniques se caractérisent par présenter une phase inflammatoire anormalement prolongée, qui implique une destruction continue de protéines de matrice et de facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance encouragent la migration, prolifération et différenciation cellulaire, qui sont fondamentaux dans le processus de cicatrisation.

Devant le défi que les plaies chroniques impliquent dans notre pratique clinique habituelle, le PRP suppose une intéressante alternative de traitement, dont l'efficacité a été démontré *in vitro* et *in vivo*. Dans ces derniers années, plusieurs méthodes d'obtention de PRP ont été publiés et commercialisés, qui normalement impliquent l'utilisation de kits jetables de prix variables.

HIPOTHÈSE

L'hypothèse de ce travail est que, avec cette technique, on obtient des molécules bioactives fonctionnelles à un niveau similaire que les méthodes commercialisées qui impliquent l'achat de kits de matériel jetable et, en conséquence, un coût plus haut.

Compte tenu de la forte prévalence de cette pathologie, avec une diminution notable de la qualité de vie des patients et des importantes dépenses de santé associés, l'expansion de notre méthode pourrait avoir un grand impacte socio-sanitaire.

OBJECTIVES

1. Valider un nouveau système d'obtention de plasma riche en plaquettes autologue, ambulatoire, simple, bon marché et reproductible:

- a) Vérifier que la méthode que l'on présente obtient une concentration de plaquettes suffisante et déterminer s'il existe une corrélation entre la concentration de plaquettes et la quantité de facteurs de croissance libérés.
- b) Déterminer la cinétique de libération de facteurs de croissance dans le gel d'hydroxyéthylcellulose et la comparer avec celle dans le PRP sans ajouter ce polymère bioactive.
- c) Vérifier que la technique d'obtention et gélification préserve l'intégrité plaquettaire jusqu'au moment de l'application.

2. Établir l'utilité de cette méthode d'obtention et application de PRP comme une alternative de traitement efficace pour les plaies chroniques qui ne répondent pas aux soins conventionnels.

MÉTHODE

L'étude se compose de deux parties:

1. Étude transversale avec des échantillons de sang de volontaires sains pour valider la technique. Le sang prélevé est utilisé pour: la quantification de plaquettes pre- et post-centrifugation, la détermination de la cinétique de libération de facteurs de croissance dans le gel de PRP et la visualisation de la préservation de la morphologie plaquettaire après la manipulation.

2. Étude expérimentale non contrôlée pour évaluer l'utilité clinique de la méthode. Des critères d'inclusion et exclusion ont été établis et 11 patients avec 13 plaies chroniques ont été inclus. Selon le cas, l'application est intra lésionnelle ou topique après la gélification du PRP.

RÉSULTATS

1. Étude de validation:

La concentration de plaquettes moyenne a été 1,5 fois supérieure à celle du sang complet (écart type 0,39). La concentration moyenne de leucocytes a été 1.130/mm³ (écart type 1.110).

Par rapport à la cinétique de libération de facteurs de croissance (mesures registrés aux 20 minutes, 1 heure et 24 heures), on a trouvé des différences entre le PRP isolé et celui mélangé avec le gel d'hydroxyéthylcellulose pour tous les facteurs sauf VEGF (Facteur de croissance vasculaire endothélial). EGF (Facteur de croissance épidermique) et TGF (Facteur de croissance transformateur) ont été libérés d'une manière plus importante dans le PRP gélifié. Par contre, la concentration de PDGF-BB (Facteur de croissance dérivé des plaquettes) a été supérieure dans les échantillons de PRP sans l'hydroxyéthylcellulose.

La protéine plasmatique IGF (Facteur de croissance insulinique) s'est trouvée en concentration plus élevée dans les échantillons avec une proportion plus haute de plasma (PRP non gélifié avec le polymère). L'examen avec le microscope électronique a vérifié la préservation de l'intégrité et morphologie plaquettaire après la centrifugation et gélification.

2. Étude clinique:

On a inclus 11 patients avec 13 ulcères chroniques. La durée moyenne des lésions a été 12 mois (intervalle entre 6 et 240). L'étiologie veineuse a été la plus fréquente. Le nombre moyen de sessions de traitement a été 9 (6-15). On a obtenu l'épithélisation complète dans 10 ulcères, 1 épithélisation partielle et, chez 2 patients on a dû utiliser des greffes en pastille pour obtenir la cicatrisation complète. La douleur s'est réduite d'une manière significative pendant la période de traitement avec PRP. Les résultats obtenus dans l'enquête de qualité de vie Dermatology Life Quality Index (DLQI) montrent un impact sur la qualité de vie des patients qui ont reçu le traitement.

DISCUSSION

Cette étude a été conçue pour valider une nouvelle méthode d'obtention de PRP et pour déterminer son bénéfice dans la pratique clinique habituelle.

On a observé que, malgré l'obtention d'une concentration de plaquettes moins nombreuse que celles avec d'autres systèmes, notre méthode obtient des concentrations de facteurs de croissance similaires et même supé-

rieures. L'utilisation d'une centrifugation unique à une vitesse de rotation basse pourrait expliquer ce résultat, car les plaquettes s'exposent à un stress mécanique plus faible et préservent leur viabilité, comme l'on a constaté dans les images de microscopie électronique. En conséquence, on est d'accord avec d'autres auteurs qui proposent que le soutien de l'intégrité plaquettaire est plus important que la concentration de plaquettes que l'on obtient. D'autre part, notre méthode inclut des leucocytes, ce qui augmente la libération de facteurs de croissance. Jusqu'au moment, on n'a pas trouvé une corrélation entre les résultats cliniques, la concentration de plaquettes et facteurs de croissance et le volume de PRP par surface traitée. Par rapport à la composition idéale du PRP, il n'y a pas de consensus.

On propose une méthode de gélification du PRP qui implique ajouter un polymère de cellulose afin d'encourager une libération progressive de facteurs de croissance et favorise l'application topique. Plusieurs polymères ont été décrits dans la littérature scientifique. Cependant, le gel d'hydroxyéthylcellulose que l'on a conçu présente des avantages: une rapide gélification qui encourage l'application immédiate après le mélange avec le PRP, l'absence de composants irritatives et le soutien d'un milieu humide qui facilite la cicatrisation. L'objectif des mesures que l'on a faites a été l'observation et comparaison de la cinétique de libération de facteurs de croissance entre le PRP isolé et le mélange avec le polymère cellulosique. On a trouvé des différences statistiquement significatives par rapport à la libération d'EGF, PDGF-BB, TGF et IGF. Les concentrations d'EGF et TGF ont été supérieures dans les échantillons de PRP mélangés avec le polymère. Par contre, les quantités de PDGF-BB et IGF ont été supérieures dans le PRP isolé. Étant donné que IGF est une protéine plas-

matique et le PRP gélifié avec le polymère a moins de plasma, cette différence est facilement explicable. L'inférieure quantité de PDGF-BB libérée pendant les premières 24 heures après la formation du gel pourrait être expliquée par un coincement dans la maille polymérique, avec une libération postérieure. Ces résultats indiquent que la libération de cytokines dans notre gel dépend de chaque facteur de croissance.

Plusieurs études concluent que la libération de facteurs de croissance dépend de la méthode utilisée. Néanmoins, il serait intéressant de déterminer si ces différences ont une répercussion clinique.

Notre étude expérimentale, avec un nombre de patients notamment faible, montre des résultats cliniques prometteurs, qui sont similaires et, dans certains cas, meilleurs que ces d'autres séries publiées. De plus, on n'a trouvé qu'un travail publié qui considère la réduction de la douleur et l'amélioration de la qualité de vie comme des variables résultat dans l'application clinique du PRP, une constatation que l'on a fait avec nos patients.

Cette étude a plusieurs limitations. La mesure de facteurs de croissance avec ELISA ne confirme pas leur activité biologique. D'autre part, on n'a pas fait des déterminations *in vivo* afin d'étudier les interactions moléculaires qui peuvent avoir lieu dans le lit de la plaie.

Par rapport à notre expérience clinique, la série est notamment petite, sans groupe contrôle. Afin d'évaluer l'utilité réelle de notre méthode, on devrait faire un essai clinique contrôlé randomisé bien conçu.

CONCLUSIONS

1. Le système d'obtention de plasma riche en plaquettes que l'on propose est autologue, ambulatoire, simple, bon marché et reproductible.
2. La méthode que l'on présente obtient une concentration de plaquettes supérieure à celle de base. Il n'existe pas de corrélation entre la concentration de plaquettes et la quantité de facteurs de croissance libérés.
3. Les différences entre la cinétique de libération de facteurs de croissance dans le gel d'hydroxyéthylcellulose et celle dans le PRP sans ajouter le polymère bioactive est facteur-dépendant.
4. Étant donné qu'il n'y a pas de différences entre les découvertes de microscopie électronique des différentes préparations (sang complet, PRP et gel de PRP), on peut en conclure que la technique d'obtention et gélification préserve l'intégrité plaquettaire et n'induit pas une activation précoce.
5. Cette méthode d'obtention et application de PRP constitue une alternative de traitement efficace pour les plaies chroniques qui ne répondent aux soins conventionnels, soit de manière isolée ou en combinaison avec d'autres techniques
6. Pour établir des instructions d'utilisation claires et étendre son utilisation dans la pratique clinique habituelle, on a besoin d'essais cliniques bien conçus afin de soutenir l'intérêt de ce traitement.



I. Antecedentes y Justificación



El plasma rico en plaquetas (PRP) es una técnica extendida en múltiples campos de la medicina, con aplicaciones descritas en una amplia variedad de patologías y situaciones clínicas.

Su uso en dermatología va más allá de su popular asociación con el envejecimiento facial. Ante el reto terapéutico que supone el manejo de las úlceras cutáneas crónicas, representa una alternativa de tratamiento con eficacia demostrada *in vivo* e *in vitro*.

El PRP se define por contener una concentración de plaquetas superior a la basal en sangre periférica. Las plaquetas, además de su papel imprescindible en la cascada de la coagulación, almacenan en su interior proteínas esenciales en la cicatrización. El plasma también posee moléculas bioactivas que estimulan la migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular.

Las úlceras cutáneas crónicas con mala evolución a pesar de un adecuado manejo convencional representan un problema muy prevalente, con un importante impacto psicosocial en los pacientes y un gran gasto sanitario. Entre los factores que se han involucrado en la promoción de la cronicidad de estas lesiones se encuentran el déficit de factores de crecimiento y la producción de fibrina deficiente. Aunque es imposible predeterminar la magnitud del efecto estimulador del proceso de curación de las heridas mediante el empleo de PRP, por la gran variabilidad interindividual y la influencia de factores propios de cada caso y de cada herida en particular, lo que sí está científicamente demostrado es la correlación positiva entre la aplicación del mismo y el acortamiento temporal del proceso, gracias a su riqueza en factores de crecimiento, y a sus propiedades mitogénicas y quimiotácticas.

Tradicionalmente, los métodos utilizados para la obtención del PRP precisaban gran cantidad de sangre, fundamentalmente el método de plasmaféresis, que necesitaba de un aparataje complicado y de uso exclusivamente hospitalario, haciendo que éste fuera poco operativo y sólo útil en la cirugía reconstructiva.

Anitua y colaboradores¹ describieron, hace más de diez años, el plasma rico en factores de crecimiento como un método ambulatorio que no necesitaba de una complicada instalación ni una gran cantidad de sangre para tener un coágulo rico en plaquetas y, por tanto, rico en factores de crecimiento. De forma ambulatoria y con una centrífuga de laboratorio convencional, obtenían resultados clínicos muy llamativos.¹ Este método, por su simplicidad, se ha hecho muy popular. Consiste en la extracción de sangre mediante venopunción en la flexura del brazo; dicha sangre, que se mezcla en un tubo de ensayo con citrato sódico para evitar su coagulación, se centrifuga a una velocidad y tiempos determinados, de forma que se separan los elementos formes más pesados de los más ligeros, para su posterior decantación. Posteriormente, con la ayuda de unas pipetas de laboratorio, se extraen del tubo original las fracciones de plasma con menor concentración en plaquetas, aspirando desde la superficie, hasta llegar a la zona del plasma con mayor concentración de plaquetas, inmediatamente por encima de la serie roja, que es la fracción con interés terapéutico. Previamente a su aplicación, se añade un activador para inducir la formación de la malla de fibrina y la liberación de los factores de crecimiento de las plaquetas. Tras validar su técnica, se ha comercializado y cada tratamiento representa un coste significativo.

En el momento actual, se pueden encontrar en el mercado múltiples métodos de obtención de plasma rico en plaquetas, con sus respectivos kits

de desechables. Dependiendo del sistema empleado, las concentraciones de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y factores de crecimiento pueden variar.^{2,3,4} Las implicaciones clínicas de las diferencias de composición de los diferentes preparados no están claramente descritas. Para la obtención y optimización del gel de PRP, algunos autores proponen el uso de diferentes polímeros bioactivos^{5,6}, la mayoría de difícil adquisición y empleo en la práctica clínica diaria. En el contexto de esta diversificación destaca la ausencia de estandarización de preparación y uso.

Dado el notable crecimiento de uso del PRP en diferentes campos de la medicina en los últimos años, principalmente en estética, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) considera, desde el 23 de mayo de 2013, que el PRP es un medicamento de uso humano.⁷ Sin embargo, en pocas indicaciones se han realizado ensayos clínicos de la suficiente calidad como para poder extraer conclusiones. Las revisiones sistemáticas disponibles en la actualidad no demuestran mejoría estadísticamente significativa en el manejo con PRP en comparación con las curas convencionales, lo que contrasta con los buenos resultados descritos en casos clínicos descritos aislados.⁸ El escaso número y la cantidad deficiente de los ensayos clínicos que encontramos en la literatura puede explicar la ausencia de detección de diferencias. En el informe anteriormente citado, la AEMPS hace un llamamiento para que se realicen ensayos clínicos robustos y se disponga de mayor evidencia científica para poder establecer las indicaciones del PRP.

En el servicio de Dermatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), tras el diseño de un protocolo de uso compasivo, hemos comenzado a tratar úlceras crónicas recalcitrantes con plasma rico en

plaquetas, que obtenemos con material económico y una técnica fácilmente reproducible, a partir del método descrito por Anitua y colaboradores¹. Teniendo en cuenta la necesidad de reducir los gastos sanitarios, empleamos un método manual y hemos diseñado un gel sencillo de obtener y económico, para optimizar la aplicación tópica del PRP en úlceras cutáneas.

La experiencia de nuestro equipo investigador es que, si no calentamos el PRP o le añadimos un polímero bioactivo gelificante, no conseguimos la consistencia deseada.

La obtención de un producto gelificado es esencial para poder ser aplicado tópicamente sin derramamiento.

La novedad está en que proponemos un gel de PRP que conseguimos con material económico y una técnica fácilmente reproducible. Para obtener el PRP, utilizamos un procedimiento validado, pero con material propio y barato. Para conseguir la consistencia deseada para su aplicación tópica, hemos diseñado un gel con propiedades beneficiosas tanto para la viabilidad del PRP como para la promoción del ambiente idóneo para la curación de la herida.

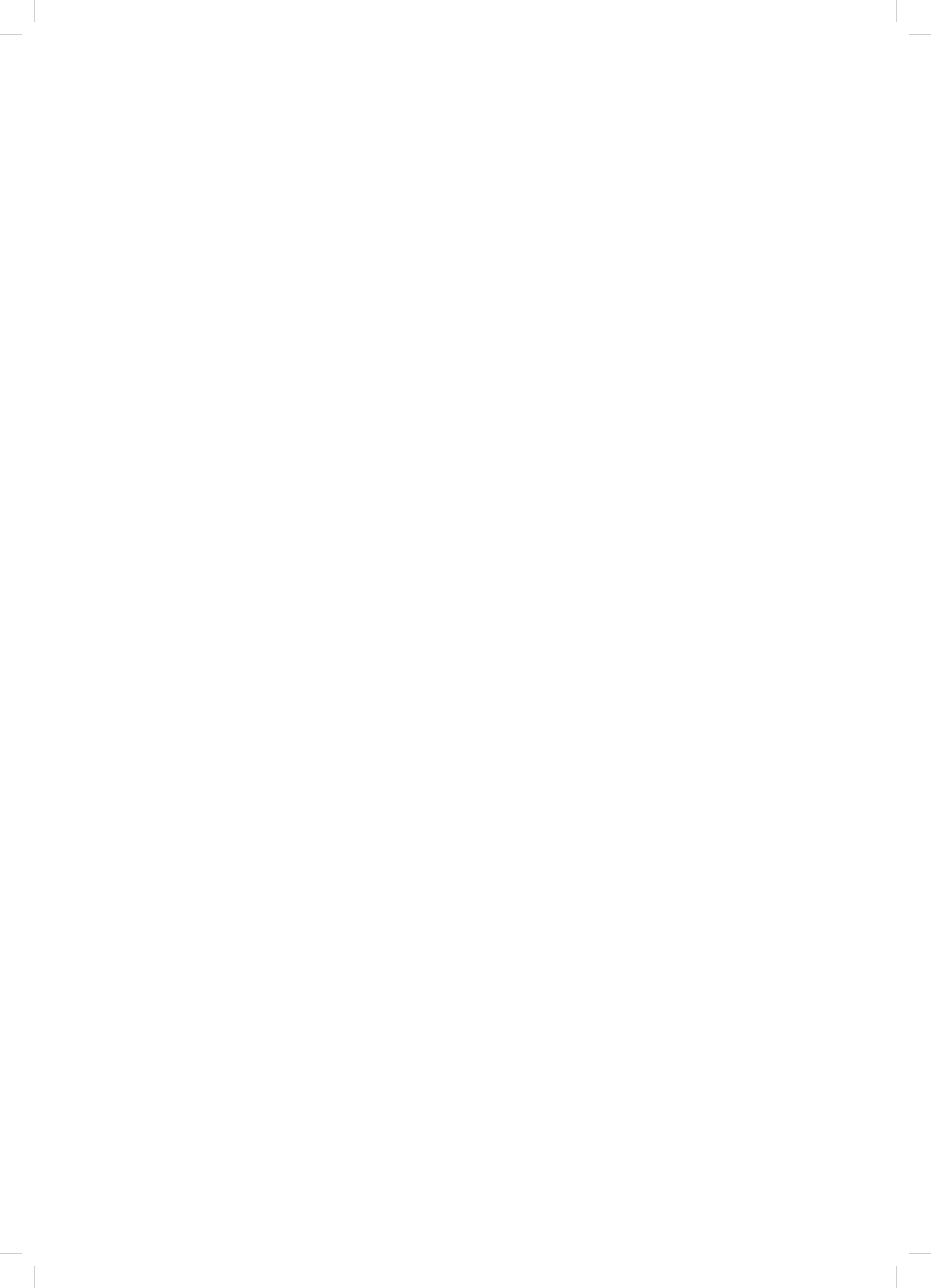
Las plaquetas son muy sensibles a cualquier tipo de manipulación, por lo que la centrifugación, separación y posterior formación del gel representan procesos traumáticos para su viabilidad. La cantidad de factores de crecimiento disponibles tras el proceso depende de la acumulación de estos factores estresores. La gelificación que se produce de manera natural tras activar el plasma se debe a la formación de una malla de fibrina. La calidad de este gel es muy variable entre individuos, lo que influye en la biodisponibilidad de factores de

crecimiento. Por ello, se han propuesto diferentes polímeros bioactivos para optimizar la gelificación del PRP y la bioactividad de sus componentes.^{9,6}

Nosotros optamos por el agente gelificante denominado hidroxietilcelulosa (HEC), que tiene la propiedad de formar geles semisólidos por medio de imbibición. El gel de hidroxietilcelulosa como excipiente base forma una microcapa a modo de malla no oclusiva que evita los típicos fenómenos de congestión producida por otros tipos de geles hidrofílicos u oleosos. Dicho mecanismo de por sí ya favorece el proceso normal de cicatrización. Este gel favorece la liberación gradual a través de la piel de las sustancias añadidas, en este caso del plasma rico en plaquetas, no produce reacciones de irritación ni interacciones químicas sobre la piel al ser no iónico y no depender del pH para su obtención. Tras la activación del PRP, se añade al gel de hidroxietilcelulosa y se aplica sobre la úlcera.

Dada la sobrecarga asistencial y la necesidad de reducción de gasto del Sistema Nacional de Salud, el método se caracteriza por su sencillez, bajo coste asociado y rapidez de aplicación.

Por estos motivos, creemos que está justificada, por un lado, la presentación del estudio de validación de nuestro método de obtención de gel de plasma rico en plaquetas ambulatorio, sencillo, fiable y económico, para su aplicación en úlceras crónicas que no responden a tratamiento convencional. Por otra parte, mostramos los resultados del estudio prospectivo en el que hemos incluido a los pacientes con úlceras cutáneas crónicas recalcitrantes que hemos manejado con PRP.



II. Hipótesis de trabajo y Objetivos



En la actualidad existen varios métodos de obtención de PRP descritos en la literatura. Cada uno propone diferentes tiempos y velocidades de centrifugación, así como aparatos de características especiales.³ Diferentes autores han descrito buenos resultados clínicos con la aplicación de PRP obtenido de manera manual.² Sin embargo, en la metodología detallada en la mayoría de las publicaciones, no se concreta el modo de gelificación del PRP. Esto representa un obstáculo para que la aplicación de la técnica se extienda de manera sencilla, protocolizada y económica.

Desde diciembre de 2012 a marzo de 2014, en el Servicio de Dermatología del Hospital Gregorio Marañón tratamos de manera compasiva con PRP a pacientes con úlceras cutáneas crónicas que no responden a tratamiento convencional. A pesar de la existencia de métodos comercializados, decidimos emplear uno manual y abierto, basándonos en lo descrito en la literatura.

La hipótesis de nuestro trabajo es que con nuestra técnica obtenemos moléculas bioactivas funcionales en similar grado que los métodos comercializados que implican la compra de kits de consumibles y, consecuentemente, un mayor gasto. Dada la elevada prevalencia de esta patología, con una disminución importante de la calidad de vida de los pacientes y un elevado gasto sanitario asociado, la expansión del método que proponemos podría tener un gran impacto sociosanitario.

Consecuentemente, los objetivos de nuestro trabajo son:

1. Validar nuestro nuevo sistema de obtención de plasma rico en plaquetas autólogo, ambulatorio, sencillo, económico y reproducible:

- a) Comprobar que éste proporcione la suficiente concentración de plaquetas y determinar si la concentración plaquetaria se correlaciona con la cantidad de factores de crecimiento liberados.
- b) Determinar la cinética de liberación de factores de crecimiento en el gel de hidroxietilcelulosa, y compararla con la del PRP sin añadirle la hidroxietilcelulosa.
- c) Verificar que no active o fragmente las plaquetas por su manipulación, y las mantenga íntegras hasta el momento de su utilización.

2. Determinar la utilidad clínica de la aplicación de nuestro método de obtención de plasma rico en plaquetas en el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas que no han respondido a tratamiento convencional.

III. Introducción



3.1. HERIDAS CUTÁNEAS

3.1.1. CLASIFICACIÓN

Las heridas cutáneas son pérdidas de sustancia que pueden clasificarse según su profundidad, duración y etiología.

Con respecto a la profundidad, si sólo se ha perdido la epidermis, hablamos de una erosión. Si la herida afecta planos más profundos, la denominamos úlcera. Si la pérdida de tejido incluye la epidermis y partes de la dermis, se trata una herida de espesor parcial. Si, por el contrario, existe una destrucción completa de la dermis, se considera herida de espesor total.

Según la duración, las heridas se clasifican en agudas o crónicas. Las heridas agudas se caracterizan por obtener la curación completa, recuperando su integridad anatómica y funcional en el tiempo y de la manera esperados. Se considera úlcera cutánea crónica a una pérdida de sustancia que afecta a la epidermis, la dermis y, en ocasiones, a planos más profundos, que no cura en el tiempo esperado, presentando una escasa tendencia a la cicatrización.¹⁰

La definición de úlcera crónica no está claramente descrita en la literatura. Según Leaper y Durani¹¹, cualquier herida que no ha presentado una reducción en extensión del 20–40% tras 2-4 semanas de tratamiento óptimo, debería etiquetarse como úlcera crónica. Existe consenso para considerar que una úlcera es crónica si no alcanza una curación completa en 6 semanas o no existe respuesta adecuada a un cambio de tratamiento.¹²

La etiología de las úlceras cutáneas es múltiple. Las más frecuentes

son las úlceras de miembros inferiores y, dentro de éstas, las de origen venoso. También son muy prevalentes las arteriales, por presión, las neuropáticas, esencialmente por lepra y diabetes, y la úlcera hipertensiva de Martorell. Entre otras causas se encuentran las producidas por traumatismos, quemaduras, linfedema, picaduras, vasculitis, vasculopatías, infecciones, neoplasias, fármacos (como la hidroxiurea), pioderma gangrenoso, paniculitis, estados de hipercoagulabilidad, lesiones facticias. Algunos síndromes genéticos caracterizados por una senescencia celular precoz, como el tipo de progeria denominado síndrome de Werner, también son causa de la aparición de heridas crónicas.¹³

3.1.2. FISIOLÓGÍA DE LA CICATRIZACIÓN NORMAL

La cicatrización es el proceso natural para regenerar los tejidos de la dermis y epidermis que han sufrido una herida. Cuando se trata de una erosión, con afectación exclusivamente de la epidermis, ésta se restaura consiguiendo una estructura similar a la pre-lesional. Si, por el contrario, se afectan estructuras más profundas, esta regeneración no se produce, quedando una cicatriz.

En las úlceras agudas, existe un mecanismo diferente de cicatrización en función de si las lesiones son de espesor parcial o total. En las heridas de espesor parcial, los anejos están preservados. Estas estructuras sirven como reservorio de células epiteliales y la reepitelización se produce desde los bordes y el centro de la lesión. En las heridas de espesor total, dado que los anejos no están presentes, la reepitelización sólo es posible desde los bordes.

Cuando se sufre una herida, se producen una serie de complejos fe-

nómenos bioquímicos que se suceden para reparar el daño. Estos fenómenos ocurren con cierto solapamiento temporal y pueden ser divididos para su estudio en las siguientes fases: inflamatoria, proliferativa y de remodelación.

– **Fase inflamatoria:**

Este primer tiempo consta de una respuesta vascular y celular. Las plaquetas son las primeras células en intervenir, con su papel hemostático y su activación de la cascada de liberación de factores de crecimiento que estimulan la cicatrización. Se produce vasodilatación, extravasación de líquido al espacio extracelular y un bloqueo del drenaje linfático, con la consiguiente aparición de los signos cardinales de la inflamación (calor, rubor y tumor). Esta primera fase suele durar 24-48 horas, pero en algunos pacientes se puede prolongar hasta 2 semanas. En caso de una mayor duración, se trataría de una inflamación crónica.

Al producirse una herida, se dañan los vasos y el colágeno queda expuesto. Este colágeno y la trombina que se genera en el proceso de hemostasia, estimulan a las plaquetas, produciéndose su activación, adhesión y agregación. Las plaquetas liberan diferentes mediadores como la serotonina, tromboxano A₂, fibrinógeno, fibronectina y trombospondina, con lo que se mantiene activo el proceso de agregación para frenar el potencial sangrado. El fibrinógeno derivado de las plaquetas se convierte en fibrina, que actúa como matriz para monocitos y fibroblastos. La liberación de prostaciclina por las células endoteliales inhibe la agregación plaquetaria, por lo que limita la extensión del proceso. En esta fase inflamatoria es esencial el papel de factores de crecimiento, como el PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas), con propiedades quimiotácticas, angiogénicas y mitogénicas.

En las primeras horas de la fase inflamatoria, los neutrófilos y los monocitos son las células predominantes en el lugar de la lesión. Posteriormente, su número disminuye y aumenta la cantidad de macrófagos.

- Fase proliferativa:

En esta segunda fase predomina la respuesta celular y es la etapa en la que se crea una barrera permeable (reepitelización), se establece un adecuado aporte sanguíneo (revascularización) y un refuerzo del tejido dañado (fibroplasia).

La epitelización se define como la formación de epitelio sobre una zona desprovista de él. Implica la migración de las células epiteliales desde los bordes de la herida hacia el centro. Este proceso comienza horas después del daño tisular. Los queratinocitos de los bordes de la herida sufren cambios estructurales, rompen sus uniones celulares y con la membrana basal, y quedan libres para migrar sobre la superficie de la lesión, gracias a la formación de microfilamentos de actina intracelulares. En las heridas de espesor parcial, las estructuras anexiales que persisten en el lecho contribuyen a la reepitelización.

Las células epidérmicas secretan colagenasas y activador de plasminógeno. La producción de plasmina promueve la disolución del coágulo y permite la migración de los queratinocitos. Cuando la reepitelización se completa, las células epidérmicas recuperan sus uniones intercelulares y con la membrana basal. El ambiente húmedo favorece la reepitelización de las heridas. Diferentes estudios muestran los beneficios de la cura oclusiva para limitar la inflamación, restaurar la función barrera e incrementar la hidratación cutánea.¹⁴

La angiogénesis se define como la migración y proliferación de las células endoteliales para formar nuevos vasos en lecho de la herida, y depende de la fibronectina, heparina y factores de crecimiento liberados por las plaquetas y macrófagos. La familia de factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) son potentes estímulos que promueven la neovascularización. Las trombospondinas son inhibidores endógenos de la angiogénesis que limitan el proceso.

En el proceso de fibroplasia, el fibroblasto es la célula responsable de la producción de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos y proteinasas. Su número aumenta en la herida cuando disminuye la inflamación.

La fibroplasia comienza de 3 a 5 días tras la aparición de la herida, y puede durar 2-4 semanas. La migración y proliferación de los fibroblastos se produce con la estimulación de la fibronectina, PDGF, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante (TGF).

La síntesis y depósito de colágeno es esencial. Se secreta al espacio extracelular en forma de procolágeno, que se agrega formando tropocolágeno y posteriormente filamentos y fibras de colágeno. Este proceso ocurre en un gel matricial formado por glicosaminoglicanos, ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatansulfato y heparinsulfato, producidos por los fibroblastos. La cantidad de colágeno en la herida está limitada por las colagenasas y otros factores que pueden destruirlo.

Aproximadamente el 80% del colágeno en la piel normal es tipo I, el resto tipo III. Por el contrario, el colágeno tipo III es el componente esencial del tejido de granulación temprano y abundante en el tejido embrionario

– *Fase de remodelación:*

La remodelación del colágeno durante esta fase depende del balance entre su síntesis y destrucción, a lo que contribuyen las colagenasas y las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Para regular este proceso, los inhibidores de las metaloproteinasas tisulares (TIMPs) limitan la acción de estas enzimas proteolíticas.

El colágeno se organiza, la fibronectina desaparece y el ácido hialurónico y los glicosaminoglicanos son reemplazados por proteoglicanos. El colágeno tipo III es sustituido por colágeno tipo I.

Esta fase comienza aproximadamente a las 3 semanas de la producción de la herida, cuando la cantidad de colágeno en el lecho se mantiene estable.

Las citoquinas son unas proteínas mediadoras esenciales en el proceso de curación, liberadas por diferentes células, que pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina. Entre las citoquinas más importantes en esta fase se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), FGF, PDGF, VEGF, factor de crecimiento transformante beta (TGFB).

3.1.3. CRONIFICACIÓN DE LAS HERIDAS

Las úlceras cutáneas crónicas recalcitrantes que no responden a tratamiento convencional representan un problema muy prevalente, con un importante impacto psicosocial en los pacientes y un gran gasto sanitario asociado. En los diferentes estudios sobre calidad de vida, los pacientes con

úlceras crónicas refieren gran afectación emocional, principalmente a causa del dolor, la apariencia de las lesiones, el exudado de las mismas, el mal olor y la situación de dependencia asociada.¹⁵ El primer estudio de prevalencia de úlceras crónicas de extremidades inferiores en población española encontró que ésta era del 0,16%.¹⁶

Las úlceras cutáneas crónicas más prevalentes en nuestro medio son las vasculares de extremidades inferiores, las del pie diabético y las úlceras por presión. A pesar de un diagnóstico y un manejo adecuados, incluso en unidades especializadas de úlceras crónicas, hasta un 20% de las úlceras no evolucionan favorablemente.¹⁷

El ambiente bioquímico que promueve la cronicidad de estas lesiones se define por una prolongación de la fase inflamatoria debido a aumento de las citoquinas pro-inflamatorias y la actividad de las metaloproteinasas, con el consiguiente déficit de factores de crecimiento y de fibrina. La hipoxia y necrosis tisular, así como las infecciones de repetición, promueven el exceso de enzimas proteolíticas, las metaloproteinasas, que destruyen la matriz extracelular e impiden la cicatrización.¹⁸ La cantidad de metaloproteinasas se correlaciona con la duración y cronificación de una herida, al contrario que la fibronectina, dado que su presencia estimula la cicatrización. Para conseguir una intervención exitosa con estos pacientes, ha de cortarse este círculo vicioso (Figura 3.1). En este contexto, el aporte de factores de crecimiento y la inhibición de la acción de las metaloproteinasas en la herida son estrategias terapéuticas interesantes.

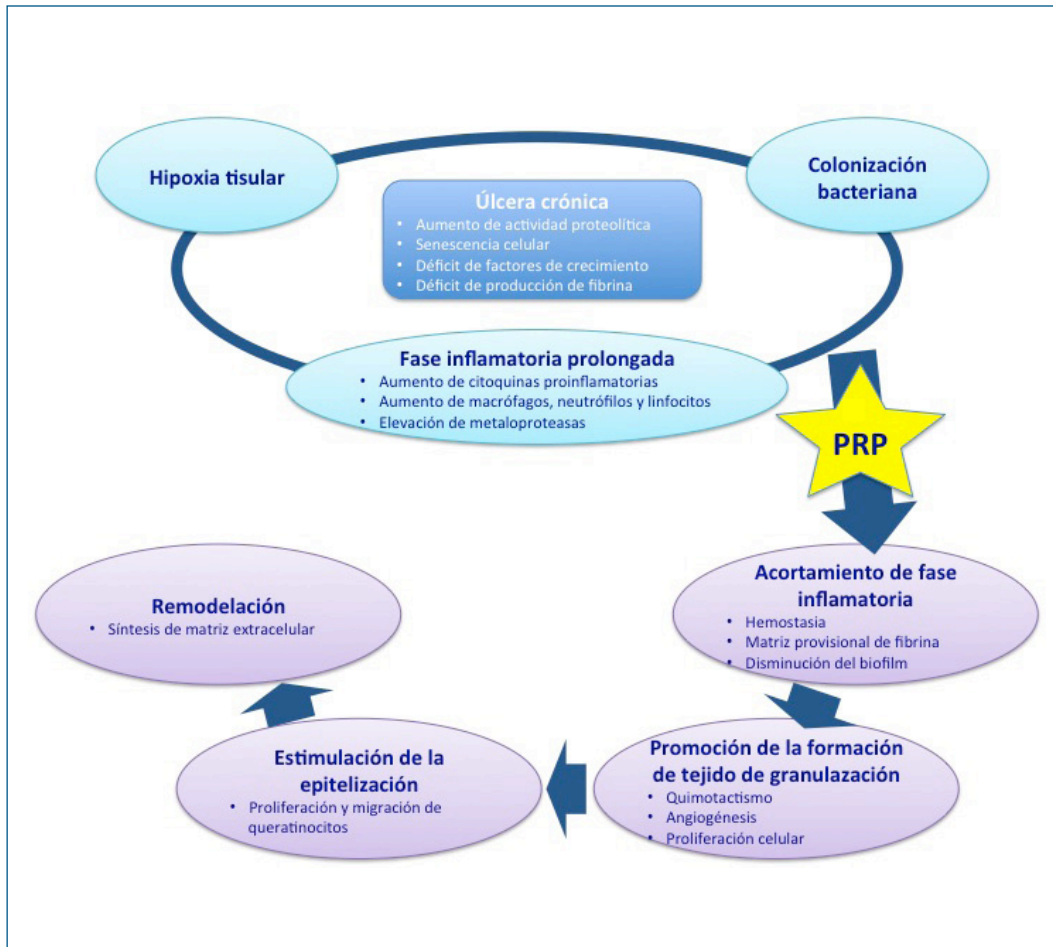


Figura 3.1. Acción del PRP en las diferentes fases de la cicatrización.

El impacto en los costes sanitarios de esta patología está infraestimado. El manejo de las úlceras crónicas está ampliamente considerado como parte de la práctica habitual básica del personal de enfermería y no como un reto terapéutico que precisa un manejo cooperativo entre diferentes especialistas. En muchos casos, el cálculo del coste del manejo de las úlceras crónicas se determina de una manera simplista e inadecuada, basada en el número de apósitos utilizados, en vez de en el total de cuidados dentro de un *continuum*.

Sin embargo, en los últimos años se ha ido desarrollando un interés creciente en la investigación sobre cómo optimizar el manejo de esta patología.

La implantación y desarrollo de programas de prevención y cuidado de úlceras crónicas basados en la evidencia muestra cómo se puede reducir los costes al tiempo que se aumenta la salud y la calidad de vida de los pacientes. Un pilar fundamental de estos programas es la colaboración interprofesional.¹⁹ En la prevención y el primer escalón de tratamiento, el manejo convencional con apósitos, se encontraría la atención primaria. Si no se consigue la evolución adecuada, se pasaría al 2º escalón, con terapias intermedias, o al 3º, de terapias avanzadas. Estos dos últimos niveles precisan atención médica especializada. (Figura 3.2).

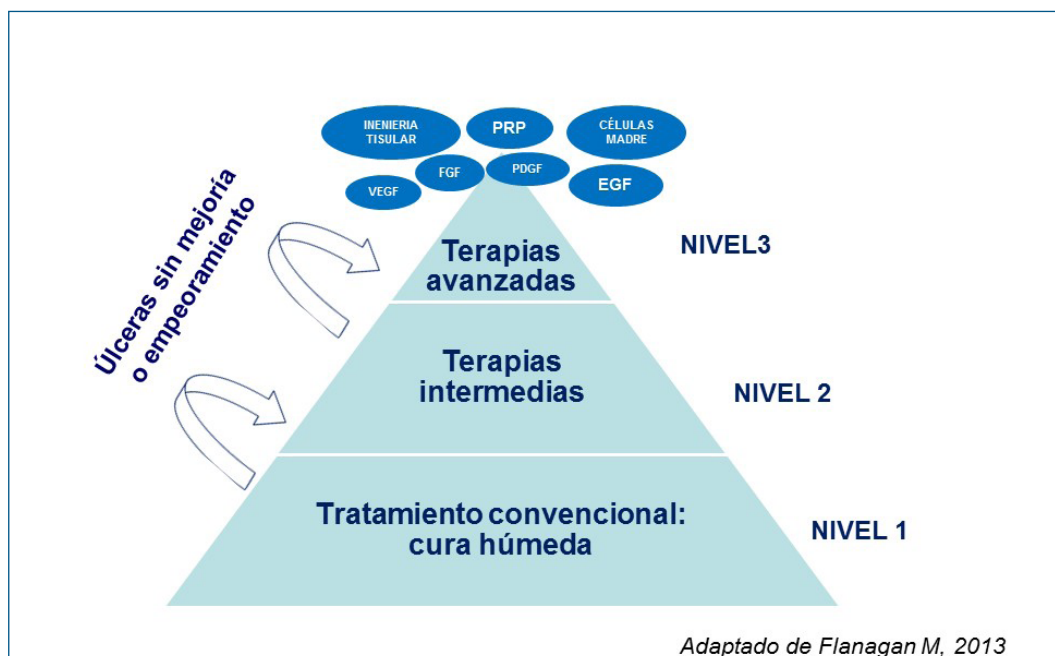


Figura 3.2. Niveles de tratamiento en manejo multidisciplinar de las heridas cutáneas. Adaptado de Flanagan²⁰.

3.1.4. PRINCIPIOS GENERALES DEL TRATAMIENTO DE LAS ÚLCERAS CRÓNICAS

El tratamiento de las úlceras crónicas ha de tener un doble enfoque: la enfermedad de base y el tratamiento local de la herida.

En el caso del pie diabético, es esencial un control estrecho de las glucemias, limpieza y cuidados podológicos y uso de dispositivos de descarga para disminuir la presión.

En pacientes con úlceras crónicas en el contexto de hipertensión venosa, es esencial la realización de un eco-doppler para despistar la existencia de reflujo y valorar las opciones de tratamiento intervencionista. En un metaanálisis reciente, se señala que la compresión es la única medida que ha mostrado un beneficio estadísticamente significativo en la curación de las úlceras venosas crónicas.²¹

A continuación se detallan los principios básicos de curación de toda úlcera crónica.

La European Wound Management Association (EWMA) describió una estrategia dinámica llamada TIME, que resume los 4 puntos clave para estimular el proceso de curación natural.

T (Tissue/ Tejido): control del tejido no viable

I (Infection/ Infección): control de la inflamación

M (Moisture/ Humedad): control del exudado

E (Edge/borde): estimulación de los bordes epiteliales.

El lavado es un primer paso esencial en la cura de toda herida. Aunque hay controversia sobre el método ideal, los expertos coinciden en el uso de

suero fisiológico o agua del grifo y jabón, con la aplicación de antisépticos en situaciones puntuales (antes y después de desbridamiento cortante).

El desbridamiento es necesario en el caso de que existan detritos, esfacelos o restos necróticos que promueven la colonización bacteriana y la respuesta fagocítica que va en detrimento de la cicatrización de la herida. Puede realizarse mediante métodos mecánicos, enzimáticos, químicos, quirúrgicos o incluso bioquirúrgicos mediante el uso de larvas.

El control de exudado es importante ya que, aunque es aconsejable la existencia de un ambiente húmedo en la herida, éste no debe ser excesivo, pues podría producir maceración de los bordes e incluso del propio tejido de granulación. Este excesivo exudado puede, además, ser signo de infección.

Durante las fases de cicatrización y reepitelización es aconsejable mantener un medio húmedo y aséptico, que favorece una reparación más rápida. Es también aconsejable el empleo de apósitos que permitan espaciar las curas para evitar dañar el tejido neoformado y promover el ambiente bioquímico que estimula la cicatrización.¹⁷

En el año 1962, Winter²² demostró que los apósitos que mantienen la cura en ambiente húmedo aceleraban la curación. Desde entonces, se han diseñado y comercializado múltiples apósitos, sin que la evidencia científica haya establecido grandes diferencias entre ellos.

Los apósitos se pueden clasificar en tres grupos: pasivos, activos e interactivos. El apósito pasivo sólo tiene una función protectora, mientras que los otros crean un ambiente adecuado que promueve la cicatrización.

La elección del apósito se basa en las características de la herida, el conocimiento y experiencia del profesional, y las preferencias del paciente.

Los principales grupos de apósitos son los hidrogeles, hidrocoloides, espumas de poliuretano, hidrofibras, alginatos. Los apósitos pueden tener múltiples capas y diferentes componentes. Los apósitos mixtos poseen, además de uno de los componentes anteriores, diferentes sustancias en función de las necesidades del tipo de herida, incluyendo agentes enzimáticos, carbón activado, plata iónica, yodo, antisépticos, antibióticos, colágeno, miel de manuka, antimetaloproteinasas o factores de crecimiento.²³

3.1.5. TERAPIA AVANZADA

Con el objetivo de promover la granulación, incrementar el flujo sanguíneo y la cicatrización en estos pacientes, las terapias alternativas que se han utilizado incluyen el láser, la estimulación eléctrica, la presión negativa y la cámara hiperbárica. Los resultados son en muchos casos esperanzadores. Sin embargo, se precisan ensayos clínicos robustos para determinar la utilidad real de estas modalidades terapéuticas, dado que su uso en la mayoría de los trabajos es en combinación con otros tratamientos.²⁴

Otra modalidad de tratamiento de úlceras que no responden a tratamiento convencional es el uso de injertos de piel.

Los injertos pueden ser autólogos (con piel obtenida de otro sitio del propio paciente), aloinjertos (obtenidos de otra persona), o xenoinjertos (piel de otras especies, como el cerdo). Los autoinjertos son normalmente laminares, obtenidos con dermatomo, o en sello (microinjertos), para lo que se em-

plea cureta o punch. Las células del propio paciente se pueden cultivar para formar una fina capa en el laboratorio (autoinjerto de queratinocitos cultivados).

Se han desarrollado y comercializado diferentes sustitutos biológicos cutáneos, que se consiguen a partir de ingeniería genética y pueden ser epidérmicos, dérmicos o mixtos (con epidermis y dermis).²⁵

Aunque las biopsias de piel son la fuente regular de los queratinocitos y de las células madre epidérmicas, se podrían generar queratinocitos a partir de células madre embrionarias humanas.²⁶

En un metanálisis reciente²⁷ que incluye 17 ensayos, la mayoría con riesgo de sesgo moderado o elevado, se compara la utilidad de los diferentes tipos de injertos cutáneos en úlceras venosas crónicas. Se concluye que los sustitutos cutáneos bicapa son superiores a los apósitos convencionales, mientras que no hay evidencia suficiente para afirmar lo mismo de los otros sustitutos. Las ventajas sobre los injertos tradicionales incluyen que se trata de una técnica no invasiva que no precisa zona dadora. Sin embargo, por el momento, a pesar del ahorro en costes indirectos (consultas y gasto hospitalario), son productos de coste elevado, muchos todavía en fase experimental.

Los mayores avances en los últimos años en bioingeniería tisular cutánea se basan en protocolos de terapia génica y celular y están enfocados a la identificación, aislamiento y caracterización de las células madre epiteliales.

No podemos olvidar que el ambiente bioquímico que promueve la cronicidad de las úlceras cutáneas se caracteriza por una elevada actividad proteasa, que disminuye la concentración efectiva de factores de crecimiento, esencial

en el proceso de cicatrización. El manejo convencional de las úlceras crónicas no proporciona estos factores esenciales en el proceso de cicatrización.²³ La aplicación de factores de crecimiento aislados^{28,29,30} o el uso de plasma rico en plaquetas se presentan como alternativas que proporcionarían estas proteínas indispensables en el lecho de la herida.

El plasma rico en plaquetas (PRP), muy popular en la actualidad por su aplicación en el campo de la estética, predominantemente el envejecimiento facial, está mostrando un papel beneficioso en una gran variedad de situaciones clínicas en Dermatología.³¹ Gracias a su riqueza en factores de crecimiento, y a sus propiedades mitogénicas y quimiotácticas, el PRP se propone como una alternativa eficaz en el manejo de úlceras cutáneas crónicas resistentes a tratamiento convencional.^{18, 32,33,34,35,36}

3.2. PLAQUETAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

3.2.1. LAS PLAQUETAS

Las plaquetas son fracciones citoplasmáticas de los megacariocitos producidos en la médula ósea. La concentración sanguínea varía de 150.00 a 400.000/ μ l. Dado que no poseen núcleo, su vida media es de 7-9 días.

Además de intervenir en los procesos de hemostasia mediante la formación del coágulo, desencadenan el proceso de reparación de las heridas ya que son un reservorio fisiológico de factores que poseen un papel activo en la regeneración de los tejidos. Se han detectado más de 300 moléculas distintas en el concentrado plaquetario. En el citoplasma plaquetario se encuentran gránulos de dos tipos:

1. Gránulos α , que contienen una gran variedad de proteínas, que incluyen factores de la coagulación (factor V, VIII, fibrinógeno), factores angiogénicos (angiogenina, VEGF), antiangiogénicos (angiostatina, PF4), factores de crecimiento (PDGF, bFGF), proteinasas (MMP2, MMP9) y otras citoquinas.
2. El segundo tipo de gránulos se denomina cuerpos densos, que contienen serotonina, Ca^{++} , ADP, ATP, tromboxano A_2 , y otras sustancias que participan en la hemostasia.

No está claro si la secreción de los diferentes componentes de los gránulos plaquetarios es un proceso controlado dependiendo del contexto, en función del microambiente de la herida, o un proceso aleatorio.³⁷

Cuando se produce una herida, las plaquetas se unirán al colágeno expuesto de la pared vascular (adhesión) y a la vez entre sí (agregación) a través de puentes de fibrinógeno. La degranulación (activación) de las plaquetas se puede realizar por varios mecanismos, mecánicos o químicos. Uno de los más fuertes es la adhesión de las plaquetas al colágeno y otros componentes del endotelio, otro sería la presencia de trombina. Al activarse, las plaquetas obtienen una forma esferoidal y espinosa con movimientos de pseudópodos y expulsión de los gránulos anteriormente citados, que liberarán a su vez factores de crecimiento. Este proceso no se producirá si existe ruptura o fragmentación plaquetaria, por lo que las variaciones en la obtención de los preparados plasmáticos ricos en plaquetas modificarán el contenido de factores de crecimiento final.³⁸

3.2.2. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LAS HERIDAS CRÓNICAS

Los factores de crecimiento son un grupo de citoquinas que estimulan la proliferación celular controlando la regeneración y reparación de los diferentes tejidos. Al unirse a su receptor, estimulan una cascada de segundos mensajeros que transmite una determinada señal y provoca una respuesta (migración, proliferación, diferenciación).³⁹ En función de la proximidad entre la célula que produce el factor de crecimiento y la que la recibe, podemos diferenciar las respuestas en: endocrina, cuando las células respondedoras se encuentran a distancia; paracrina, cuando están en la proximidad; autocrina, si se unen a un receptor de la misma célula que los ha liberado; yuxtacrina, cuando el factor de crecimiento se une al receptor de una célula y ésta contacta directamente con otra.⁴⁰

Los factores de crecimiento son producidos por diferentes tipos celulares, como los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos. Por otro lado, se almacenan en reservorios, como son los gránulos alfa plaquetarios.

Los factores de crecimiento que se encuentran en los gránulos alfa de las plaquetas están preformados. Cuando se desencadena la activación plaquetaria, los factores son liberados a través de la membrana y se unen a cadenas carbohidratadas, con su consiguiente activación.⁴¹

De manera general, podemos decir que el papel de los factores de crecimiento en la promoción de la cicatrización de las heridas se debe a su actividad quimiotáctica, mitogénica, angiogénica y productora de matriz extracelular.

Sin embargo, cada factor de crecimiento activa una o varias vías de respuesta, que dependen del entorno celular. Su acción depende de la interacción con su receptor de membrana específico. Los receptores de los factores de crecimiento son unas proteínas de membrana que tienen tres regiones: dominio extracelular, donde se une el factor, transmembrana y otro citoplasmático, unido a una proteína tirosinquinasa específica. Esta última desencadena la activación de una cascada de segundos mensajeros, que hacen que la señal se siga transmitiendo una vez que desaparecen los factores de crecimiento. Cada receptor fosforila un grupo de proteínas distinto provocando distintas acciones en una misma célula.

La respuesta no depende de la cantidad de factores de crecimiento liberados, dado que su acción depende de los receptores de membrana, que están en un número limitado.

3.2.3. CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

a) Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Recibe este nombre porque se aisló por primera vez dentro de los gránulos alfa de las plaquetas, pero también es sintetizado por otras células, como los macrófagos o las células endoteliales.

Es una proteína de 30 Kda de peso molecular formada por dos cadenas de aminoácidos, A y B, que tienen una similitud del 60% en su estructura y que cada una está codificada por un gen diferente. El gen que codifica A está en el cromosoma 7 y el que codifica B en el cromosoma 22. La combinación de estas dos cadenas originan tres formas: PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB, y su contenido es variable según el tipo de célula. Las plaquetas producen ambas formas, A y B.⁴²

Es el primer factor de crecimiento en actuar en el proceso de cicatrización.⁴³ Facilita la angiogénesis por vía indirecta a través de los macrófagos que actúan sobre las células endoteliales, tiene un efecto quimiotáctico y activador sobre las células inflamatorias, una acción mitogénica sobre las mesenquimales y estimula la formación de colágeno tipo I y hueso.⁴⁴

b) Factor de crecimiento transformador (TGF)

Recibe este nombre debido a que se aisló por primera vez en los tejidos transformados (sarcomas).

Tiene 3 isoformas: TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3. Su síntesis se debe a un gen localizado en el cromosoma 19. El TGF-1 se encuentra sobre todo en plaquetas, linfocitos y neutrófilos, mientras que el TGF-2 se encuentra principalmente en hueso, linfocitos, plaquetas y neutrófilos.⁴¹

El TGF-beta1 parece ser el factor de crecimiento más importante en la regeneración. Tiene dos efectos sobre células indiferenciadas. A altas dosis suprime la proliferación y diferenciación osteoblástica, mientras que a bajas concentraciones tiene poder osteogénico. Produce quimiotaxis y mitogénesis de precursores de los osteoblastos y además inhibe la acción de los osteoclastos.³⁴ El TGF-1 es un potente estimulador del depósito de colágeno, inhibiendo su reabsorción y degradación destruyendo las proteinasas,⁴⁴ y un importante regulador de la respuesta inflamatoria.

c) Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Tiene 4 isoformas y es producido por plaquetas, macrófagos, osteoblastos y células musculares lisas, sobre todo en estados de hipoxia.³⁸ Aumenta la neovascularización, favoreciendo la diferenciación, proliferación y emigración de las células endoteliales. La regulación de su acción depende de TGF- beta y PDGF.⁴⁵

d) Factores de crecimiento insulínico (IGF-I y IGF-II)

Son una familia de proteínas con una estructura en cadena simple que poseen una semejanza del 50% con la insulina. Tiene 2 isoformas, la tipo I y II.

El IGF-I es el factor de crecimiento más abundante en la matriz ósea.

Son producidos por diferentes tipos celulares, entre ellos: plaquetas, macrófagos, osteoblastos, células madre mesenquimales. Ambas formas están en el hueso en gran cantidad y en menor proporción están en el sistema vascular transportado por complejos con proteínas específicas de unión. Estimulan la formación de hueso induciendo la proliferación celular, la diferenciación y la biosíntesis de colágeno tipo I.⁴⁶ El IGF-I por sí solo no es capaz de estimular la reparación ósea, normalmente necesita estar combinado con otro factor de crecimiento como PDGF o FGF.³⁹

e) Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El EGF es un péptido compuesto por 53 aminoácidos que presenta en su estructura tridimensional tres puentes disulfuro intramoleculares, esenciales para su unión al receptor tirosinquinasa específico.

Tiene acciones mitogénicas, de migración y de diferenciación, no sólo sobre las células epiteliales, sino también sobre fibroblastos, células renales y células gliales a partir de células mesenquimales.³⁸ También incrementa la actividad de osteoblastos, aunque inhibe la síntesis de la matriz ósea.⁴⁵

f) Factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF)

Puede presentar 9 isoformas. Los primeros en descubrirse fueron el ácido o tipo I y el básico o tipo II.³⁹ Son producidos principalmente por fibroblastos, pero también por macrófagos, osteoblastos, plaquetas, células endote-

liales. La actividad mitogénica de la forma básica es la más potente. Estimulan la proliferación y la diferenciación de osteoblastos e inhiben la de osteoclastos. Además, aumentan la proliferación de fibroblastos y favorecen la angiogénesis por su acción mitogénica y quimiotáctica sobre células endoteliales.³⁸

Desde hace años se está investigando sobre los beneficios del uso de factores de crecimiento heterólogos producidos por biotecnología de manera aislada. A pesar de los buenos resultados señalados en diferentes series de casos, la mayoría de ensayos clínicos diseñados para determinar la utilidad de los diferentes factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras crónicas describen mejoría con respecto a placebo pero no logan detectar diferencias estadísticamente significativas. Destaca la ausencia de estandarización de uso, con gran variabilidad de concentraciones, vehículos y modo de aplicación entre los diferentes productos utilizados. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF-BB (becaplermina), ha sido el único aprobado por la FDA para uso en úlceras, concretamente neuropáticas, y su perfil de seguridad ha sido revisado tras una alerta por potencial oncogénico.²⁸ Otro factor ampliamente utilizado es el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que, al unirse a su receptor tirosinquinasa específico, promueve la quimiotaxis, mitogénesis y diferenciación de las células epiteliales y mesenquimales. Desde hace más de 20 años, se han publicado diferentes estudios sobre el beneficio de uso de EGF tópico para estimular la cicatrización de úlceras cutáneas agudas, como quemaduras y zonas dadoras, y úlceras crónicas.^{29,30}

Los resultados y observaciones publicados no han aportado evidencias científicas que relacionen la aplicación terapéutica de factores de crecimiento recombinantes con la transformación carcinomatosa de tejidos normales o dis-

plásticos. El incremento de Receptor del EGF (EGFR) en células tumorales parece deberse a alteraciones de genes codificadores de los receptores y no como consecuencia de la sobreproducción de factores de crecimiento.

3.3. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

3.3.1. DEFINICIÓN Y FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS

No hay consenso sobre la definición del plasma rico en plaquetas (PRP). Algunos investigadores han sugerido que por PRP se debería entender la fracción con concentración en plaquetas de 3 a 5 veces superior al nivel normal. Sin embargo, la definición más defendida en el momento actual es la que lo caracteriza como un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/ μ L).⁴⁷

En función del sistema utilizado, variarán las concentraciones de plaquetas, leucocitos y factores de crecimiento del preparado. Consecuentemente, la nomenclatura PRP engloba las diferentes fracciones que se pueden obtener en función del método empleado: Preparado Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento (PRPGF), Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (LR-PRP), Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (LP-PRP).⁴⁸

Aunque tradicionalmente han sido consideradas como los agentes responsables de la hemostasia, las plaquetas juegan también un papel muy importante en la reparación y regeneración de diferentes tejidos. Las plaquetas presentes en el tapón que se forma tras el daño tisular, se activan y secretan proteínas y otras moléculas biológicamente activas, que activarán cascadas de segundos mensajeros involucradas en el proceso de curación tisular. Debido a

este mecanismo, la acción de los factores liberados en el lugar de la lesión continúa aunque hayan desaparecido los mismos del medio.

El objetivo de aplicar una concentración de plaquetas superior a la fisiológica en una herida es aumentar la concentración de factores de crecimiento y, por lo tanto, el potencial biorregenerador.^{41,46,47,49,50,51}

Además de las proteínas secretadas por los gránulos alfa de las plaquetas, algunas proteínas plasmáticas también son responsables de la actividad bioestimuladora del PRP. Entre los componentes del PRP destacan el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor plaquetario 4 (PF4), la interleuquina (IL)-1, el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la proteína morfogénica ósea (BMP) y el factor de crecimiento insulina-like (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.^{52,53}

Grupos de biomoléculas	Función	Proteínas incluidas
Proteínas adhesivas	<ul style="list-style-type: none"> – Interacción celular – Hemostasia y coagulación – Composición de la matriz extracelular. 	Factor Von Willebrand, Fibrinógeno Fibronectina Vitronectina Laminina-8
Factores de coagulación y proteínas asociadas	<ul style="list-style-type: none"> – Producción de trombina 	Factor V/Va Factor XI, Multimerina Proteína S Antitrombina III
Factores fibrinolíticos y proteínas asociadas	<ul style="list-style-type: none"> – Producción de plasmina y remodelación vascular 	Plasminógeno Alfa 2 antiplasmina Alfa 2 macroglobulina

Proteasas y anti-proteasas	<ul style="list-style-type: none"> – Angiogénesis – Remodelación vascular – Control de la coagulación 	Inhibidores de metaloproteasas 1-4 (TIMPs 1-4), Metaloproteasas Inhibidor C1 Alfa 1 antitripsina
Factores de crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> – Quimiotaxis – Proliferación y diferenciación celular – Angiogénesis 	PDGF TGF-beta 1 y 2 EGF IGF-1 VEGF FGF BMP
Quimioquinas, citoquinas y otros	<ul style="list-style-type: none"> – Regulación de la angiogénesis – Comunicación intercelular 	Angiopoyetina 1 Proteína básica plaquetaria FasL Endostatinas
Proteínas antimicrobianas	<ul style="list-style-type: none"> – Acción bactericida y fungicida 	Trombocidinas

Tabla 3.1: Clasificación y funciones de las moléculas bioactivas presentes en el PRP.⁴⁶

También se ha demostrado la actividad antibacteriana del PRP, en la que han sido implicadas determinadas proteínas plaquetarias y la acción leucocitaria de aquellos preparados que contengan glóbulos blancos.^{54,55,56} Chen y colaboradores⁵⁷ encontraron, en estudios *in vitro*, efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*. No hallaron clara actividad del PRP contra *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*. Edelblute y colaboradores⁵⁸ midieron la actividad antibacteriana del gel de PRP contra las bacterias *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Se halló una alta acción bactericida contra *A baumannii* y moderada pero significativa contra *S. Aureus* en el modelo *in vitro* e *in vivo*. No se detectó actividad contra *P aeruginosa in vitro*, pero sí una leve *in vivo*.

Se realizó un estudio para evaluar la actividad del plasma rico en plaquetas contra bacterias gram positivas aisladas de la cavidad oral. Los resultados,

evaluando la concentración mínima inhibitoria, sugieren que los componentes plasmáticos y los factores derivados de las plaquetas tienen actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis* y *Staphylococcus aureus*.⁵⁹

Por otro lado, además de esta acción antibacteriana, los preparados que contienen leucocitos presentan niveles mayores de ciertos factores de crecimiento, como TGF- β 1 y PDGF.⁶⁰

En la tabla 5.1 figuran las principales funciones que se han asociado a cada uno de estos componentes del PRP, que en muchos casos se solapan.

No podemos olvidar el papel esencial de las proteínas de adhesión (fibrina, fibronectina, y vitronectina), que contiene el PRP, ya que, para que se produzca una adecuada migración celular y proliferación tisular, se precisa de una matriz extracelular que proporcione soporte estructural.^{41,46,47,48,61,62,63}

Por lo tanto, el PRP tiene efectos no sólo directamente sobre las células diana para los factores de crecimiento, sino también como matriz extracelular para la estimulación de la reparación o regeneración del tejido de un modo global.

La secreción de proteínas plaquetarias comienza en los 10 minutos siguientes a la activación y formación del coágulo. Durante la primera hora, se libera más del 95% de los factores de crecimiento, que quedan embebidos en la matriz de fibrina.

Posteriormente, durante los siguientes 5-10 días, continúa la secreción

proteica. Una vez que las plaquetas mueren, los macrófagos que habrán llegado estimulados por las plaquetas, liberarán a continuación más factores de crecimiento.⁴¹ Estos factores, al unirse a sus receptores, activan cascadas de segundos mensajeros que mantendrán el proceso de regeneración tisular.

Aunque es imposible predeterminar la magnitud del efecto estimulador del proceso de curación de las heridas mediante el empleo de PRP, por la gran variabilidad interindividual y la influencia de factores propios de cada caso y de cada herida en particular, lo que sí está científicamente demostrado es la correlación estadísticamente significativa entre la aplicación del mismo y el acortamiento temporal del proceso.

En un trabajo reciente, Kim y colaboradores⁶⁴ realizan estudios moleculares para determinar la acción del PRP en los procesos de proliferación y migración celular, al ser aplicado tópicamente en úlceras cutáneas agudas y crónicas. Proponen que la aceleración del proceso de cicatrización se deba a la activación de proteínas reguladoras del ciclo celular, como la ciclina A y CDK4.

3.3.2. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

Para la obtención del PRP se siguen los siguientes pasos (Figura 3.3), que varían en función de la técnica empleada.

El método puede ser abierto o cerrado gracias al empleo de kits desechables. En primer lugar, mediante venopunción, se extrae la sangre del paciente en tubos estériles con citrato como anticoagulante. Posteriormente, se procede a la centrifugación de los tubos en una centrifuga convencional. El

tiempo, la velocidad y el número de veces que se centrifuga, dependen del método empleado.⁶⁵ Para evitar la fragmentación de las plaquetas y la consiguiente liberación precoz de las proteínas secretadas, con compromiso de su bioactividad, se recomiendan velocidades de centrifugación bajas.⁶⁶

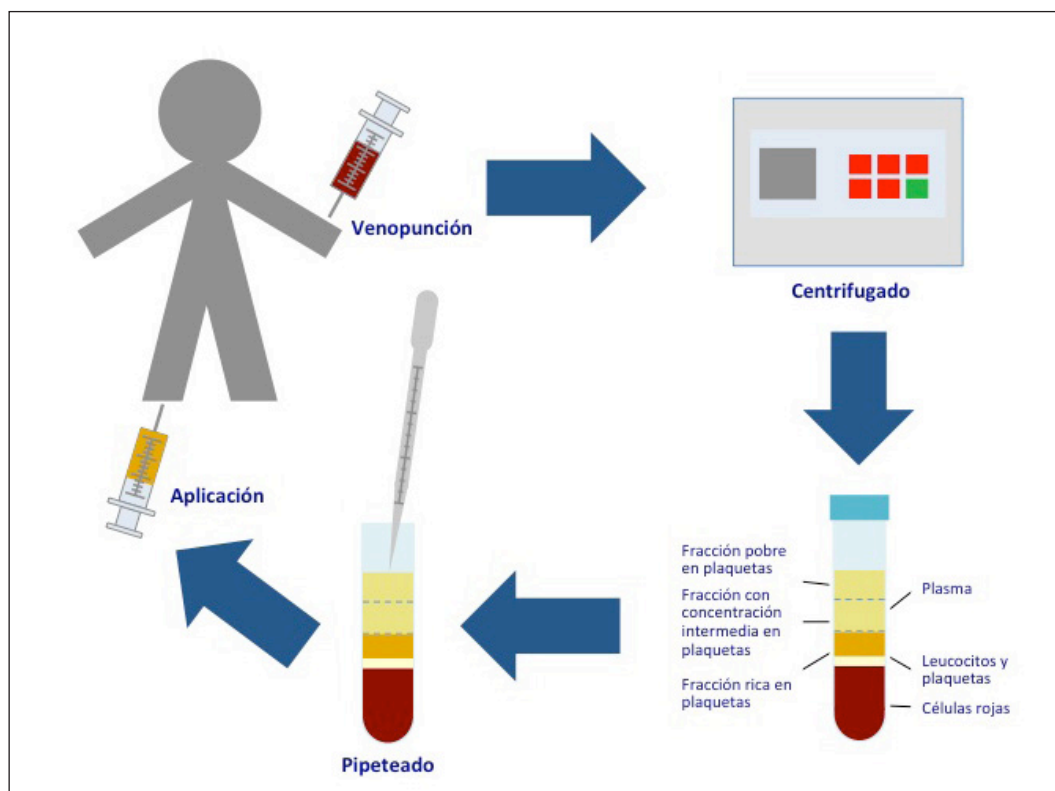


Figura 3.3. Proceso de obtención del PRP.⁶⁵

Cuando se centrifuga la sangre anticoagulada, se forman 3 capas determinadas por el gradiente de densidad: la capa inferior, compuesta por glóbulos rojos; la capa media, compuesta por glóbulos blancos y plaquetas, y la capa superior, compuesta por plasma. La fase plasmática, a su vez, puede subdividirse en 3 fracciones en función de la cantidad de plaquetas presentes, que de superior a inferior son: una fracción pobre en plaquetas, la fracción intermedia con una concentración media de plaquetas, y la fracción rica en plaquetas (Fi-

gura 3.4). Esta división de la fase plasmática no es detectable a simple vista, por lo que se establece como 1/3 superior, inferior y medio del volumen obtenido. Mediante pipeteado se procede a la separación de cada fracción en diferentes tubos estériles (Figura 3.4).

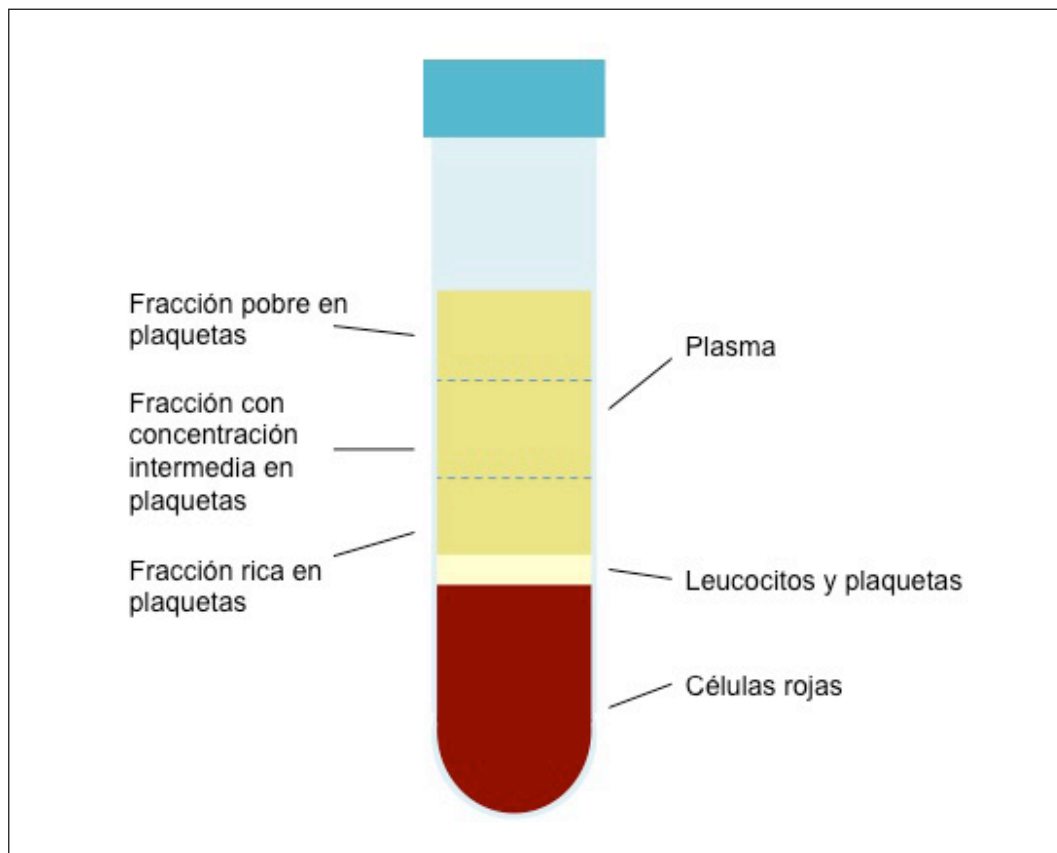


Figura 3.4: Fracciones obtenidas tras el centrifugado.

La calidad del producto obtenido dependerá de la práctica y experiencia del personal que realice el pipeteado. Para conseguir la degranulación plaquetaria y la consiguiente liberación de los factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas, ha de procederse a la activación de la fracción inferior de la fase plasmática. La fase rica en plaquetas se puede activar con diferentes métodos, siendo los más empleados el cloruro cálcico y la trombina.^{54,67} En fun-

ción del modo de aplicación deseado, inyectado o en gel, la mezcla activada se inyectará en los siguientes 10 minutos⁶⁸ o se esperará hasta la consecución de la gelificación, para lo que se precisa normalmente el calentamiento o la adición de polímeros bioactivos.^{5,6}

Para su aplicación en úlceras cutáneas, hay que asegurarse previamente de que la herida está limpia, sin restos de tejido necrótico ni signos de infección.

Para conseguir beneficios de la cura en ambiente húmedo, se pueden añadir gasas vaselinadas o apósitos bioactivos, en función de las características de la herida.

La frecuencia de aplicación es variable, siendo lo más frecuente su uso semanal o quincenal.⁶⁹

Se han realizado diferentes ensayos *in vitro* para establecer el contenido celular y molecular de los diferentes sistemas comerciales. Entre los resultados obtenidos destaca la importante variabilidad interindividual y la ausencia de proporcionalidad entre la concentración de plaquetas y la cantidad de factores de crecimiento obtenida con los diferentes métodos.^{1,3,4} La repercusión clínica de las diferencias encontradas todavía no se ha determinado.⁷⁰

3.3.3. GELIFICACIÓN

La formación del gel de PRP se produce por la acción de enzimas procoagulantes. La calidad de la matriz en la que quedan embebidas las plaquetas depende de la concentración de fibrinógeno disponible en el PRP, que tiene

gran variabilidad interindividual. Se comporta como la matriz extracelular fisiológica, con una absorción y posterior liberación de las moléculas bioactivas. Por lo tanto, la estructura de esta malla condicionará la liberación de los factores de crecimiento al lecho de la herida.

Además de depender de la concentración de fibrinógeno del preparado, esta cinética de liberación depende del método utilizado para producir el gel. Los activadores más empleados en los métodos comercializados son el cloruro cálcico, la trombina y la batroxobina. Por otro lado, no podemos olvidar que la manipulación de las plaquetas durante todo el proceso de obtención del PRP también es una variable importante que influye en la eficacia del gel como fuente de factores de crecimiento. Mazzuco y colaboradores² comparan la cinética de liberación de factores de crecimiento en geles de PRP obtenidos por diferentes métodos y sugieren que la variabilidad intermétodo de la liberación de proteínas bioactivas a lo largo del tiempo puede ser debida a los diferentes pro-coagulantes utilizados. La estructura inicial de la fibrina difiere en función de la enzima utilizada (trombina o batroxobina) y la liberación de factores depende del empleo de calcio, ya que hay factores de crecimiento cuya liberación activa es calcio-dependiente, como PDGF-BB y EGF.

El problema de la gelificación en la práctica clínica es que implica tiempo, aunque el proceso se puede acelerar con medidas físicas como la agitación o el calentamiento.

Se han propuesto y empleado diferentes vehículos⁷¹ y polímeros, tanto naturales como sintéticos para lograr la gelificación y liberación mantenida de factores de crecimiento para promover una activación continuada de los recep-

tores celulares del tejido a tratar.⁷² Sin embargo, destaca la ausencia de ensayos clínicos para comparar los beneficios de la adición de los diferentes polímeros propuestos. Otro de los inconvenientes que dificulta la expansión de su uso es el coste que implica su obtención.

Los hidrogeles poliméricos celulósicos representarían buenas opciones como matriz, por ser bioestables e inertes.⁷³ Tras probar *in vitro* diferentes compuestos y concentraciones, nuestro equipo de investigación ha observado que, el empleo de hidroxietilcelulosa en una concentración del 5% en peso, en combinación con un conservante y un humectante, mezclado con el PRP en relación 1:1, posibilita la obtención inmediata de un producto consistencia gel que puede ser aplicado al momento sobre la herida.

3.3.4. SEGURIDAD DE LA APLICACIÓN

Dada su naturaleza autóloga, el PRP es un producto seguro, que carece por definición del riesgo potencial de transmisión de enfermedades implícito en el uso de material sanguíneo de donantes. Los sistemas que emplean trombina bovina como activador están desapareciendo para evitar el desarrollo de coagulopatías o hipersensibilidad secundarias.

Con respecto al potencial oncogénico del PRP que han sugerido algunos autores, no hay evidencia disponible que lo apoye. Los factores de crecimiento, tras su unión a receptores de membrana, activan cascadas de señalización intracelular que promueven una expresión génica normal, regulada por diferentes mecanismos de control.³⁸ Además, hasta el momento

actual, no se ha demostrado un efecto sistémico de los factores de crecimiento liberados tras la aplicación local de PRP.

En relación a las condiciones de obtención, la AEMPS ha establecido unas garantías mínimas de calidad que han de ser cumplidas por los facultativos prescriptores. Se considera de obligado cumplimiento el control de la esterilidad, la trazabilidad del producto y el seguimiento de los pacientes. En el caso de los métodos de obtención de PRP de forma manual con "técnica abierta", se deberá solicitar una inspección a la autoridad competente para que valore la adecuación de las instalaciones y de la calidad de la producción. En el caso de emplear una "técnica cerrada", el método empleado deberá seguir las instrucciones descritas en cada sistema comercial, no siendo necesaria la solicitud de permiso anterior. El kit empleado deberá disponer de marcado CE otorgado para dicho uso.⁷

3.3.5. USO CLÍNICO EN MEDICINA

La aplicación del plasma rico en plaquetas ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, con uso descrito en una amplia variedad de patologías y situaciones clínicas.

Desde una perspectiva histórica, en los años 80 comenzó la aplicación del PRP en medicina regenerativa, al descubrirse la liberación de moléculas bioactivas con acción en tejidos dañados como las úlceras cutáneas.⁷¹

El precursor más remoto lo encontramos en el gel adhesivo a partir de fibrina autóloga que, al aplicarse sobre las heridas, estimulaba la forma-

ción de tejido conectivo y aumentaba la vascularización. Posteriormente se descubrió que este preparado se caracterizaba por altas concentraciones de factores de crecimiento, y se asoció a estas proteínas el potencial regenerativo del gel. El precursor directo del preparado que conocemos actualmente como PRP es el producto conocido como PDWHF (platelet-derived wound healing factors). Se cubrían las heridas con colágeno embebido en proteínas plaquetarias. Con este gel se estimulaba la formación de tejido conectivo vascularizado en estas heridas.^{74,75} A partir de entonces, se han probado diferentes preparados plaquetarios, de aplicación en solución, gel o inyectado.

A finales de los 90, se comenzó a utilizar en cirugía maxilofacial aprovechando el potencial de adherencia y hemostasia de la fibrina.³⁴ La observación clínica permitió el descubrimiento de la función estimuladora de la proliferación celular y anti-inflamatoria del PRP.¹⁷

La popularización del PRP a finales de los 90 se debe a la descripción, por parte de Anitua y colaboradores¹, de un método ambulatorio que no necesitaba de las complicadas instalaciones que se requerían hasta el momento, y que por tanto limitaban su uso al campo hospitalario. Tras validar su técnica, la ha comercializado y cada tratamiento representa un coste significativo. A partir de esta primera descripción del método ambulatorio, se han desarrollado diversas técnicas y sus aplicaciones se han multiplicado. Presentamos un eje temporal que recoge el surgimiento del empleo del PRP en diferentes especialidades médicas (Figura 3.5). Existen múltiples sistemas de obtención de PRP comercializados en el momento actual.

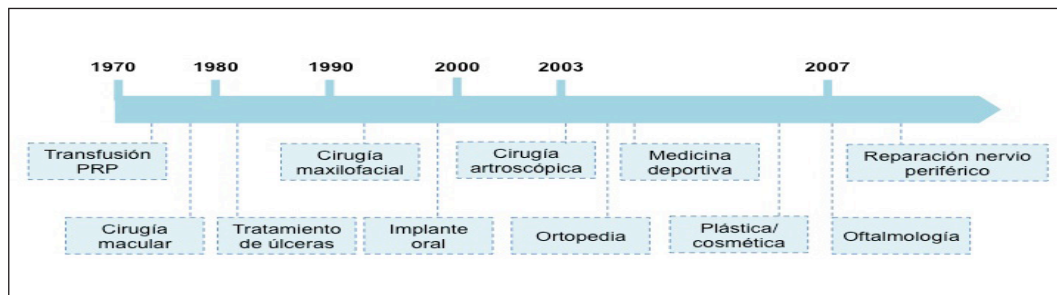


Figura 3.5: Eje temporal con las diferentes aplicaciones del PRP en campos diversos de la medicina.⁷⁶

Esta extensión en su empleo contrasta con la escasez de evidencia científica que avale las diferentes aplicaciones sugeridas. En la mayoría de estudios que se encuentran en la literatura, se muestran los beneficios, en muchos casos espectaculares, de la aplicación de PRP. Sin embargo, existen pocos ensayos clínicos de calidad que permitan establecer la magnitud de sus efectos. Además, ante la variabilidad metodológica existente hay poco consenso, lo que explica la ausencia de estandarización del empleo del PRP y, por tanto, la dificultad para generar evidencia científica fácilmente reproducible. En este contexto, la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios emitió un informe el día 23 de mayo de 2013⁷, con el objetivo de establecer el marco de uso del PRP en España, las obligaciones de sus fabricantes y la información que deben recibir los pacientes a quienes se les aplique. En este documento se reconoce el PRP como medicamento de uso humano

3.3.6. UTILIDAD EN ÚLCERAS CUTÁNEAS CRÓNICAS

El PRP se ha empleado en úlceras cutáneas crónicas de diversas etiologías. La mayoría de trabajos publicados son casos puntuales o series pequeñas,^{69,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86} pero también podemos encontrar estudios observa-

cionales robustos con elevado tamaño muestral,^{87,88,89} multicéntricos,⁹⁰ estudios piloto⁹¹ y ensayos clínicos. La evaluación del potencial beneficio real del PRP en úlceras cutáneas a partir de la evidencia disponible en la actualidad es complicada. En la literatura encontramos publicados casos aislados y pequeñas series de casos con excelentes resultados, con un tiempo medio de curación de menos de 12 semanas. Sin embargo, entre estos trabajos existe una gran variabilidad del tamaño y etiología de las lesiones, al igual que de la metodología de obtención y aplicación del PRP. Hay que destacar que la respuesta que describen los autores que emplean métodos de obtención manuales es equiparable a los resultados obtenidos con métodos comercializados y, consecuentemente, más costosos. Burón y colaboradores⁶⁹ presentan una serie de 5 pacientes con 12 úlceras tratadas con PRP obtenido con técnica abierta manual, aplicado de manera combinada en gel e inyectado, en las que obtienen la curación en un rango de 4 a 12 semanas. En un estudio prospectivo, Frykberg y colaboradores.⁸⁰ obtuvieron buena respuesta en 63 de un total de 65 úlceras de diferentes etiologías tratadas con gel de PRP, con disminución de volumen y área del 56,1+/-35,2 y del 43,1+/-32,4%, respectivamente, con una media de 2,8 semanas de tratamiento y 3,2 sesiones.

En la mayoría de los casos, el PRP se aplica en gel, pero existen casos de aplicación combinada o exclusivamente inyectado.^{68,92,93}

Los ensayos clínicos realizados, en mayor o menor medida, adolecen de los mismos inconvenientes anteriormente descritos, lo que imposibilita extraer conclusiones robustas de los meta-análisis realizados.^{74,94,95,96,97,98,99,100}

Destaca el pequeño número de pacientes y la heterogeneidad de etio-

logías incluidas. Entre los ensayos con resultados que favorecen al grupo de PRP, se encuentra el realizado por Anitua y colaboradores¹⁰⁰, en el que incluyeron 14 úlceras. La distribución de la etiología de las lesiones era la siguiente: úlceras venosas (64%), úlceras por presión (29%) y otras (7%). La asignación del tratamiento tópico, con PRP o el tratamiento convencional (limpieza, desbridamiento y gasas bañadas en suero salino) fue aleatoria. La variable resultado fue la superficie cicatrizada que, a las 8 semanas, fue significativamente superior en los pacientes tratados con PRP (72,94 +/- 22,25%) a la del grupo control (21,48 +/-33,56%) ($P < 0,05$).

Con respecto al manejo de úlceras de pie diabético, Driver y colaboradores⁹⁸ diseñaron un ensayo clínico multicéntrico en el que incluyeron 72 lesiones. El resultado del estudio también favoreció al grupo tratado con gel de PRP, con la curación del 81,3% de las úlceras en comparación con el 42,1% en el grupo control, $P = 0,036$.

Sin embargo, un metaanálisis reciente⁷ que incluye estos y otros ensayos clínicos, un total de 9 con 325 pacientes, concluye que no hay diferencias en la cicatrización entre el grupo tratado con PRP y el grupo control. Si desglosamos esta revisión sistemática, cuatro de los ensayos incluyen úlceras de etiología mixta^{74,94,97,100}, tres recogen úlceras venosas^{95,96,101} y los 2 restantes, úlceras en pie diabético.^{96,99} La duración media de tratamiento fue de 12 semanas (rango 8-40 semanas). Como importantes puntos débiles de esta revisión, hay que señalar que sólo uno de los estudios presentaba bajo riesgo de sesgo⁹⁴ y las variables resultado recogidas en cada estudio eran diferentes. Se contempla la proporción de úlceras completamente curadas en 7 trabajos, el área reepitelizada total en 3 de ellos, el porcentaje de área de la herida curada en dos,

y las complicaciones de la herida en tres de ellos. Únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas, a favor del grupo experimental, en el porcentaje de área de la úlcera curada. Consecuentemente, la conclusión de los autores es que se precisan ensayos clínicos robustos, bien diseñados, que permitan determinar la utilidad real del PRP en la regeneración de úlceras crónicas cutáneas, ya que estos resultados contrastan con la buena respuesta clínica recogida en múltiples trabajos. Este hallazgo puede deberse a la dificultad que entraña la realización un metaanálisis con estudios que aún utilizando el mismo producto, éste ha sido obtenido de manera diferente, se ha aplicado en pacientes que no comparten criterios de inclusión y no existe uniformidad de las variables resultado medidas. Hay que tener en cuenta que la variabilidad inherente al proceso y de obtención y aplicación del PRP puede dificultar el diseño y la ejecución de estudios clínicos viables. Además de no conocerse la concentración ideal de plaquetas, leucocitos y factores de crecimiento, así como la potencial influencia del ejercicio o los fármacos previos a la extracción sanguínea, no está claro el papel del microambiente y el estímulo mecánico coexistente en las lesiones como factores que, por sí solos, pueden influenciar la diferenciación celular o la reparación tisular (sinérgicamente o de forma antagonista).

Además de su beneficio como terapia única, se han descrito buenos resultados con el uso del PRP como adyuvante en la viabilidad de los injertos para el tratamiento de úlceras recalcitrantes.^{102,103,104} Una serie publicada recientemente, con 9 úlceras en extremidades inferiores de diferentes etiologías, recalcitrantes y extensas (tamaño medio de 50 cm²), muestra buenos resultados.¹⁰⁴ Se aplicaba PRP activado con trombina sobre las úlceras adecuadamente desbridadas y se cubría con injerto de piel, con múltiples ranuras. La curación

total se consiguió en 8 casos, en un periodo de 2-3 semanas, sin recurrencias durante el seguimiento. Este grupo ya había obtenido buenos resultados en un trabajo previo con 17 úlceras, en las que el gel de PRP, en este caso alogénico, facilitó el prendimiento de los injertos.¹⁰²

Los estudios realizados para analizar el impacto de esta modalidad de tratamiento, en comparación con las curas convencionales, muestran una mejora en la calidad de vida de los pacientes y reducción del gasto sanitario, resultados muy esperanzadores.¹⁰⁵

3.3.7. OTROS USOS EN DERMATOLOGÍA

PRP y envejecimiento cutáneo.

El envejecimiento cutáneo engloba la disminución de la vascularización, un recambio celular y de la matriz intercelular reducido, disfuncionalidad anexial, atrofia grasa y pérdida de tono muscular. Estudios *in vitro* han demostrado la acción bio-regeneradora del PRP mediante la estimulación de la proliferación de los fibroblastos, con un aumento de factores angiogénicos (VEGF) y proteínas relacionadas con la remodelación de la matriz extracelular como el procolágeno-I, el ácido hialurónico o el TIMP-1 (inhibidor de metaloproteinasa 1).^{106,107,108} La principal función del procolágeno-I es aumentar la resistencia dérmica ante las fuerzas de tensión y estiramiento. El ácido hialurónico se encuentra en el líquido intersticial que rodea a estas fibras colágenas, con actividad lubricante. Además, debido a su gran capacidad de retención de agua, se le atribuyen las propiedades de hidratación y firmeza cutánea. El TIMP-1, al inhibir la acción de las metaloproteinasas, estabiliza la matriz extracelular.

La aplicación se realiza tópica a modo de mascarilla o mediante inyecciones intradérmicas. Los estudios que evalúan el beneficio clínico del PRP en el envejecimiento cutáneo son escasos, y las variables medidas son mayoritariamente subjetivas, como el grado de satisfacción del paciente y del médico mediante comparación fotográfica.¹⁰⁹ En un estudio clínico randomizado con 100 pacientes con signos evidentes de envejecimiento cutáneo, se evaluó la eficacia y seguridad del PRP comparándolo con ácido hialurónico, tras tres sesiones de tratamiento. En dos visitas de seguimiento, a los 3 y a los 6 meses, se valoró la hidratación y el pH de la piel, la evolución de la profundidad de las arrugas, así como la satisfacción de los pacientes. La mejoría de todas las variables en el grupo de PRP fue estadísticamente significativa.¹¹⁰ Algunos trabajos sugieren también un papel beneficioso del PRP como adyuvante de otras técnicas de rejuvenecimiento. Se está extendiendo su uso tras las exfoliaciones químicas o físicas o tras el «láser resurfacing». Un estudio ha mostrado reducir el eritema y acelerar la curación de pacientes tratados con láser ablativo fraccionado de CO₂.¹¹¹

Basándose en los beneficios descritos del PRP en la mejoría de los signos del envejecimiento, se han comercializado diferentes preparados de aplicación tópica, que poseen en su composición factores de crecimiento y proteínas solubles de matriz secretadas por fibroblastos dérmicos humanos.

Otra aplicación del PRP es la lipoescultura, empleada para optimizar los injertos de grasa libre que van a ser posteriormente infiltrados. En estudios *in vitro* se ha objetivado aumento significativo del número de células adipocitarias. A nivel clínico, se describe un mantenimiento prolongado del contorno restaurado en comparación con las infiltraciones grasas de manera aislada.^{112,113}

PRP y alopecia.

El complejo ciclo del folículo piloso es el responsable de la regulación del crecimiento del pelo. Los folículos pilosos pasan de anagen (fase activa) a catagen (involución por apoptosis) y posteriormente entran en telogen (fase de reposo). Muchos factores de crecimiento participan en la regulación del ciclo del folículo, controlando la fase activa y promoviendo la inducción de catagen o telogen.¹¹⁴

Se ha demostrado recientemente el papel del PRP en la promoción de la supervivencia y crecimiento del pelo, tanto *in vitro* como *in vivo*. Uebel y colaboradores¹¹⁵ muestran cómo se puede estimular el crecimiento y aumentar la densidad de pelo si, previamente a la realización del trasplante, se embeben las unidades foliculares en PRP. A pesar de que el mecanismo de acción específico del PRP sobre el folículo piloso es todavía desconocido, Li y colaboradores¹¹⁶ han encontrado un incremento secreción de FGF-7 y beta catenina, con la consiguiente proliferación de las células de la papila folicular y activación de vías de señalización extracelular dependientes de quinasas y Akt. En este trabajo, la inyección de PRP en los ratones promovía una aceleración en la transición de telogen a anagen en comparación con el grupo control. Kang y colaboradores¹¹⁷ sugieren en un estudio preliminar los potenciales beneficios de la inyección interfolicular de un preparado de PRP con células CD34+, por su acción angiogénica, en el tratamiento de la alopecia de patrón femenino y masculino.

Por otro lado, se ha realizado un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, en el que se evalúa el beneficio de la aplicación de PRP en 45 pacientes con alopecia areata. Al compararlo con placebo o acetónido de tria-

mcinolona, se ha encontrado un aumento significativo en el repoblamiento, una disminución de la distrofia del pelo y menor prurito o escozor. Además de su acción estimuladora de la proliferación celular, registrándose incremento de Ki-67 en las áreas tratadas, la conocida acción antiinflamatoria del PRP podría ayudar a explicar los buenos resultados obtenidos en la alopecia areata.¹¹⁸

PRP y otras aplicaciones.

Dada su demostrada actividad en la promoción de la regeneración tisular, las aplicaciones para las que se sugiere el uso de PRP son muy variadas.

La actividad como adhesivo biológico es el fundamento del empleo del PRP para aumentar la viabilidad de colgajos cutáneos en el lecho receptor. Se emplea en cirugía plástica y dermatológica en los procesos que impliquen el empleo de colgajos para: acelerar de la curación, mejorar el sellado eliminando espacios muertos, disminuir el sangrado y la necesidad de drenajes y vendajes compresivos, reducir el edema y dolor postoperatorio.¹¹⁹

Lee y colaboradores¹²⁰ evidenciaron mayor rapidez en la resolución del edema y eritema con la aplicación de PRP tras laser ablativo CO₂ para el tratamiento de las cicatrices de acné en 14 pacientes. Estos autores afirman un efecto sinérgico del PRP, con mejoría clínica de la apariencia de las cicatrices.

Nicoli y colaboradores¹²¹ han descrito un caso de hidradenitis supurativa resistente a múltiples tratamientos, con buena respuesta a la combinación de cirugía, PRP y Hyalomatrix, un sistema liberador de ácido hialurónico.

En una pequeña serie de casos, Iervolino y colaboradores¹²² describen el efecto beneficioso del gel de PRP sobre lesiones de radiodermatitis crónica.



IV. Material y Método



4.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.1.1. MATERIAL

4.1.1.1. Recursos humanos

- 50 voluntarios sanos reclutados en consultas externas de Dermatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM).
- Enfermero entrenado en el procesamiento de las muestras.
- Farmacéutico interno residente en bioquímica.
- Personal técnico del Centro Nacional de microscopía electrónica.
- Personal técnico del Servicio de Hematología y de la Unidad de Producción Celular del HGUGM.

4.1.1.2. Material fungible

- Gasas estériles.
- Agujas y jeringuillas estériles.
- Recipientes de cultivo estériles.
- Guantes estériles.
- Mascarilla con pantalla protectora.
- Ampollas de Cloruro Cálcico 10%.
- Material de venopunción.
- Tubos citratados y con EDTA.
- Gel de hidroxietilcelulosa.
- Material para la inclusión en resina.
- Glutaraldehído al 2,5%.

- Solución fosfato (Millunig).
- Tetraóxido de osmio y ferrocianuro.
- Acetona.
- Resina.
- Suero fisiológico (NaCl 0,9%).
- Kits para medición de factores de crecimiento mediante ELISA.

4.1.1.3. Material físico y aparatos

- Servicio de Bioquímica HGUGM:
 - Aparataje para medición.
 - Congelador para mantener a -80° las muestras de sobrenadante, obtenidas tras ultracentrifugado, hasta su análisis.
 - Estufa.
- Servicio de Hematología HGUGM:
 - Aparataje para recuento de plaquetas.
- Unidad de Producción Celular de la Fundación para la Investigación Biomédica del HGUGM:
 - Centrífuga de laboratorio convencional
 - Cámara de flujo laminar
- Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Universidad Complutense de Madrid:
 - Microscopio electrónico y material necesario para el procesamiento de las muestras.



Figura 4.1: Microscopio electrónico JEOL JEM 1010, Centro Nacional de Microscopia Electrónica.

4.1.2. METODOLOGÍA

4.1.2.1. Selección de pacientes

50 voluntarios sanos. Las muestras de 43 se emplearon para el estudio cuantitativo y 7 para el cualitativo. Calculando a partir de las medias, con una

primera estimación de la desviación estándar para poder ajustar la muestra en función de la precisión de los resultados obtenidos y del nivel de análisis esperado, con un tamaño muestral inferior se obtendría significación estadística (menos de 20 pacientes). Hemos decidido este mayor tamaño muestral basándonos en estudios previos¹²³ y teniendo en cuenta las posibles pérdidas por errores de manipulación o medida.

Se trata de pacientes que van a precisar venopunción para realización de analítica sanguínea por motivos médicos ajenos al presente estudio (control analítico preoperatorio o previo al inicio de terapias específicas, control analítico rutinario).

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Para poder ser incluidos en el estudio, los voluntarios deben otorgar su consentimiento escrito para el estudio, tras haber leído y comprendido la información facilitada en la hoja de información al paciente.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Menores de 18 años.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con anemia.
- Pacientes con coagulopatías.
- Pacientes inmunodeprimidos

4.1.2.2. Estudio cuantitativo

4.1.2.2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y CENTRIFUGACIÓN

— Extraemos sangre, mediante venopunción, de 43 voluntarios que permiten que se les extraigan 7 tubos extra de 3,5 ml cada uno (tubos citratados). Todas las muestras son extraídas y manipuladas por un único enfermero entrenado en el procedimiento.

— Se separan 0,1 ml de la sangre total para la medición de la concentración de plaquetas basales..

— Los tubos se centrifugan a 160 g durante 6 minutos.¹ Se descartan los tubos con plasma de apariencia turbia tras la centrifugación.

— El plasma obtenido se separa en fracciones mediante pipeteado: el tercio superior se denomina plasma pobre en factores de crecimiento y ocupa alrededor de 0,5 cc. En el tercio inmediatamente inferior, se encuentra el plasma con una concentración media y ocupa aproximadamente 0,5 cc. El tercio inmediatamente por encima del concentrado de hematíes es la fracción rica en factores de crecimiento.

— El total de cada fracción se junta en un tubo de ensayo diferente.

— La fracción pobre la deseamos y juntamos la fracción media y rica para las posteriores mediciones.

— Se separan 0,1 ml de PRP para la medición de plaquetas y otras células hemáticas (glóbulos rojos y leucocitos) en el concentrado.

4.1.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL GEL

– Activamos el plasma medio y el rico. Para ello aspiramos con aguja estéril y se mezcla en una jeringuilla con CaCl₂ 10% (0,1 mL CaCl₂ /1,0 mL de PRP).

– Acto seguido, se agita la mezcla y la mitad del producto obtenido se mezcla con el gel hidroxietilcelulosa 5% (1:1). La otra mitad no se mezcla con el gel.

– Pasados 20 minutos, se procede a la centrifugación de los preparados sin gel en la ultracentrífuga dependiente de la Unidad de Producción Celular a 1250 g durante 15 minutos², y se congelan las muestras gelificadas para su posterior procesamiento (ver apartado “Procedimiento para la medición de factores de crecimiento”). Los sobrenadantes obtenidos se mantienen a -80° hasta su medición con las muestras de otros pacientes (aproximadamente 30 mediciones por kit de medición de cada factor de crecimiento mediante ELISA). El almacenamiento de las muestras en frío se realiza en el Servicio de Bioquímica del HGUGM. Los geles que no hayan sido utilizados se emplean para realizar el estudio de cinética longitudinal comparando la biodisponibilidad de factores de crecimiento en ambos preparados.

– Incubamos los geles restantes de ambos tipos (con y sin hidroxietilcelulosa) en una estufa a 37°. La mitad de ellos se ultracentrifugan a los 60 minutos y se extrae el sobrendante (en caso de no llevar hidroxietilcelulosa) o se guardan sin manipular para su posterior procesamiento (ver apartado previo), y se mantienen a -80°C hasta medición. Los restantes se mantienen en la estufa durante 24

horas, momento en que se centrifugan y se obtiene el sobrenadante o, en caso de los geles con HEC, se almacenan directamente hasta su medición.

Por cada voluntario se realizan las siguientes determinaciones:

- Recuento de plaquetas basales.
- Recuento de plaquetas tras centrifugado.
- Cinética del gel de PRP con y sin hidroxietilcelulosa
 - Recuento de factores de crecimiento a los 20 minutos tras centrifugación.
 - Recuento de factores de crecimiento en el gel a la hora.
 - Recuento de factores de crecimiento en el gel a las 24 horas.

4.1.2.2.3. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDICIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Para la determinación de las concentraciones de factores de crecimiento de origen plaquetar (FGF-b, VEGF, TGF- β 1, PDGF-BB) e IGF-1, se utilizaron Kits específicos de ELISA, RyD Systems.

Las muestras de plasma fueron procesadas según se indica en las instrucciones de manipulación de la casa comercial, sin requerir de la dilución previa de las muestras, salvo en los casos en los que así se recomendaba.

Los resultados de concentración de los distintos factores de crecimiento en estas muestras de plasma fueron obtenidos de la extrapolación de las uni-

dades de Densidad Óptica (D.O), en la curva de calibración obtenida a partir de la medición de las muestras estándar incluidas en el kit comercial. Dicha curva se obtiene a partir de la dilución seriada de la reconstitución de un material de referencia liofilizado.

Las muestras de plasma gelificado fueron debidamente procesadas para permitir su pipeteo ya que, dichas muestras, presentaban estado semisólido, lo que imposibilitaba la medición directa. Para obtener muestras "pipeteables" fue necesario realizar a cada una de ellas dilución con suero fisiológico (NaCl 0.9%). El factor de dilución aplicado fue 1/5, obteniendo muestras líquidas con una concentración en gel de HEC de 0.5%.

Tras la dilución de las muestras, fueron vortexadas y posteriormente centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos, para eliminar del sobrenadante los pequeños coágulos de fibrina formados tras la inducción de la cascada de la coagulación en fases previas.

Los valores de concentración de los distintos factores en las muestras de gel se obtuvieron de la extrapolación de las D.O medidas sobre la curva estándar de cada ensayo.

Para realizar la curva de calibración en la determinación de las concentraciones de factores en las muestras con HEC, la curva de calibración fue modificada debidamente, incluyendo en su matriz una concentración de HEC del 0.5%. Durante el ensayo se midieron muestras con analito 0 y concentración de HEC de 0.5% (blancos), observando que la presencia del polímero no afecta a la medición de los factores en las muestras ensayadas.

Los resultados de los dos grupos de muestras fueron presentados una vez se les aplicó los factores de dilución pertinentes en cada caso.

Cabe resaltar que los resultados de las muestras de plasma gelificado han de analizarse teniendo en cuenta que ese plasma se gelificó mediante la adición a partes iguales del gel previamente preparado. Así mismo, es importante destacar, que la dilución de estas muestras gelificadas fue realizada utilizando jeringas de 1 ml con émbolo, por lo que esa dilución es aproximada, ya que no se trata de material volumétrico exacto. No obstante, todas las muestras fueron procesadas por el mismo manipulador, con el mismo tipo de jeringas y por tanto, los resultados son comparables entre sí teniendo en cuenta el objetivo principal del estudio: la demostración de la presencia en el gel de factores liberados desde las plaquetas.

4.1.2.3. Estudio cualitativo mediante microscopía electrónica

Para determinar la preservación de la morfología plaquetaria, se recogieron muestras de 7 voluntarios sanos para prepararlas para su visualización al microscopio electrónico. A cada voluntario se le extrajeron 14 ml de sangre en tubos citratados de 3,5 ml. Las muestras obtenidas de cada individuo fueron de tres tipos:

- Sangre total, sin procesar.
- Fracción de PRP obtenido tras centrifugación por el procedimiento descrito.
- PRP gelificado mediante el procedimiento descrito.

También se procesó una muestra únicamente con gel, para conocer su estructura y poder valorar posibles interferencias en el resto de muestras.



Figura 4.2: Rejillero con las muestras preparadas para su visualización mediante microscopía electrónica

Todas las muestras se prepararon del siguiente modo:

Rotulamos los eppendorf y los colocamos en una gradilla. Preparamos fijador (4% de paraformaldehído purificado y 2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato) y lo mantuvimos a 4°C. Rellenamos los eppendorf con la muestra (sangre total, PRP o geles) y el fijador, y fijamos en nevera a 4°C durante 4 a 6 horas. Lavamos 3 o 4 veces en tampón (sin fijador) 10 minutos y dejamos 12 horas en nevera a 4°C. Se tiñeron las muestras con tetraóxido de osmio y ferrocianuro durante una hora. A continuación se lavaron con agua destilada 3 veces y a continuación se deshidrataron con acetona. Posteriormente, las muestras se embebieron en soluciones de resina-

acetona. Pasado el tiempo se cambió por resina pura y se dejó hasta el día siguiente. La resina se sustituyó por otra también pura y se polimerizó en la estufa a 70 grados durante 48 horas. Posteriormente se realizaron cortes en el microtomo para inspeccionar las plaquetas en un microscopio electrónico de transmisión.

Se observaron las muestras por campos y cortes a diferentes aumentos para ver la integridad de la membrana de las plaquetas, su morfología y el contenido en gránulos alfa en su interior, en los diferentes preparados (sangre total, PRP y PRP en gel).

4.1.2.5. Análisis estadístico

Los datos recogidos para el análisis son los valores medios, desviaciones típicas y los valores máximos y mínimos de cada determinación antes del procesamiento de las muestras, y los resultados tras procesar las muestras para concentrarlas y posteriormente formar el gel.

La comparación mediante la microscopía electrónica de la morfología de las plaquetas de la sangre periférica y las que se encuentran en los concentrados se analiza de manera descriptiva.

Para el análisis estadístico se utiliza la T de Student como prueba paramétrica para una muestra y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon como no paramétrica. El coeficiente de correlación de Pearson se utiliza como medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas.

El análisis estadístico se realiza con el paquete SPSS.

4.2. APLICACIÓN CLÍNICA DEL MÉTODO

4.2.1. MATERIAL

4.2.1.1. Recursos humanos

– Pacientes en seguimiento en consultas externas de dermatología por úlceras cutáneas crónicas de más de seis meses de evolución sin respuesta a un adecuado tratamiento convencional.

- Enfermera especialista en manejo de úlceras cutáneas crónicas.
- Médico residente en dermatología.

4.2.1.2. Material fungible.

- Gasas y compresas estériles
- Agujas y jeringuillas estériles
- Recipientes de cultivo estériles
- Guantes estériles
- Mascarilla con pantalla protectora
- Ampollas de Cloruro Cálcico 10%
- Material de venopunción
- Tubos citratados y con EDTA
- Gel de hidroxietilcelulosa

4.2.1.3. Material físico y aparatos

– Servicio de Dermatología HGUGM:

- Sala de curas acondicionada.

– Unidad de Producción Celular de la Fundación para la Investigación Biomédica del HGUGM:

- Centrífuga de laboratorio convencional
- Cámara de flujo laminar en sala blanca

4.2.2. METODOLOGÍA

4.2.2.1. Selección de pacientes

Pacientes en seguimiento en consultas externas de dermatología por úlceras cutáneas crónicas de más de seis meses de evolución sin respuesta a un adecuado tratamiento convencional que, voluntariamente, tras ser informados, deciden iniciar el tratamiento propuesto. El tamaño muestral está limitado por la carga asistencial.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para poder ser incluido en el estudio, los pacientes deben otorgar su consentimiento para el estudio tras haber comprendido la información facilitada en la hoja de información al paciente (HIP)

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Menores de 18 años.
- Mujeres embarazadas.
- Pacientes con anemia.
- Pacientes con coagulopatías.
- Enfermedades sistémicas.
- Pacientes inmunodeprimidos.
- Signos de sobreinfección en la úlcera.
- Hallazgos histológicos de malignidad en biopsia de la úlcera.

4.2.2.2. Extracción de sangre y centrifugación

– Extracción de sangre del paciente en tubos estériles de 3,5 ml con citrato sódico al 3,8% (con 4 tubos se trataría la superficie correspondiente a una palma). Se extrae un tubo más en EDTA para análisis del hemograma y recuento de las plaquetas.

– Los tubos se centrifugan a 160 g durante 6 minutos. Se descartan los tubos con plasma de apariencia turbia tras la centrifugación.



Figura 4.3: Venopunción con almacenamiento de la sangre en tubos citratados y posterior centrifugación a 160 g durante 6 minutos.

Dado que se trata de una técnica abierta, todo el proceso de manipulación del plasma se realiza en una campana de flujo laminar, en la sala blanca de la Unidad de Producción Celular del HGUGM, cumpliendo las exigencias de calidad de la normativa vigente⁷.

El plasma obtenido se separa en fracciones mediante pipeteado: el tercio superior se denomina plasma pobre en factores de crecimiento (PPP) y ocupa alrededor de 0,5 centímetros cúbicos (cc). En el tercio inmediatamente inferior, se encuentra el plasma con una concentración media y ocupa aproximadamente 0,5 cc. El tercio inmediatamente por encima del concentrado de hematíes es la fracción rica en factores de crecimiento.



Figura 4.4: Sala blanca con campana de flujo laminar.

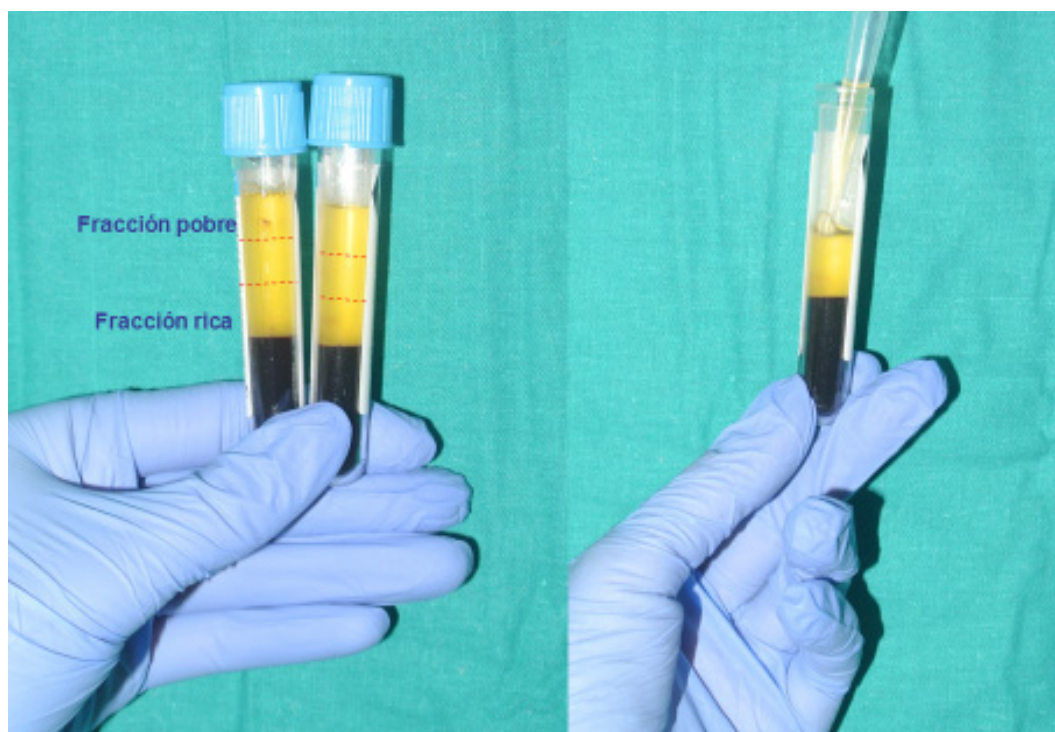


Figura 4.5: Tras centrifugación, pipeteado para la separación.

- El total de cada fracción se junta en un tubo de ensayo diferente.
- En función de la necesidad, según el tamaño de la úlcera, emplearemos sólo la fracción rica o también la media. La pobre la desecharmos.



Figura 4.6: Las 3 fracciones de plasma (rico, medio y pobre) separadas.

Para activar el plasma, se aspira con aguja estéril y se mezcla con CaCl₂ 10% (0,1 mL CaCl₂ /1,0 mL de PRP).¹ Acto seguido, se agita la mezcla.



Figura 4.7: Activación del PRP con CaCl₂ 10% (0,1 mL CaCl₂ /1,0 mL de PRP).

4.2.2.3. Obtención del gel y modo de aplicación

– Aplicación únicamente en gel o en combinación con inyección intralesional. Se inyecta en pacientes con úlceras neuropáticas o lesiones pequeñas (menos de 2 cm de diámetro) en pacientes con buena tolerancia al dolor.

- Gelificación del PRP: mezcla con gel de hidroxietilcelulosa 5% (1:1)
- La inyección del PRP se realiza inmediatamente tras la activación con CaCl₂ (en los 10 minutos siguientes)

– Se colocan gasas y vendaje o media de compresión, en caso de úlceras venosas, y dispositivo de descarga en caso de úlcera neuropática.

4.2.2.4. Seguimiento

- Se levanta la cura a los 3-4 días.
- Frecuencia de aplicación de PRP: cada 7-15 días. Sin límite de número de sesiones, hasta conseguir la curación de la úlcera o, en su defecto, el tejido de granulación adecuado para cubrir posteriormente con injerto.
- Entre sesiones, las curas se realizan con suero fisiológico y gasas vaselinadas.
- Tras obtener el cierre de la herida, los pacientes serán controlados de manera mensual durante un año en Consultas Externas de Dermatología, para valorar si se mantiene la respuesta en el tiempo

4.2.2.5. Variables recogidas

a) Primaria:

- Duración del tratamiento hasta curación completa (número y frecuencia de sesiones) o hasta la obtención de un lecho adecuado para cubrir con injerto. El cierre completo de la herida se define como una reepitelización sin necesidad de drenajes o apósitos confirmada en dos visitas consecutivas separadas dos semanas.¹²⁴

b) Secundarias:

- Número de úlceras curadas
- Impacto en la calidad de vida medido con el cuestionario DLQI (Der-

matology Life Quality Index). Se recoge la diferencia en la puntuación entre el inicio y el final del tratamiento.

El DLQI es un cuestionario sencillo y breve (su cumplimentación puede hacerse entre 3 y 6 minutos) y por tanto útil para la práctica clínica rutinaria¹²⁵. Por ser aplicable a cualquier enfermedad dermatológica permite comparar el impacto que cada una de ellas tiene sobre la calidad de vida. Consta de 10 preguntas con 4 posibles respuestas cada una de ellas, puntuadas de 0 a 3, que hacen referencia a los últimos 7 días de la vida del paciente. El DLQI se calcula como la suma de esas puntuaciones hasta un máximo de 30. Cuanto mayor es la puntuación menor es la calidad de vida del paciente debido a su enfermedad. Las 10 preguntas hacen referencia a diferentes aspectos de la vida del paciente y podríamos agruparlas de la siguiente manera: síntomas y sentimientos (1 y 2); actividades diarias (3 y 4); ocio (5 y 6); trabajo (7); relaciones personales (8 y 9), y tratamiento (10). De Tiedra y colaboradores¹²⁶ validaron la versión española de este cuestionario (Ver figuras 4.8 y 4.9).

– Cumplimiento del paciente: definido como el porcentaje de sesiones de tratamiento programadas a las que asiste el paciente.

– Número de pacientes con efectos adversos. Frecuencia y gravedad de efectos adversos durante el estudio.

4.2.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico es descriptivo. Se emplean medias, medianas y porcentajes.

CUESTIONARIO SOBRE LA CALIDAD DE VIDA – DERMATOLOGÍA

El objetivo de este cuestionario consiste en determinar qué efecto ha tenido su problema de la piel en su vida DURANTE LA ÚLTIMA SEMANA. Por favor marque con una "X" una casilla para cada pregunta.

1.	Durante la última semana, ¿ha sentido pica zón, dolor o ardor en la piel o la ha tenido dolorida ?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
2.	Durante la última semana, ¿se ha sentido avergonzado/a o cohibido/a debido a su piel?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
3.	Durante la última semana, ¿le ha molestado su condición de la piel para hacer las compras u ocuparse de la casa o el jardín ?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
4.	Durante la última semana, ¿ha influido su condición de la piel en la elección de la ropa que lleva?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
5.	Durante la última semana, ¿ha influido su condición de la piel en alguna actividad social o recreativa ?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
6.	Durante la última semana, ¿ha tenido dificultad para practicar deportes debido a su condición de la piel?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
7.	Durante la última semana, ¿le ha impedido su condición de la piel trabajar o estudiar ?	Sí No	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
	Si la respuesta es "No", durante la última semana, ¿cuánta dificultad le ha ocasionado su condición de la piel en el trabajo o en sus estudios ?	Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
8.	Durante la última semana, ¿su condición de la piel le ha ocasionado dificultades con su pareja , amigos íntimos o familiares ?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
9.	Durante la última semana, ¿cuánta dificultad le ha ocasionado su condición de la piel en su vida sexual ?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>

Figura 4.8: cuestionario de calidad de vida en dermatología DLQI (primera parte).

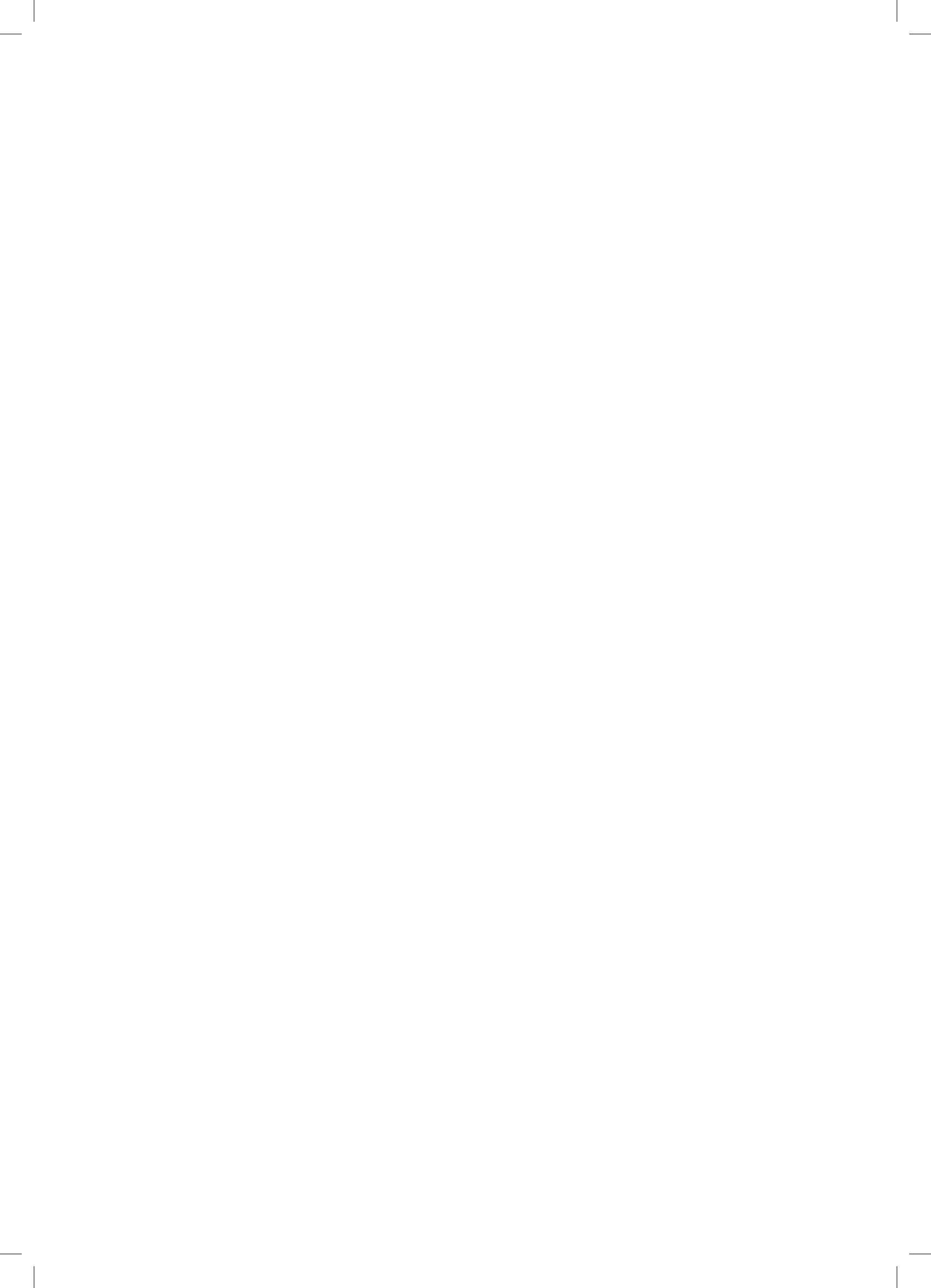
10.	Durante la última semana, ¿cuánta dificultad le ha ocasionado su tratamiento de la piel, por ejemplo, ocupándole tiempo o ensuciando o desordenando su casa?	Muchísimo Mucho Un poco Nada	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Sin relación	<input type="checkbox"/>
-----	---	---------------------------------------	--	--------------	--------------------------

Por favor verifique que ha contestado a TODAS las preguntas. Muchas gracias.

Figura 4.9: cuestionario de calidad de vida en dermatología DLQI (segunda parte)



V. Resultados



5.1. RECUENTO DE PLAQUETAS BASALES Y EN CONCENTRADOS

Se recogieron muestras de 43 pacientes, pero 8 tuvieron que ser desechadas, por alteración en su manipulación o errores de medida.

Como vemos en la tabla 5.1, la media de concentración de plaquetas hallada es 1,59 veces superior a la concentración basal en sangre total, con una desviación típica de 0,39.

La media de plaquetas en sangre entera es de $198.260/\text{mm}^3$ con una desviación típica de $50.150/\text{mm}^3$, lo que indica que la muestra es muy homogénea. La mayoría de los datos se encuentran en un rango entre 150.000 y 295.000, y sólo quedan 3 valores por debajo del límite inferior.

En los concentrados, la media de plaquetas/ mm^3 es de 310.490, con una desviación típica de 93.970, en un rango de 175.000 y 480.000, si no contamos dos valores extremos (uno inferior y otro superior a los límites).

Los preparados obtenidos con nuestro método obtienen leucocitos en una concentración media de $1.130/\text{mm}^3$, con una desviación de $1.110/\text{mm}^3$. Ver tabla 5.1.

En las muestras concentradas hallamos eritrocitos en niveles prácticamente indetectables.

Paciente	Plaquetas de sangre $\times 10^3/\mu\text{L}$	Plaquetas en concentrado $\times 10^3/\mu\text{L}$	Cociente plaquetas concentrado / sangre	Leucocitos en concentrado $\times 10^3/\mu\text{L}$	Hematíes en concentrado $\times 10^6/\mu\text{L}$
1	240	392	1,63	0,7	0,02
2	178	249	1,40	0,3	0,03
3	156	270	1,73	0,6	0,02
4	194	186	0,96	0	0,03
5	130	356	2,23	1,3	0,02
6	202	358	1,77	0,8	0,01
7	152	343	2,26	0,4	0,03
8	161	257	1,60	0,6	0,04
9	91	117	1,29	0,3	0
10	193	175	0,91	0,1	0
11	Error de medición				
12	264	311	1,18	0,2	0,03
13	Error de medición				
14	235	329	1,40	0,4	0,02
15	195	273	1,40	0,4	0,03
16	192	328	1,71	1,5	0,01
17	Error de medición				
18	217	350	1,61	0,3	0,01
19	150	241	1,61	0,1	0,02
20	159	271	1,70	1,7	0,04
21	197	439	2,23	4,3	0,06
22	204	365	1,79	2,6	0,04
23	Error de medición				
24	Error de medición				
25	Error de medición				
26	Error de medición				
27	263	506	1,92	2,5	0,02
28	289	295	1,02	3	0,01
29	295	370	1,25	0,4	0,01
30	123	227	1,85	0,2	0
31	178	242	1,36	0,5	0,01
32	251	260	1,04	0,8	0,04
33	114	192	1,68	1	0,05
34	227	270	1,19	1,5	0,05
35					
36	216	219	1,01	4,5	0,04
37	163	212	1,30	1	0,03
38	252	480	1,90	2,4	0,03
39	229	479	2,09	1,5	0,02
40	141	254	1,80	0,9	0,02
41	190	379	1,99	0,9	0,02
42	172	409	2,38	1,7	0,03
43	296	463	1,56	0,7	0,01
Media Total	198,26	310,49	1,59	1,13	0,02
Desviación típica total	50,15	93,97	0,39	1,11	0,01

Tabla 5.1: Concentración de plaquetas en sangre basal y composición de concentrados (plaquetas, leucocitos y hematíes).

5.2. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO LIBERADOS

Como podemos observar en la Tabla 5.2, hallamos una alta variabilidad interindividual en la concentración de factores de crecimiento liberada (elevada dispersión de la muestra), por lo que realizamos una prueba no paramétrica (prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Ver tabla 5.3) para confirmar los hallazgos obtenidos con la paramétrica (T-Student para muestras relacionadas. Ver tabla 5.4). Las diferencias entre la liberación de factores de crecimiento en el PRP y sin añadir el gel fueron significativas en la práctica totalidad de las mediciones. Las correlaciones entre la concentración de plaquetas y la cantidad de factores de crecimiento fueron muy bajas, ninguna significativa (tabla 5.5). Las mediciones de la concentración de EGF, PDGF-bb, VEGF y TGF-b1 se corresponden a picogramos/mililitro (pg/ml). La concentración de IGF figura en nanogramos/ml (ng/ml).

	Grupo	N Válidos (Tiempo)			Media (tiempo)		
		20 min.	60 min.	24 h.	20 min.	60 min.	24 h.
EGF	Gel	42	43	42	6507	6408	6532
EGF	Plasma	42	42	42	836	915	1051
PDGF-BB	Gel	42	43	42	452	471	518
PDGF-BB	Plasma	42	42	42	5305	5037	3672
VEGF	Gel	42	43	40	268	243	252
VEGF	Plasma	42	42	42	269	281	311
T GF -b1	Gel	42	43	42	15690	14086	12505
T GF -b1	Plasma	42	42	42	5624	5395	5860
IGF1	Gel	42	42	43	26	31	32
IGF1	Plasma	41	42	40	112	112	101

	Grupo	Desv. tip. (tiempo)			Error típico de la media		
		20 min.	60 min.	24 h.	20 min.	60 min.	24 h.
EGF	Gel	3422	3151	3403	1056	961	1050
EGF	Plasma	431	280	469	133	87	145
PDGF-BB	Gel	303	358	436	93	109	134
PDGF-BB	Plasma	2120	2428	1975	654	749	609
VEGF	Gel	180	204	149	55	62	47
VEGF	Plasma	165	176	222	51	54	69
TGF-b1	Gel	9883	10548	7028	3050	3217	2169
TGF-b1	Plasma	1551	1693	1405	479	522	434
IGF1	Gel	31	28	30	9	9	9
IGF1	Plasma	80	79	79	25	24	25

Tabla 5.2: Estadísticos de la comparación de cinética de liberación de factores de crecimiento entre preparados con y sin gel de HEC.

Tiempo		EGF (Plasma) - EGF (Gel)	PDGF-BB (Plasma) - PDGF-BB (Gel)	VEGF (Plasma) - VEGF (Gel)	TGF-b1 (Plasma) - TGF-b1 (Gel)	IGF1 (Plasma) - IGF1 (Gel)
20 min.	Z	-5,566	-5,579	-1,017	-5,410	-5,162
	Sig. asintót. (bilateral)	0,000	0,000	0,309	0,000	0,000
60 min.	Z	-5,583	-5,645	-2,144	-4,858	-5,370
	Sig. asintót. (bilateral)	0,000	0,000	0,032	0,000	0,000
24 h.	Z	-5,579	-5,579	-2,043	-4,995	-5,000
	Sig. asintót. (bilateral)	0,000	0,000	0,041	0,000	0,000

Tabla 5.3: Estadísticos de contraste de la comparación de ambos métodos mediante la Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

Paciente	Diferencias relacionadas. Media	Desviación típica	Error típico de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia inferior	Superior	T	Grados de libertad	Sig. (bilateral)		
20 min.	Par 1	EGF (Gel) - EGF (Plasma)	5810,8817	3419,6654	534,0620	4731,5021	6890,2613	10,881	40	0,000
	Par 2	PDGF-BB (Gel) - PDGF-BB (Plasma)	-4931,6476	2038,9779	318,4348	-5575,2284	-4288,0667	-15,487	40	0,000
	Par 3	VEGF (Gel) - VEGF (Plasma)	-11,5410	192,0194	29,9884	-72,1498	49,0678	-0,385	40	0,702
	Par 4	TGF-b1 (Gel) - TGF-b1 (Plasma)	9969,9732	9590,8831	1497,8443	6942,7169	12997,2294	6,656	40	0,000
	Par 5	IGF1 (Gel) - IGF1 (Plasma)	-86,0950	89,6583	14,1762	-114,7691	-57,4209	-6,073	39	0,000
60 min.	Par 1	EGF (Gel) - EGF (Plasma)	5638,4786	3064,1549	472,8094	4683,6207	6593,3365	11,925	41	0,000
	Par 2	PDGF-BB (Gel) - PDGF-BB (Plasma)	-4597,4952	2406,6194	371,3494	-5347,4506	-3847,5398	-12,381	41	0,000
	Par 3	VEGF (Gel) - VEGF (Plasma)	-33,2764	139,4095	21,5113	-76,7195	10,1666	-1,547	41	0,130
	Par 4	TGF-b1 (Gel) - TGF-b1 (Plasma)	8732,0071	10230,3536	1578,5778	5544,0045	11920,0098	5,532	41	0,000
	Par 5	IGF1 (Gel) - IGF1 (Plasma)	-80,9821	77,7657	11,9995	-105,2156	-56,7486	-6,749	41	0,000
24 h.	Par 1	EGF (Gel) - EGF (Plasma)	5648,1366	3299,9856	515,3712	4606,5326	6689,7406	10,959	40	0,000
	Par 2	PDGF-BB (Gel) - PDGF-BB (Plasma)	-3145,8976	1849,1268	288,7851	-3729,5540	-2562,2411	-10,894	40	0,000
	Par 3	VEGF (Gel) - VEGF (Plasma)	-69,6173	191,1104	30,2172	-130,7373	-8,4972	-2,304	39	0,027
	Par 4	TGF-b1 (Gel) - TGF-b1 (Plasma)	6633,4878	6616,4608	1033,3176	4545,0751	8721,9005	6,420	40	0,000
	Par 5	IGF1 (Gel) - IGF1 (Plasma)	-68,5938	77,5468	12,2612	-93,3944	-43,7931	-5,594	39	0,000

Tabla 5.4: Prueba T de Student para muestras relacionadas

		Coefficiente concentración plaquetas
EGF (GEL)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,119
	SIG. (BILATERAL)	0,511
	N	33
PDGF-BB (GEL)	CORRELACIÓN DE PEARSON	0,100
	SIG. (BILATERAL)	0,581
	N	33
VEGF (GEL)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,070
	SIG. (BILATERAL)	0,697
	N	33
TGF-B1 (GEL)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,128
	SIG. (BILATERAL)	0,477
	N	33
IGF1 (GEL)	CORRELACIÓN DE PEARSON	0,169
	SIG. (BILATERAL)	0,347
	N	33
EGF (PLASMA)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,055
	SIG. (BILATERAL)	0,757
	N	34
PDGF-BB (PLASMA)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,226
	SIG. (BILATERAL)	0,200
	N	34
VEGF (PLASMA)	CORRELACIÓN DE PEARSON	-0,179
	SIG. (BILATERAL)	0,310
	N	34
TGF-B1 (PLASMA)	CORRELACIÓN DE PEARSON	0,247
	SIG. (BILATERAL)	0,159
	N	34
IGF1 (PLASMA)	CORRELACIÓN DE PEARSON	0,120
	SIG. (BILATERAL)	0,505
	N	33

Tabla 5.5: Correlación entre concentración de plaquetas y liberación de factores de crecimiento.

Las gráficas muestran los resultados comparativos de la cinética de liberación de factores en el PRP con y sin añadir el gel. Se observan diferentes perfiles de liberación de todos los factores menos VEGF (figuras 5.1-5.5++). La liberación de EGF y TGF en las 3 mediciones (a los 20 minutos, 60 minutos y a las 24 horas) es superior de manera estadísticamente significativa en las muestras en las que se ha añadido el gel. Por el contrario, la concentración de PDGF-BB obtenida en las muestras de PRP aislado es superior. IGF, al estar presente en el plasma y no ser liberado por las plaquetas, es superior en las muestras con más cantidad de plasma (las muestras sin gel añadido).

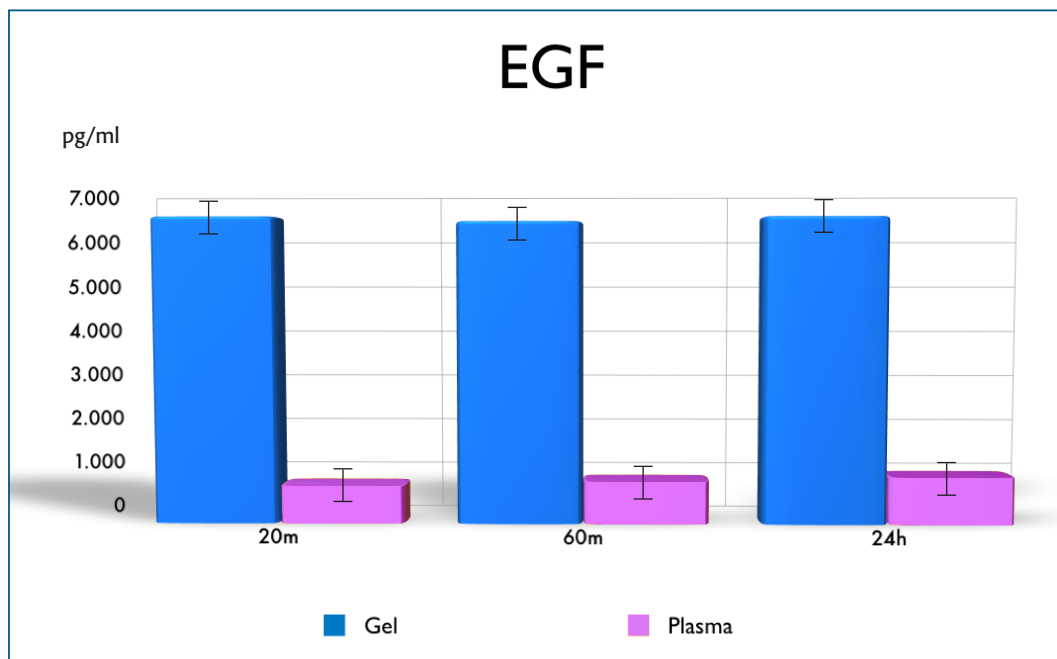


Figura 5.1: Cinética de liberación de EGF.

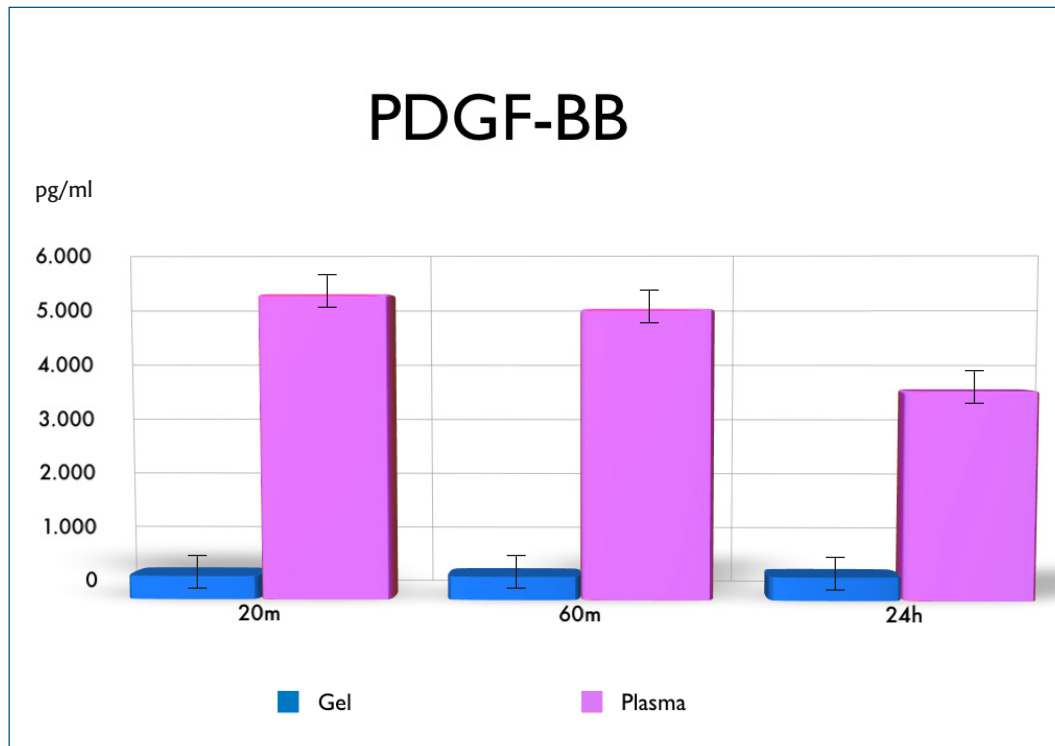


Figura 5.2: Cinética de liberación de PDGF-BB.

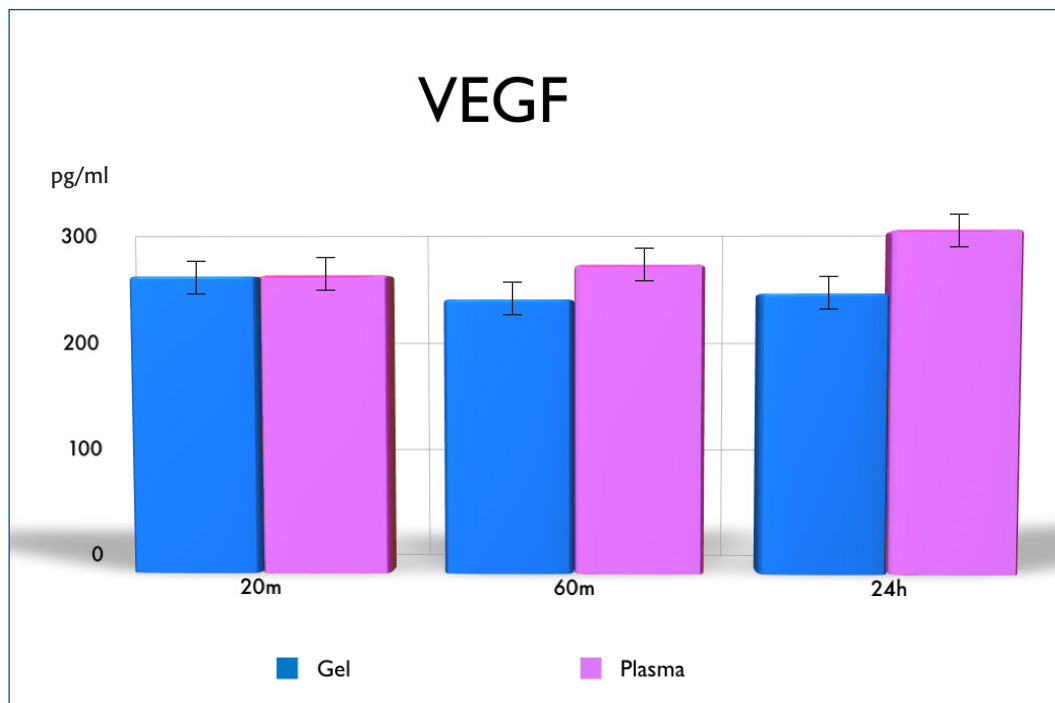


Figura 5.3: Cinética de liberación de VEGF.

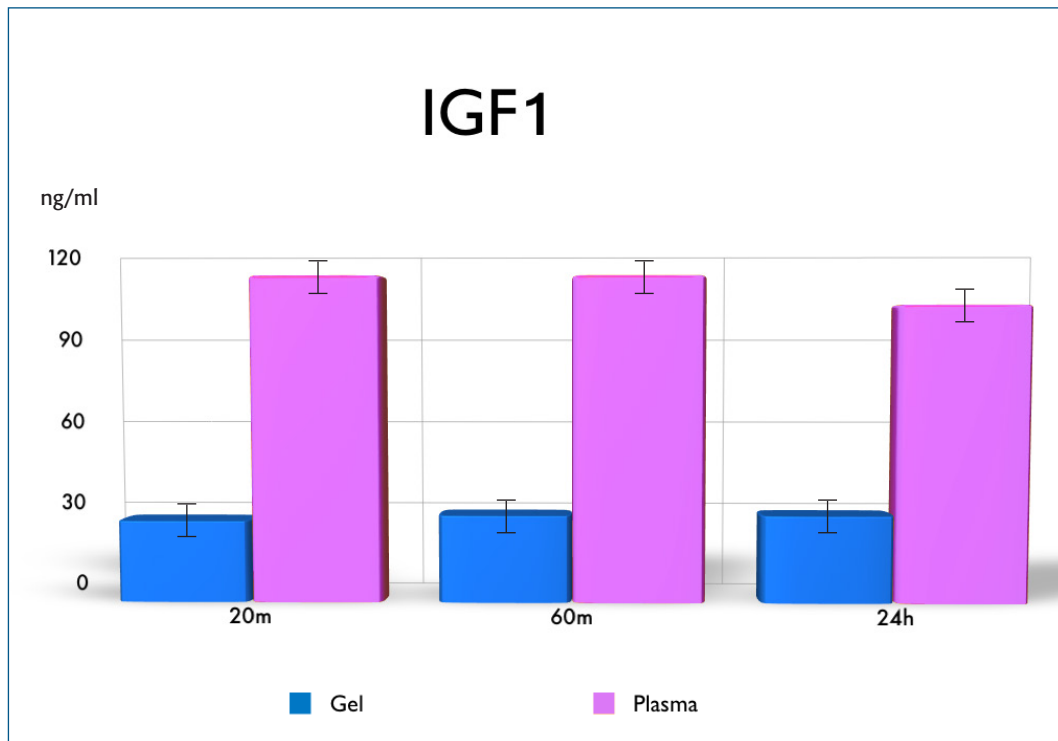


Figura 5.4: Concentración de IGF-1.

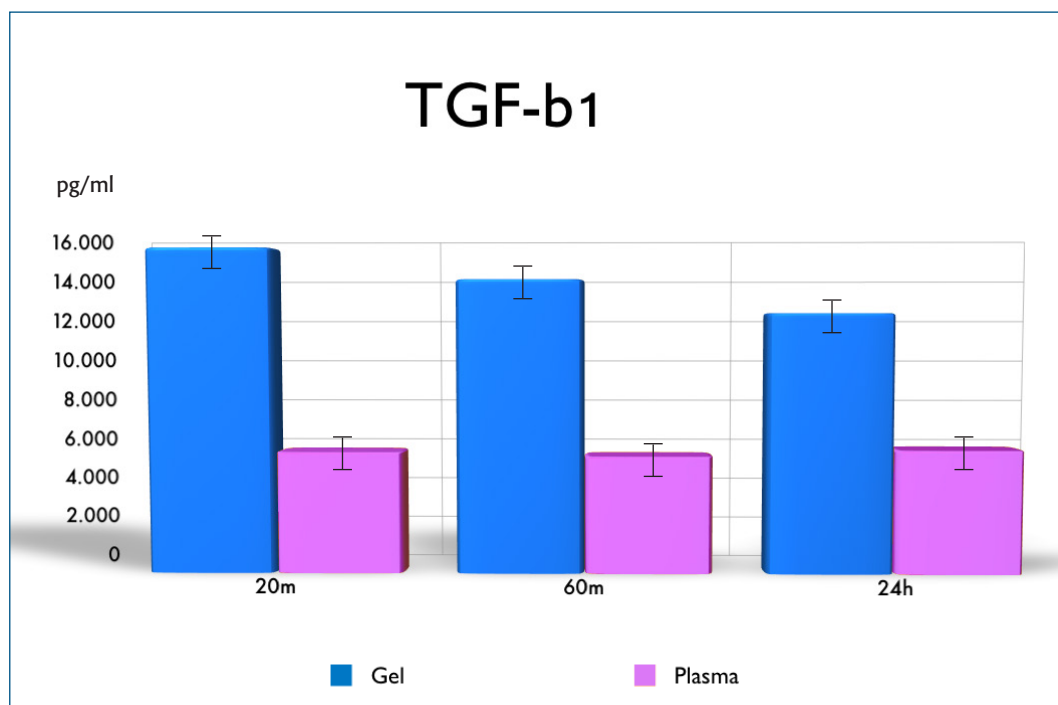


Figura 5.5: Cinética de liberación de TGF-b1.

5.3. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

Las plaquetas están preparadas para agregarse y activarse ante cualquier solución de continuidad del endotelio para evitar la hemorragia. Por tanto, son muy sensibles a cualquier manipulación, con un riesgo de ser destruidas o de activarse y liberar sus gránulos de manera precoz.^{127,128} La visualización con el microscopio electrónico nos ayuda a determinar si nuestra técnica de obtención de PRP, solo y con el gel de hidroxietilcelulosa, preserva la morfología plaquetaria en nuestros preparados, manteniendo su función posterior al ser aplicados en los tejidos. Como control tomamos las plaquetas presentes en sangre periférica, que ya están discretamente modificadas por reacción a la venopunción para su extracción (Figura 5.6). También observamos la estructura polimérica del gel de HEC sin añadir PRP para su correcta identificación posterior en las muestras y evitar confusión con otros componentes de los preparados (Figura 5.7).

Tras la inclusión de las muestras en resina se realizaron cortes de los mismos y se observaron al microscopio electrónico. Observamos que no hay diferencias significativas entre las plaquetas de los 3 preparados (sangre total, PRP y PRP en gel), como observamos en las figuras 5.8, 5.9 y 5.10 respectivamente.

La observación de cada muestra fue sistemática valorando los siguientes parámetros, indicativos del grado de activación plaquetaria: integridad celular, morfología, número de pseudópodos y signos de granulación.¹²³

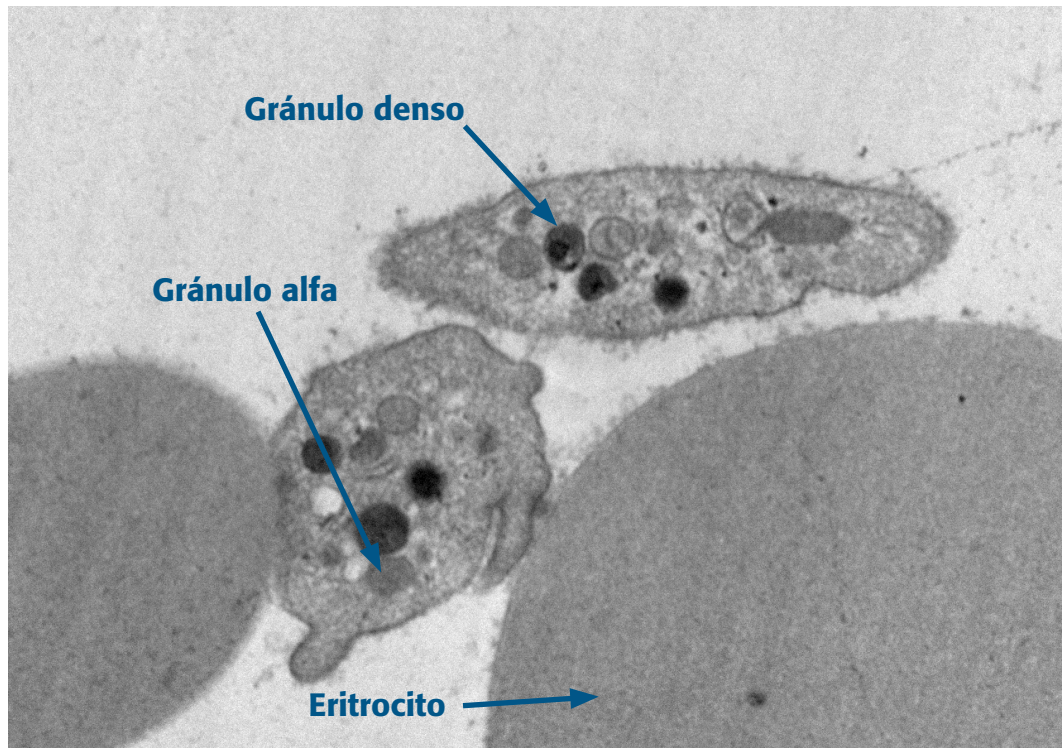


Figura 5.6: Plaquetas en sangre total, entre eritrocitos, x25.000.

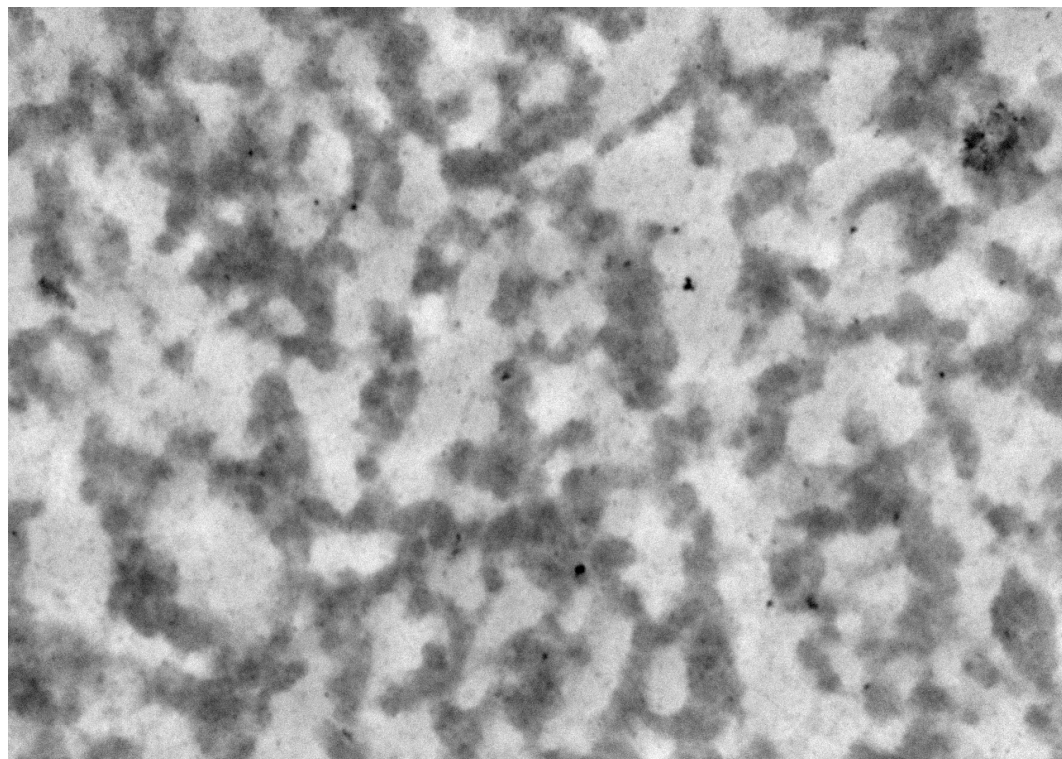


Figura 5.7: Estructura polimérica del gel aislado, x40.000.



Figura 5.8: Plaquetas en sangre total, entre eritrocitos, x50.000.

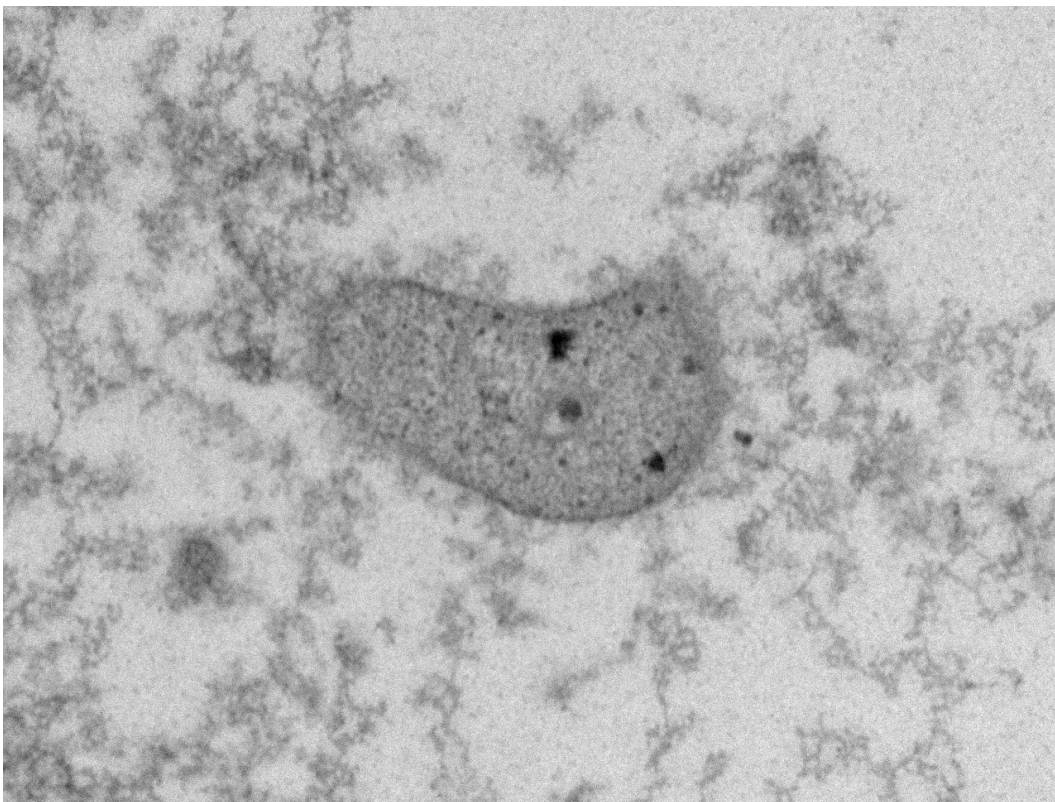


Figura 5.9: Plaqueta en concentrado sin gel, x60.000.

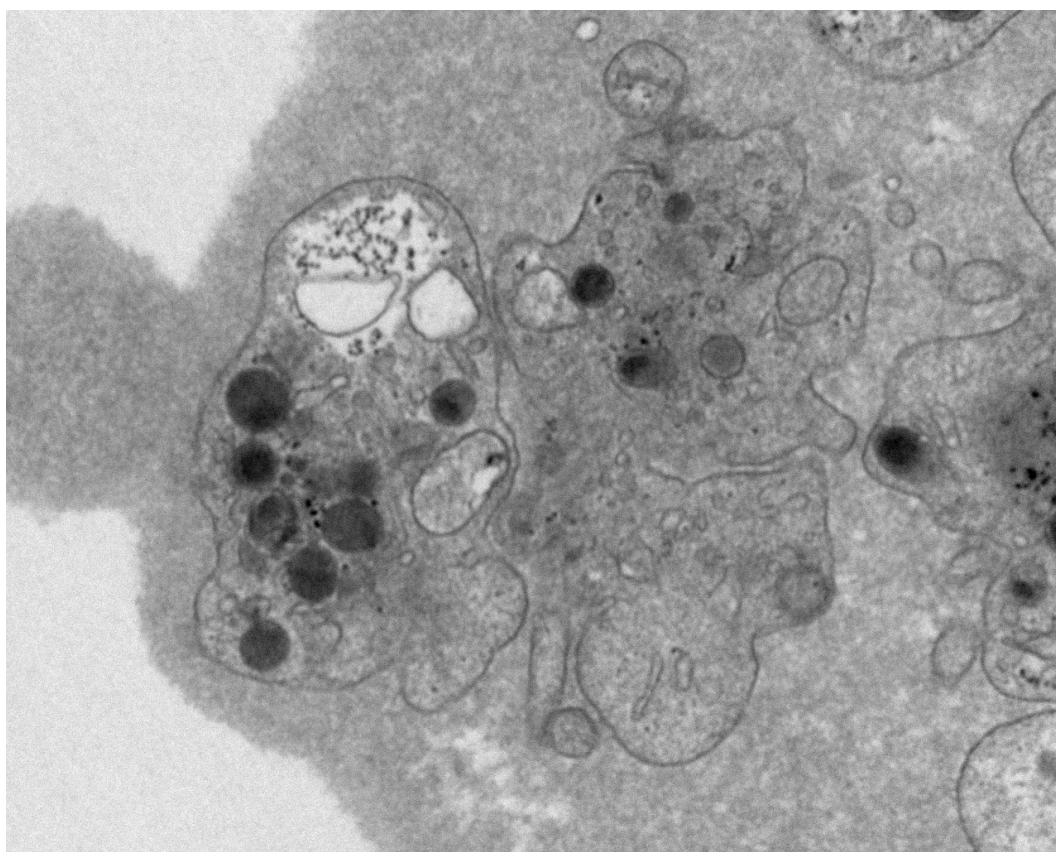


Figura 5.10: Plaquetas con morfología preservada embebidas en gel de HEC, x30.000.

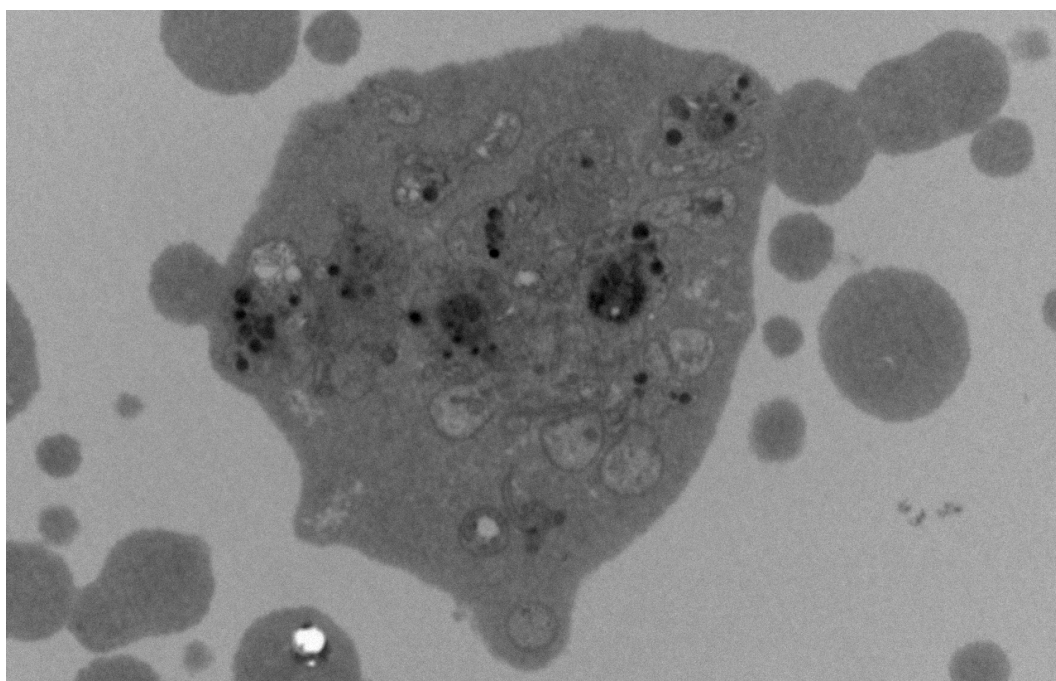


Figura 5.11: Plaquetas embebidas en el gel de HEC, x8.000.

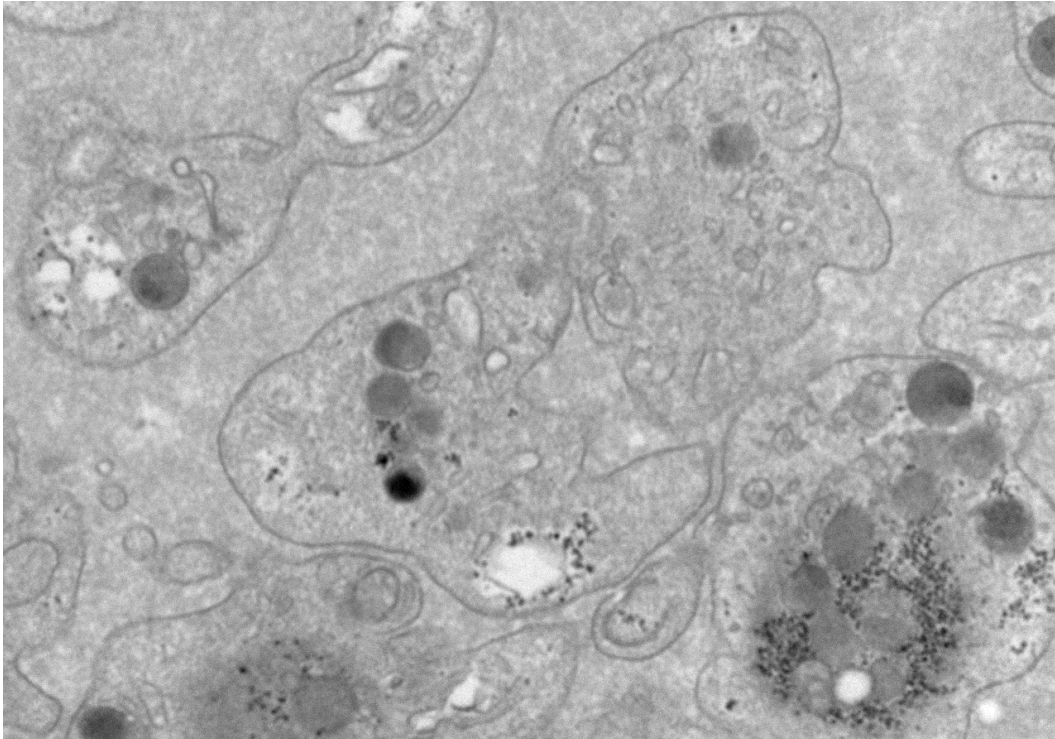


Figura 5.12: Membranas de plaquetas preservadas en concentrado con gel HEC, x30.000.



Figura 5.13: Plaquetas en sangre total, entre eritrocitos, x50.000 (2).

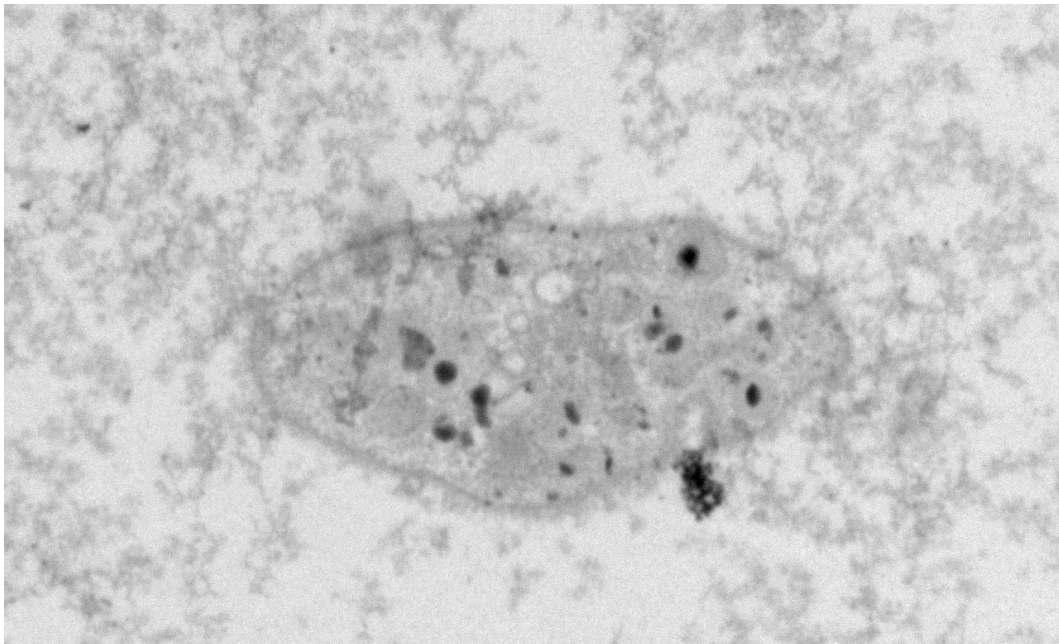


Figura 5.14: Plaqueta en concentrado sin gel, x30.000.

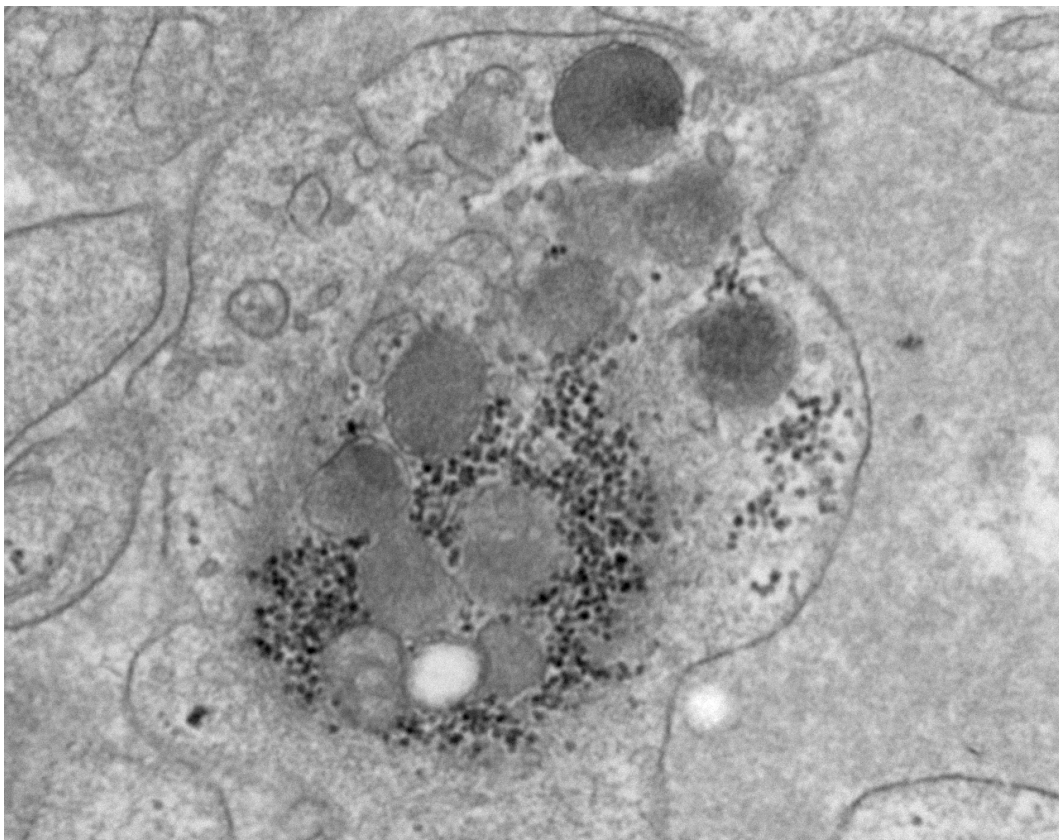


Figura 5.15: Mayor detalle de plaqueta en el gel de HEC, x60.000.

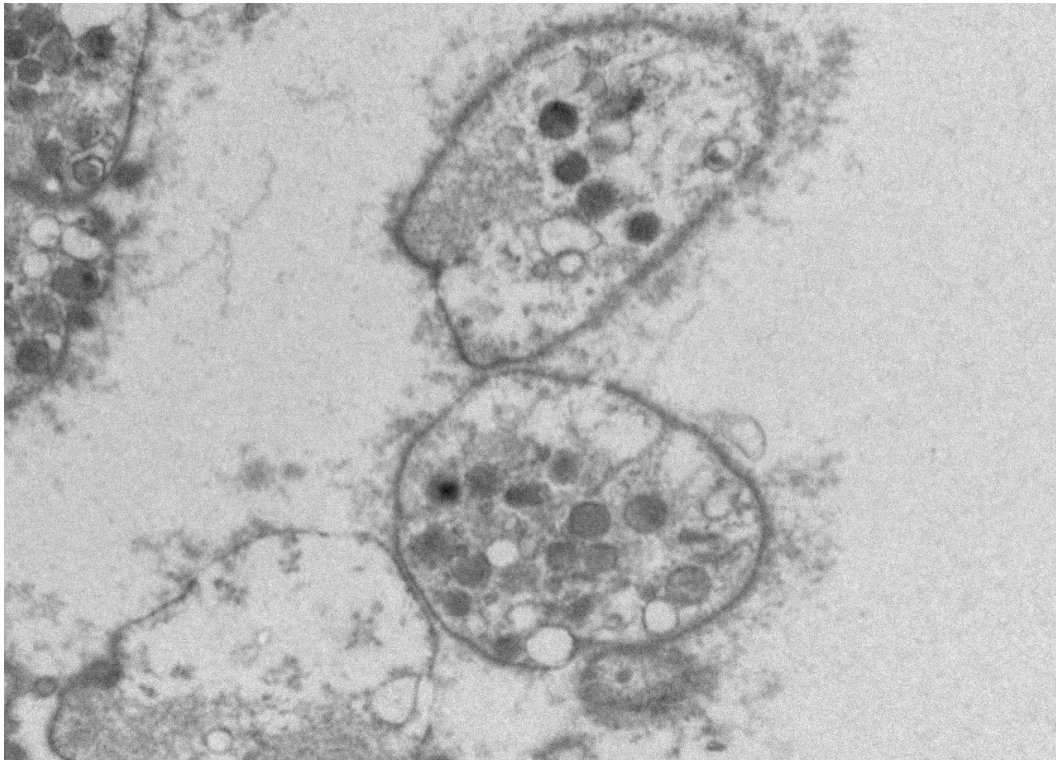


Figura 5.16: Plaquetas en concentrado sin gel, x20.000.

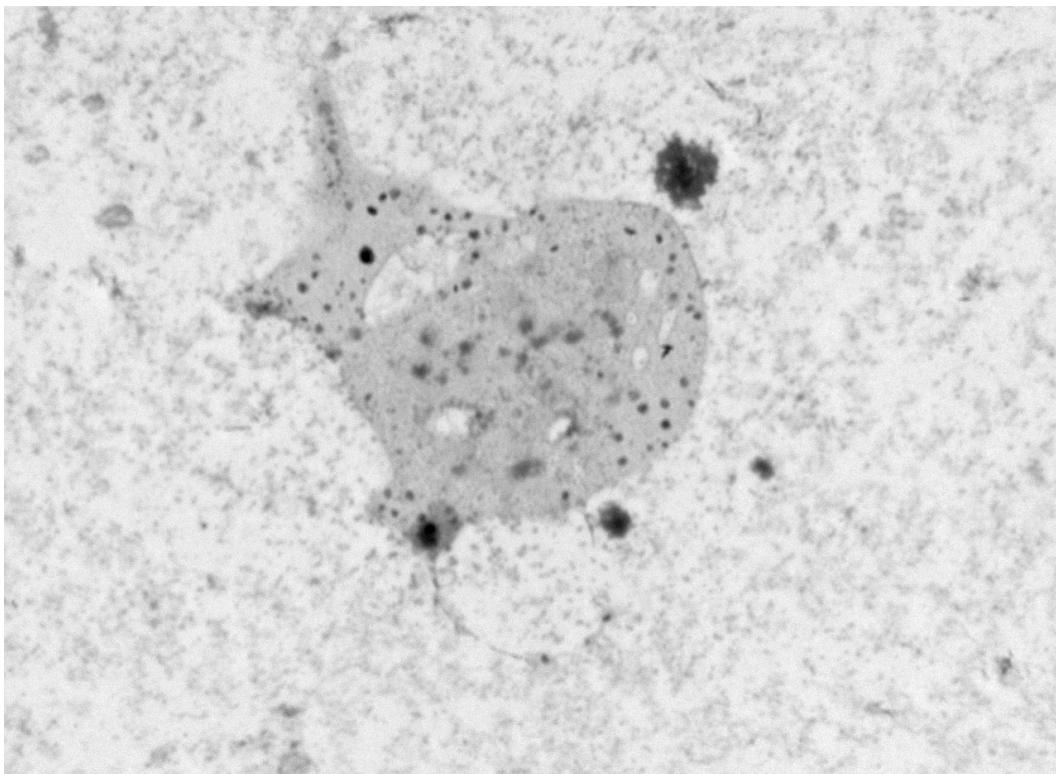


Figura 5.17: Plaqueta en concentrado sin gel, x25.000.

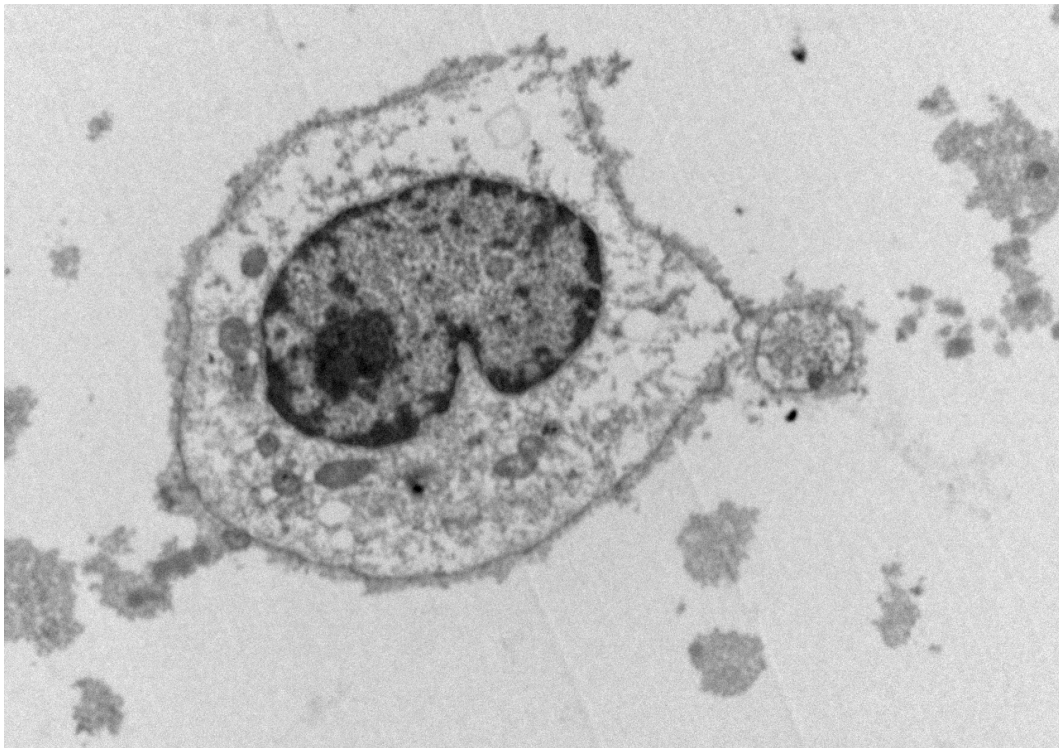


Figura 5.18: Leucocito en concentrado con gel de HEC, x8.000.

INTEGRIDAD CELULAR:

Tras su escisión del megacariocito y hasta su activación, la plaqueta mantiene una morfología esférica, que favorece su circulación en el torrente sanguíneo. El proceso de centrifugación para separar las diferentes fases de la sangre total y el pipeteado para la obtención del PRP representan factores de estrés físico para las plaquetas. Dado que utilizamos una única centrifugación a una fuerza baja durante poco tiempo, el daño potencial debería ser menor que el de otras técnicas con parámetros más elevados. Por otro lado, la mezcla del PRP con el gel, que ha de homogeneizarse removiendo con una varilla, también sería otro factor estresante que podría fragmentar las plaquetas.

Sin embargo, en nuestras muestras pudimos observar un gran número

de plaquetas íntegras, con sus organelas y membranas preservadas, sin diferencias entre los preparados. Llama la atención la integridad mantenida de las plaquetas dentro del gel (Figuras 5.11-12).

MORFOLOGÍA:

Las plaquetas presentan una forma esférica en su estado inactivo. Dada su elevada sensibilidad ante la mínima manipulación, se activan con facilidad, adoptando una forma más irregular, con la formación de pseudópodos para aumentar su superficie y favorecer la adhesión, agregación y señalización celular.^{128,129} Wagner¹²⁸ mide el grado de actividad de la plaqueta en función de su perímetro, comparando el de una esfera (valor 1) con el que resulta al dividirlo entre la longitud de sus excrecencias (el valor 0 sería la actividad máxima plaquetaria). En las muestras visualizadas podemos observar que la morfología entre preparados, a pesar de no ser perfectamente esférica, es similar. El porcentaje de superficie celular ocupada por pseudópodos tanto en la sangre periférica como en las plaquetas de los concentrados no superan el 10% del perímetro de la célula (Figuras 5.13-15).

DEGRANULACIÓN:

La integridad de las organelas y gránulos plaquetarios son un signo de que todavía no se ha producido la actividad y que el contenido proteico se encuentra en su interior, preparado para su liberación y acción en el lugar donde se aplique el preparado.

Como vemos en las siguientes imágenes (Figuras 5.10, 5.16-17), la

estructura de sus organelas y gránulos está mayoritariamente preservada en ambos tipos de preparados (con y sin HEC).

Dado que nuestros preparados contienen leucocitos, pudimos observarlos de manera puntual en las muestras (Figura 5.18).

5.4. EXPERIENCIA CLÍNICA

El periodo de tratamiento y seguimiento de los pacientes, desde la inclusión del primer paciente hasta el fin del estudio, fue de Diciembre de 2012 hasta marzo de 2014.

Caso1. Mujer de mediana edad con úlcera venosa supramaleolar de meses de evolución, intensamente dolorosa, con estudio histológico compatible con acroangiodermatitis. Tras 8 sesiones semanales de aplicación de PRP en gel, logramos una reepitelización completa con desaparición del dolor (figura 5.19A antes de tratamiento y figura 5.19B, después de tratamiento).

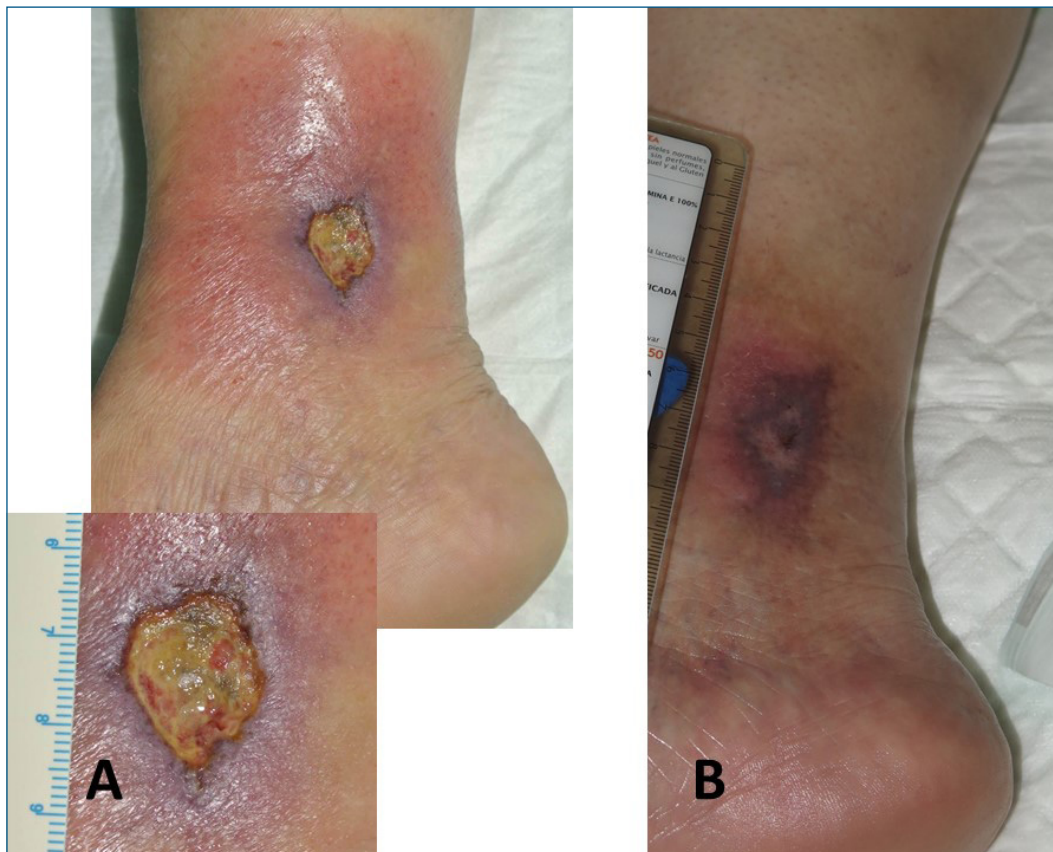


Figura 5.19 (A,B): Caso 1

Caso 2. Mujer con úlcera venosa supramaleolar en contexto de insuficiencia venosa, muy dolorosa, de 3 años de evolución. Tras 8 sesiones de tratamiento semanal con PRP en gel, presenta cierre completo (figura 5.20A antes de tratamiento y figura 5.20B, después de tratamiento).

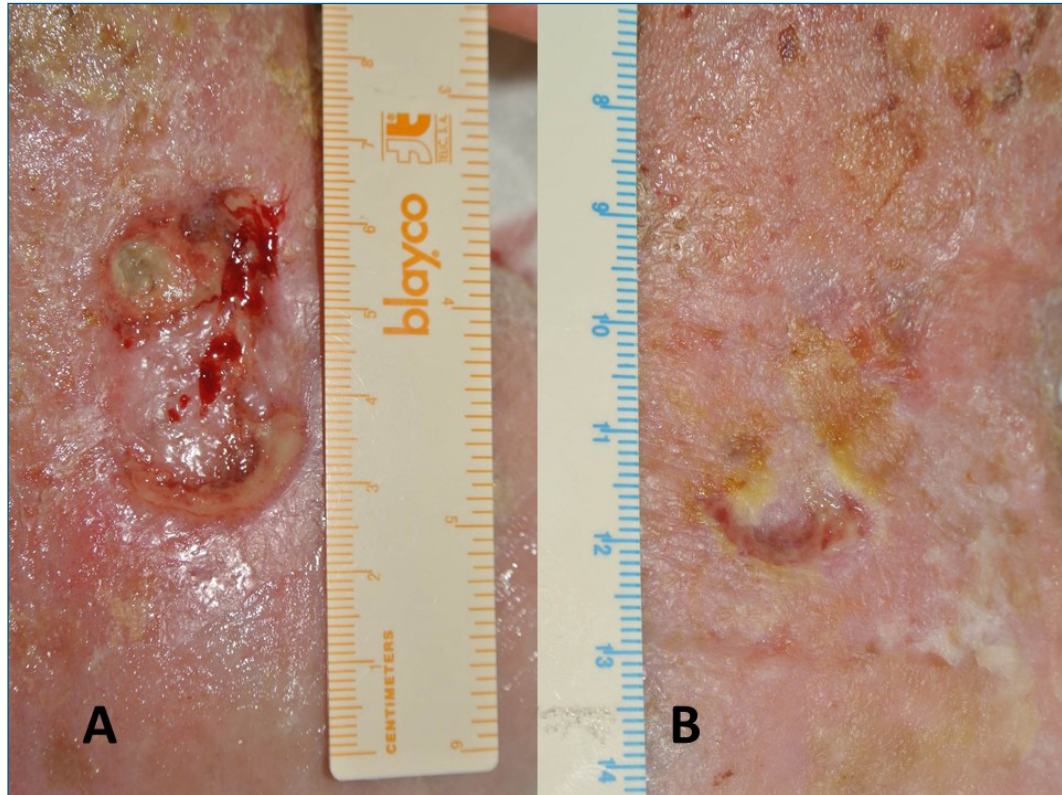


Figura 5.20 (A,B): Caso 2

Caso 3. Mujer con úlcera venosa de 2 años de evolución que había precisado múltiples ciclos de antibióticos en el último año por episodios de sobreinfección, e incluso tratamiento hospitalario para tratamiento intravenoso. Como podemos observar, presenta reepitelización prácticamente total tras 13 semanas de tratamiento con PRP en gel, semanales al inicio y, posteriormente, quincenales (figura 5.21A antes de tratamiento y figura 5.21B, después de tratamiento).



Figura 5.21 (A,B): Caso 3.

Caso 4. Mujer de 86 años con importante lipodermatoesclerosis que presenta una úlcera profunda muy dolorosa tras fracaso de injerto 2 años antes. A los 3 meses de tratamiento con PRP en gel, conseguimos la curación (figura 5.22A antes de tratamiento y figura 5.22B, después de tratamiento).



Figura 5.22(A,B): Caso 4.

Caso 5. Varón joven, con úlcera por presión en muñón supracondíleo en contexto de traumatismo continuado por roce con prótesis temporal. El cierre de la lesión tras tratamiento tras 3 meses y medio de tratamiento combinado con PRP intralesional y en gel, permitió la implantación de una prótesis definitiva (figura 5.23A antes de tratamiento y figura 5.23B, después de tratamiento).

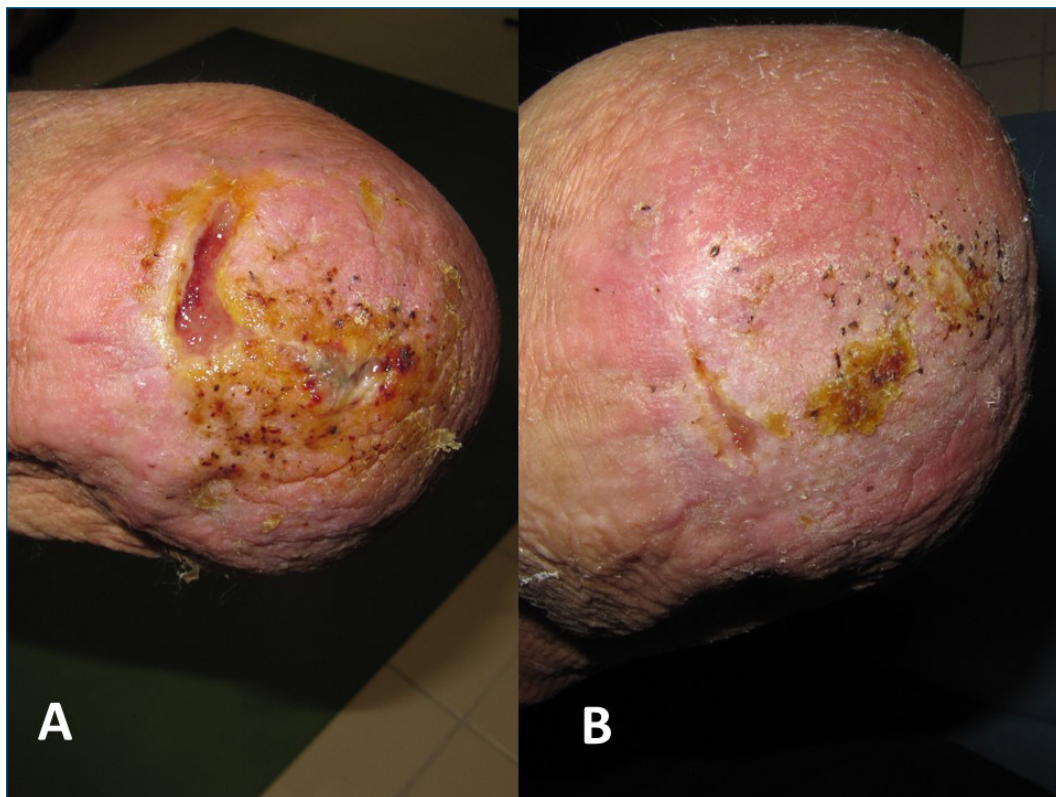


Figura 5.23(A,B): Caso 5.

Caso 6. Mujer con úlcera profunda plantar tras manipulación de hiperqueratosis traumática por podólogo. Conseguimos una reepitelización completa, con resolución de las molestias, tras 7 semanas de tratamiento, con aplicación de PRP combinada, tópica en gel e inyectado (figura 5.24A antes de tratamiento y figura 5.24B, después de tratamiento).

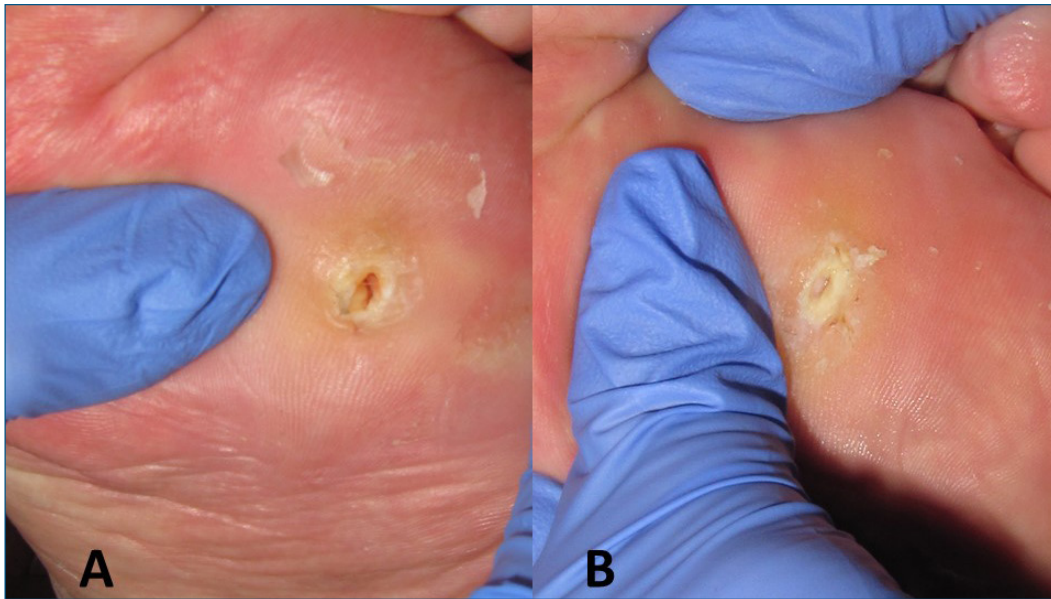


Figura 5.24 (A,B): Caso 6.

Caso 7. Varón con antecedente de síndrome de Werner, diabético, que presenta úlcera talar secundaria a traumatismo en talón derecho, de 2 años de evolución, con fracaso de injertos y colgajos. Conseguimos una importante reducción en extensión y profundidad, que permitió la realización de tratamiento con microinjertos, con la promoción de la epitelización (figura 5.25A antes de tratamiento, figura 5.25B tras las sesiones de PRP, figura 5.25C a los 6 meses de la colocación de los microinjertos).

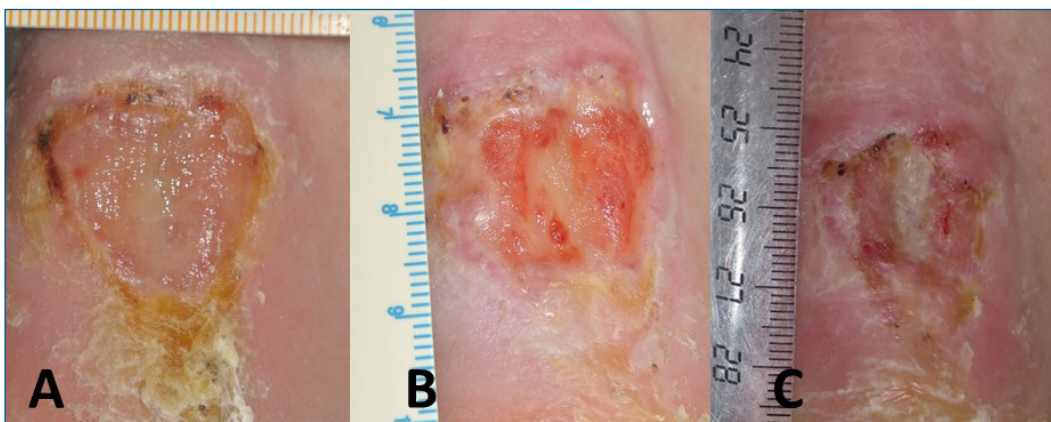


Figura 5.25(A,B,C): Caso 7.

Caso 8. Varón diabético, hipertenso, EPOC con oxígeno domiciliario, con arterioesclerosis e isquemia crónica grado I, que presenta una úlcera hipertensiva de Martorell en tercio proximal lateral de pierna derecha de un año de evolución (Figura 5.26A). Tras 7 sesiones semanales de PRP en gel conseguimos una disminución de profundidad significativa y un fondo con granulación roja (Figura 5.26B). Para promover la reepitelización, tras haber conseguido un lecho adecuado para facilitar el prendimiento, se colocan microinjertos (zona dadora: muslo). La reepitalización es completa a las 8 semanas, que persiste a los 6 meses (Figura 5.26C).



Figura 5.26(A,B,C): Caso 8.

Caso 9. Mujer de 67 años, que había sido diagnosticada de lepra y tratada adecuadamente 50 años antes, presentaba úlcera plantar de 1 año de evolución, con diferentes episodios de sobreinfección y ausencia de mejoría a pesar de uso de diferentes apósitos y dispositivos de descarga (Figura 5.27A). A la 6ª semana de tratamiento con PRP inyectado, observamos reepitelización completa (Figura 5.28A). En el seguimiento, un mes tras la suspensión del tratamiento, no había signos de recurrencia. Fue derivada nuevamente ocho me-

ses más tarde, y se incluyó de nuevo en el estudio, por 2 úlceras metatarsianas nuevas (2x1 y 1,3x 1 cm, respectivamente), que no habían respondido a tratamiento convencional durante los 6 meses previos (Figura 5.27B y 5.27C). La úlcera inicial continuaba reepitelizada. Tras el tratamiento semanal con PRP inyectado de estas dos nuevas lesiones, se consiguió su reepitelización completa en 12 semanas (Figura 5.28B).



Figura 5.27 (A,B,C): Caso 9.

Caso 10. Mujer de 73 años, diagnosticada y tratada de lepra adecuadamente 40 años antes, presentaba una úlcera profunda maleolar externa derecha de 15 años de evolución (Figura 5.29A). La úlcera (1,5x0,5 cm) se había tratado con diferentes apósitos, antibióticos e incluso con intervenciones quirúrgicas sin éxito. Tras el curetaje del anillo hiperqueratósico que rodeaba la úlcera,

se inició tratamiento con PRP. Tras 9 sesiones de tratamiento, se consiguió una práctica reepitelización completa (Figura 5.29B). A los 4 meses de seguimiento no se objetivó empeoramiento clínico.



Figura 5.28 (A,B): Caso 9.



Figura 5.29 (A,B): Caso 10.

Caso 11. Mujer de 76 años, con múltiples factores de riesgo cardiovascular, diagnosticada de pioderma gangrenoso de varios años de evolución, con mala respuesta a tratamiento inmunosupresor de primera línea (prednisona y ciclosporina a altas dosis), con posterior control con infliximab, que tuvo que suspenderse por descompensación de su insuficiencia cardíaca. Se mantenía sin signos de actividad, pero presentaba una extensa y profunda úlcera abdominal de cresta a cresta ilíaca, con evolución muy lenta con tratamiento convencional (Figura 5.30). Se inició tratamiento semanal con PRP en gel, con reepitelización completa tras 8 sesiones (Figura 5.31).



Figura 5.30: Caso 11.

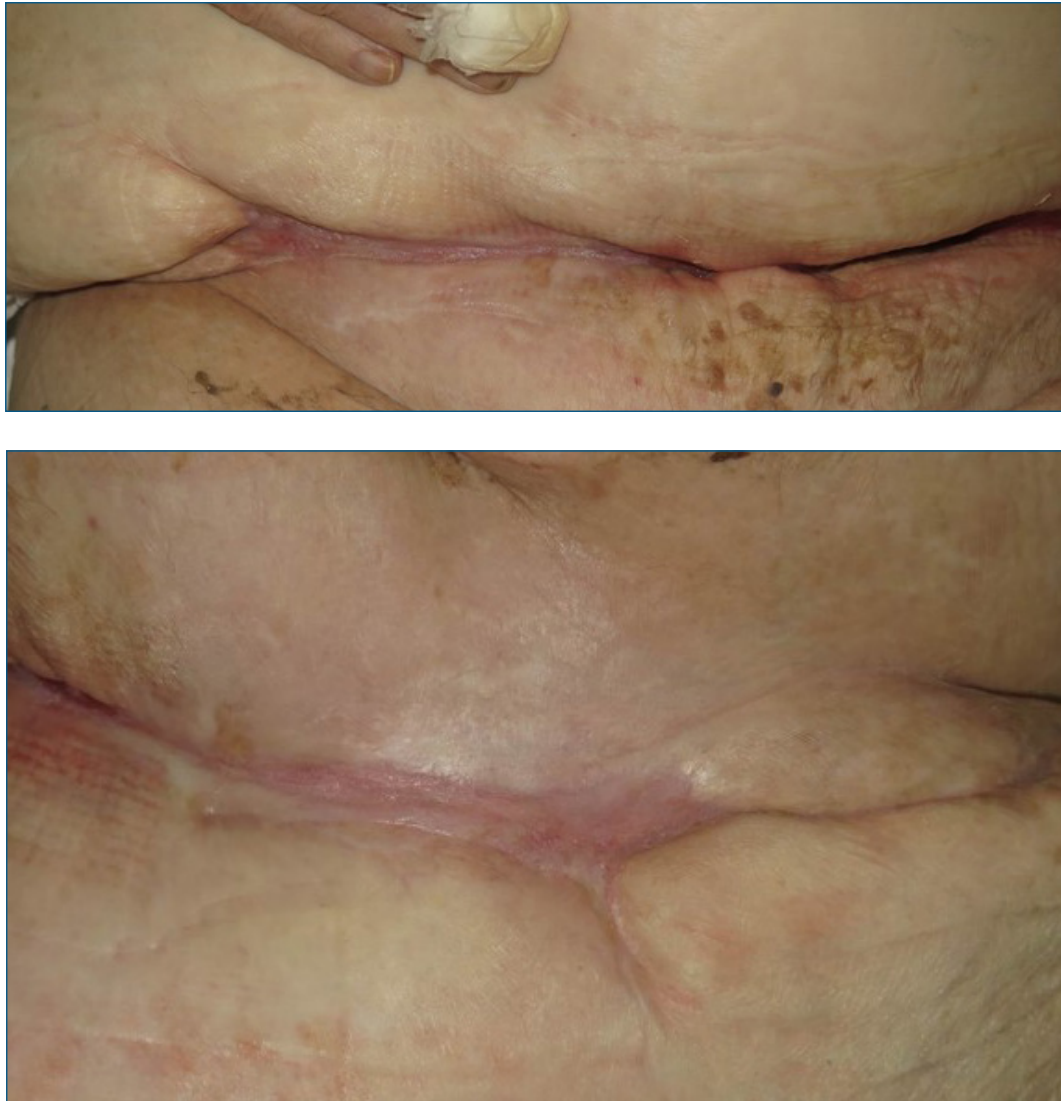


Figura 5.31: Caso 11.

En la tabla 5.6 se resume la experiencia. Se incluyeron 11 pacientes con 13 úlceras (10 mujeres y 3 hombres).

La mediana del tiempo de úlcera activa previa al tratamiento fue de 12 meses, con un rango entre 6 y 240 meses. La etiología venosa fue la más frecuente. Sólo 2 pacientes precisaron de la aplicación de microinjertos para conseguir la reepitelización completa.

	Sexo	Edad (años)	Localización Etiología	Evolución (años)	Frecuencia de sesiones	Vía de aplicación	Nº de sesiones	Respuesta	Episodios de sobra infección	Cumplimiento
1	Mujer	48	Supramaleolar, venosa	0,5	Semanal	Tópica	8	Cierre completo	0	100%
2	Mujer	80	Supramaleolar, venosa	3	Semanal	Tópica	8	Cierre completo	0	100%
3	Mujer	86	Pierna, venosa	2	Semanal/ quincenal	Tópica	7/7	En proceso de reepitelización	0	100%
4	Mujer	86	Pierna, postquirúrgica	2	Semanal	Tópica	13	Cierre completo	0	100%
5	Varón	45	Muñón subcondileo, presión	1	Semanal	Tópica e intralesional	15	Cierre completo	0	100%
6	Mujer	69	Planta, presión	1	Semanal	Intralesional	6	Cierre completo	0	100%
7	Varón	41	Talón, Síndrome de Werner	2	Semanal	Tópica e intralesional	13	Colocación de microinjertos	0	100%
8	Varón	77	Pierna, hipertensiva de Martorell	1	Semanal	Tópica	7	Colocación de microinjertos	0	100%
9	Mujer	67	Metatarsianas, neuropáticas 1 2 3	1 0,5 0,5	Semanal	Intralesional	9 12 12	Cierre completo de las 3 lesiones	0	100%
10	Mujer	74	Maléolo, neuropática	20	Semanal	Intralesional	9	Cierre prácticamente completo	0	100%
11	Mujer	76	Abdominal, pioderma gangrenoso	1	Semanal	Tópica	8	Cierre completo	0	100%

Tabla 5.6: Resumen descriptivo de los 11 pacientes tratados (13 úlceras). La paciente 3 recibió siete sesiones semanales y 7 sesiones quincenales (7/7 en el apartado "Nº de sesiones").

La mediana de sesiones realizadas fue de 9, con un rango de 6 a 15. Se obtuvo cicatrización completa en 10, reepitelización parcial en un caso y dos pacientes precisaron la aplicación de microinjertos, que prendieron de manera exitosa (Tabla 5.6).

En los pacientes que presentaban úlceras dolorosas, los pacientes referían verbalmente una disminución significativa del dolor, con una mayor funcionalidad.

La medición del impacto de nuestra intervención en la calidad de vida sólo pudo realizarse con los pacientes con capacidad para leer, escribir y entender los ítems del cuestionario DLQI (Pacientes 3, 10 y 11 excluidos). Con respecto al impacto de esta intervención en la calidad de vida de nuestros pacientes, la puntuación media pre-intervención fue de 15,6 (DT=8,2), y la puntuación media post-intervención de 2 (DT=4,2), siendo la diferencia entre ellas (13,6) estadísticamente significativa (prueba no paramétrica de Wilcoxon, $p < 0.01$) y superior a 3, diferencia mínima clínicamente importante que proponen diferentes estudios.¹³⁰ Ver Tabla 5.7.

No se registraron eventos adversos de ningún tipo relacionados con la aplicación del PRP. Destaca la buena respuesta en los pacientes de nuestra serie con ausencia de episodios de sobreinfección y elevado cumplimiento de los pacientes, que indica un alto grado de satisfacción. Nuestros resultados son equiparables e incluso, en algún caso, mejores a los descritos en la literatura con métodos comercializados.^{77,80}

Paciente	DLQI antes	DLQI después	Diferencia DLQI
1	28	0	28
2	10	2	8
3	-	-	-
4	22	0	22
5	20	0	20
6	6	0	6
7	23	13	10
8	12	1	11
9	4	0	4
10	-	-	-
11	-	-	-
Media	15,6	2	13,6
DT	8,2	4,2	8,06

Tabla 5.7: Calidad de vida medida por DLQI antes y después del tratamiento

VI. Discusión



Los objetivos que se plantearon al inicio de este trabajo estaban orientados, por un lado, a validar un nuevo sistema de obtención de plasma rico en plaquetas autólogo, ambulatorio, sencillo, económico y reproducible y, por otro, a determinar la utilidad clínica de su aplicación en úlceras cutáneas crónicas que no han respondido a tratamiento convencional.

La concentración de plaquetas obtenida en un preparado de PRP depende del método utilizado, de la fuerza, el tiempo y el número de centrifugaciones realizado. Esta concentración se calcula al dividir el recuento plaquetario final entre el basal. A pesar de que algunos autores señalan que para considerar adecuado un preparado de PRP, éste ha de concentrar las plaquetas 4 veces sobre su cantidad inicial⁶⁶, la mayoría de los autores no consiguen este incremento.^{41,123} Incluso, con algunos métodos que consiguen adecuadas cantidades, en algunos concentrados el número final de plaquetas obtenido es menor que el basal.¹³¹

A pesar de que la concentración de plaquetas conseguida con nuestro método es menor a las obtenidas con otras técnicas, la cantidad de factores de crecimiento es similar y, en algunos casos superior a los obtenidos por otros autores (tabla 6.1). Este resultado se podría explicar porque, mientras que otros autores realizan una doble centrifugación a velocidades elevadas, nosotros realizamos una única centrifugación a baja fuerza y durante poco tiempo. Consecuentemente, a pesar de concentrar un menor número de plaquetas, las obtenidas han sido sometidas a menor estrés y, por lo tanto, disminuye la probabilidad de su fragmentación o activación precoz. Por tanto, coincidimos con otros autores en que, más que el número de plaquetas conseguido, es importante su estado.¹²³

El trabajo de Mazzucco² apoya esta hipótesis. Analiza cuatro métodos de obtención de PRP, con diferentes anticoagulantes y métodos de gelificación. Entre los resultados destaca que no existe correlación entre la concentración de plaquetas obtenida con cada método y la cantidad de factores de crecimiento liberada. En nuestro trabajo hemos obtenido este mismo resultado. De hecho, hasta el momento actual no se ha mostrado una clara correlación entre el resultado clínico y la concentración de plaquetas, factores de crecimiento ni volumen de PRP aplicado por área tratada.

En teoría, varios factores podrían contribuir a esta ausencia de correlación. Entre ellos se encuentra el estrés que se induce en las plaquetas durante su manipulación, la variable susceptibilidad de las plaquetas al mismo o la formación de microagregados que impiden un adecuado recuento plaquetario. Además, no podemos olvidar la presencia de proteínas a las que se unen los factores de crecimiento (monómeros de fibrina, trombospondina) y que interfieren en su medición.²

Debido a que no se ha encontrado correlación entre mayores concentraciones de plaquetas y mayor número de factores de crecimiento liberados, actualmente se considera PRP a aquel preparado que contenga más plaquetas que la sangre basal.

Un punto sobre el que no hay acuerdo entre expertos es sobre la composición ideal del PRP.

Con respecto a la inclusión en el PRP de otros elementos celulares, a parte de las plaquetas, no hay consenso. Según Peñarrocha¹³², el coágulo

de PRP tendría un 4% de células rojas, un 95% de plaquetas y un 1% de leucocitos. Marx⁴¹ considera que las plaquetas que más recientemente se han sintetizado, y que por tanto son más grandes y tienen la mayor actividad, están mezcladas con el milímetro más superior de células rojas, por eso en sus preparados lo incluye, obteniendo su PRP un color rojizo. Sin embargo, otros autores como Anitua, proponen la obtención de un coágulo blanco, sin hematíes ni leucocitos, que pueden interferir en la eficacia de los preparados. Por otro lado, otros defienden que el PRP será el concentrado de plaquetas que está en el buffy coat, capa leuco-plaquetaria que se observa después de la centrifugación o de la sedimentación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos y es de color blanquecino.

Los glóbulos blancos son una fuente de factores de crecimiento, dado que los liberan y estimulan su liberación plaquetaria. Zimmermann y colaboradores¹³³ hallaron que la carga leucocitaria influye hasta en la mitad de la varianza de la concentración de factores de crecimiento en el PRP. Como observamos en la tabla comparativa de los diferentes métodos de obtención de PRP, los sistemas que producen PRP rico en leucocitos (GPS III, Magellan) obtienen concentraciones mayores de PDGF, VEGF, comparado con los que consiguen PRP pobre en leucocitos (Cascade). Dado que una comparativa de métodos interestudios es únicamente orientativa, no podemos sacar conclusiones con respecto a nuestro método. En la tabla sólo figuran las concentraciones de factores de crecimiento medidas tras la obtención del PRP con los diferentes métodos, ya que no en todos los trabajos se ha estudiado la cinética de liberación.

Otro efecto beneficioso del uso de concentrados de PRP con leucocitos sería su papel antibacteriano e inmunomodulador. Sin embargo, algunos

Método	Volumen sangre	Volumen PRP	Tiempo (min) y fuerza centrifugación (g)	Incremento en concentración plaquetas	Leucocitos (x10 ³)	Hematíes (x10 ⁶)	Activador	PDGF-bb (ng/ml)	TGF-β1 (ng/ml)	VEGF (ng/ml)	EGF (ng/ml)	IGF
Presente estudio, sin gel	10,5	3	6, 160	x1,59± 0,39	1,1± 1,1	0,02± 0,01	Cloruro cálcico	5,3± 2,1	5,6± 1,6	0,3± 0,2	0,83± 0,43	112± 80
Presente estudio, con gel	10,5	6 (3ml PRP + 3 ml gel)	6, 160	x1,59± 0,39	1,1± 1,1	0,02± 0,01	Cloruro cálcico	0,45± 0,3	15,7± 9,9	0,3± 0,2	6,5± 3,4	25± 30
Cascade, MTF	18	7,5	6, 1.100	x1,62± 0,1	1,1± 0,2	0,1± 0,1	Cloruro cálcico	14,8± 2,5	0,1± 0,08	0,3± 0,3	—	—
GPS III, Bio-med	55	6	15, 1.100	x2,07± 1,1	34,4± 13,6	1,5± 1,7	Calcio, trombina	23,1± 10,1	0,1± 0,08	2,4± 1,1	—	—
Maguellan, Arterocyte	26	6	17, 1.200	x2,8± 0,8	11,0± 8,2	0,5± 0,3	Calcio, trombina	33,0± 8,2	0,2± 0,1	1,2± 0,8	—	—
Fibrinet	7	1,2	1ª centrif: 10, 1100; 2ª centrif: 15, 1.500)	x3,9± 0,44	—	—	Cloruro cálcico	3,6± 2,4	8,8± 5,0	0,3± 0,3	1,4± 1,2	27± 11
Regen	8	5	10, 1.500	x1,65± 0,17	—	—	Calcio, trombina autóloga	2,3± 1,9	6,2± 4,0	0,1± 0,1	0,1± 0,1	36± 14
Plateltex	6	2	1º centrif: 10, 180; 2ª centrif: 10, 1.000)	x4,4± 0,36	—	—	Calcio, Batroxobina	14,3± 11,3	40,4± 14,9	0,7 ± 0,4	1,6± 0,7	88± 34

Tabla 6.1: Comparación de los concentrados obtenidos con diferentes métodos: resultados de nuestro estudio, Cascade, GPS III y Maguellan,¹³⁴ Fibrinet, Regen y Plateltex.² (No medido: -)

autores han planteado su posible efecto negativo sobre la regeneración tisular, por el potencial desencadenamiento de una respuesta inflamatoria.^{135,136}

Con nuestro método, se incluyen glóbulos blancos y un número muy bajo de eritrocitos (algunos autores señalan que pueden alterar la agregación plaquetaria). Evidentemente, el pipeteado que requiere nuestra técnica depende del manipulador. Sin embargo, al analizar los preparados obtenidos, podemos señalar que es fácilmente reproducible y no implica pérdida de precisión.

Cuando tratamos una lesión con PRP, la cantidad de factores de crecimiento biodisponibles dependen de su almacenamiento en las plaquetas como de su liberación al medio. Esta disponibilidad depende de la cinética de liberación de estos factores desde el gel. Diferentes estudios han mostrado los beneficios de lograr una liberación sostenida, como la promoción de la angiogénesis, que consiguen al añadir al PRP diferentes hidrogeles.⁷² Estos polímeros bioactivos pueden reforzar la acción de la malla de fibrina, con sus propiedades de absorción y liberación.

La medición de la liberación de factores de crecimiento en 3 momentos diferentes (a los 20 minutos, 60 minutos y 24 horas) se ha realizado con el objetivo de determinar la cinética de liberación de factores de crecimiento en el gel que hemos diseñado, comparándola con la que se obtendría sin su empleo. En los trabajos que estudian la cantidad de factores de crecimiento que se consigue con diferentes métodos de obtención de PRP, ésta se expresa por plaqueta o por unidad de volumen. Nuestras mediciones son por unidad de volumen, por lo que la comparación la realizamos con trabajos que emplean el mismo tipo de medida. Escasos trabajos analizan la cinética de liberación de factores de crecimiento

en el gel de PRP. Mazzucco y colaboradores² comparan cuatro métodos de obtención de gel de PRP y obtienen diferencias, por un lado método-dependientes y, por otro, factor-dependientes. Dado que cada técnica usa diferentes fuerzas de centrifugación y proteínas procoagulantes, los autores sugieren que parte de esta variabilidad se deba a la activación o daño plaquetario durante la manipulación, diferencias en la malla de fibrina inicial (su formación difiere si se emplea trombina o batroxobina) o a la cantidad de calcio (factores como PDGF-BB o EGF tienen una liberación activa calcio-dependiente). En nuestro estudio, dado que la fuerza de centrifugado y cantidad de cloruro cálcico añadido es la misma en las muestras de PRP con o sin gel, las diferencias en la liberación de factores de crecimiento no las podríamos asociar a esas variables. Dado que la mezcla con el polímero de hidroxietilcelulosa implica manipulación del PRP y que esta malla interactúa con las moléculas bioactivas de manera diferente a la fibrina, las diferencias encontradas en nuestro trabajo podrían explicarse por estas variables.

La concentración de IGF es superior en las muestras de PRP sin gel. En los trabajos en los que se compara la medición de IGF basal y en el concentrado de PRP, el resultado es que no varía.¹³⁷ Esto se explicaría porque IGF es una proteína que se encuentra en el plasma, no en forma de depósito plaquetario. Por lo tanto, por mucho que se concentren las plaquetas, no va a aumentar su cantidad. Para conseguir el PRP en gel con nuestro método, hemos de mezclar PRP y gel de HEC 1:1. Por lo tanto, para una misma cantidad de producto de PRP y PRP con gel, en este último habrá la mitad de plasma y, por tanto, menor cantidad de IGF.

Son llamativas las diferencias en la liberación de EGF, PDGF-BB y TGF entre las muestras con PRP aislado y aquellas en las que se ha añadido el gel.

La liberación de EGF y TGF en el gel es superior de manera estadísticamente significativa, y mayor que la descrita con muchos métodos comercializados. Al contrario, la concentración obtenida de PDGF-BB en el PRP aislado es claramente superior que en el gel. A pesar de que PDGF sea menor en el gel, este hallazgo indica que no es que se haya liberado antes y se haya perdido en la fracción pobre del plasma, sino que se encuentra retenido en el gel. De estos resultados deducimos que la estructura del gel interfiere en la liberación de estas proteínas de manera factor-dependiente.

Podríamos concluir que la gelificación con el polímero de hidroxietilcelulosa promueve la liberación de EGF y TGF en las primeras 24 horas en concentraciones más elevadas que los preparados de PRP solo, y una liberación de menor cantidad de PDGF-BB, que podría deberse a un atrapamiento con posterior liberación.

Sería interesante haber realizado más mediciones sucesivas en el tiempo para determinar si la liberación de estos factores, en las muestras en las que es más baja, se produce más adelante.

Como limitaciones de esta medición con ELISA hay que señalar que esta técnica se usa para cuantificar el contenido de factores de crecimiento sin probar su actividad biológica, por lo que no sirve para predecir su eficacia clínica.¹³⁸ La eficacia de los factores de crecimiento dependerá de la dosis, de la distribución espacial y de la secuencia temporal de los factores de crecimiento disponibles. Como podemos comprobar en la literatura, según el método utilizado, el contenido de factores de crecimiento puede variar considerablemente. Lo importante será ver si estas diferencias tienen repercusiones clínicas.

Otra limitación es que se trata de un modelo simplificado. Las mediciones se han realizado en tres momentos seleccionados según los determinados aleatoriamente en otros estudios². Las mediciones no se han hecho *in vivo* y no tenemos datos sobre las interacciones moleculares de nuestros preparados en el lecho de la herida. No podemos olvidar que el PRP en ese ambiente se comporta como una matriz que absorbe y libera sales, agua, proteínas y otras moléculas, y a la vez es destruida por enzimas proteolíticas y células fagocíticas.

Mediante microscopía electrónica hemos verificado la preservación de las características morfológicas indicadoras de actividad plaquetaria, por lo que comprobamos que las plaquetas no se fragmentan por su manipulación, y se mantienen íntegras hasta el momento de su utilización.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que con nuestro método obtenemos plaquetas viables y moléculas bioactivas funcionales en concentraciones adecuadas.

Con respecto a la utilidad clínica del uso de PRP en úlceras cutáneas crónicas, los resultados obtenidos son similares y, en algunos casos superiores a los descritos en la literatura con el uso de métodos comercializados.

A continuación detallamos los principales beneficios del gel desarrollado para la aplicación de PRP.

Se trata de un método de obtención de gel de PRP con material más económico y de manera más rápida y sencilla que muchas técnicas comercializadas. Además, con las características del gel de hidroxietilcelulosa descritas anteriormente, se optimizan las propiedades del PRP y, por tanto, el potencial

regenerativo del mismo. En el caso concreto del tratamiento de las úlceras cutáneas crónicas, el uso de este polímero evita la necesidad de emplear apósitos bioactivos, con la consiguiente disminución del gasto sanitario. Otro beneficio destacable de la adición del polímero al PRP es la obtención inmediata de una consistencia tipo gel. Los métodos comercializados consiguen esta consistencia con empleo de tiempo y medidas físicas, como la agitación o el calentamiento. Este consumo de tiempo para la preparación del producto, que evitamos con el uso de nuestro gel, dificulta el uso del producto en la práctica clínica habitual.

En comparación con otras concentraciones, el beneficio del gel de hidroxietilcelulosa al 5% se fundamenta en que permite la obtención de una consistencia gel inmediatamente tras la mezcla con el plasma rico en plaquetas en proporción 1:1. El uso de geles con porcentajes menores de hidroxietilcelulosa, precisan más tiempo y más cantidad de gel para conseguir la consistencia deseada con la misma cantidad de plasma. El interés de la formación rápida del gel final radica en que, dado que la degranulación de las plaquetas se produce en los primeros minutos tras la activación de las mismas, lo interesante es que ésta tenga lugar en el lecho de la herida. Por otro lado, para conseguir la aplicación de mayor principio activo, es interesante que por la misma cantidad de plasma, se precise la menor cantidad de polímero bioactivo.

La composición de la invención mantiene la "cura en ambiente húmedo", que se describe como esencial para la curación de estas lesiones. El gel diseñado forma una microcapa a modo de malla no oclusiva que permite la perspiración normal de la piel evitando los típicos fenómenos de congestión producida por otros tipos de geles hidrofílicos u oleosos (vaselinas), favorece la liberación sostenida de las moléculas bioactivas del PRP, no produce reacciones

de irritación ni interacciones químicas sobre la piel al ser no iónico y no depender del pH para su obtención.

A pesar de los prometedores resultados de diferentes series de casos y ensayos clínicos sobre el uso del PRP en úlceras cutáneas crónicas, el problema que está dificultando su extensión de uso es la ausencia de protocolización de empleo. Los métodos de obtención muy variables. No se ha determinado la frecuencia ni el modo de aplicación más eficaces. En relación a su aplicación en forma de gel, los métodos comercializados consiguen esta consistencia con empleo de tiempo y medidas físicas, como la agitación o el calentamiento. Este consumo de tiempo para la preparación del producto, que evitamos con el uso de nuestro gel, dificulta el uso del producto en la práctica clínica habitual. La mezcla de PRP con el polímero bioactivo que hemos diseñado representa una alternativa eficiente, fácilmente reproducible.

Los resultados que estamos obteniendo están siendo muy esperanzadores. Este procedimiento resulta ser no sólo más beneficioso para el paciente (con una reducción importante del tamaño de las lesiones y un consiguiente bienestar explícito por parte de nuestros pacientes), sino que supone un incremento de la productividad en el tratamiento de estas lesiones, así como un descenso de los costes (tanto directos como indirectos) asociados al mismo.

Para poder comparar nuestros resultados clínicos con los de otros estudios, decidimos definir como variable resultado principal la duración del tratamiento (número de sesiones necesarias) hasta reepitelización completa o aplicación de injerto.

En un metaanálisis reciente²⁷, en el que no hallaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo experimental y el control, la duración media de tratamiento fue de 12 semanas, con un rango de 8 a 40 semanas.

Sin embargo, series de casos y ensayos clínicos muestran resultados beneficiosos de la técnica. Burón y colaboradores⁶⁹ presentan una serie, similar a la nuestra, de 12 úlceras de etiologías diversas tratadas con PRP obtenido con técnica abierta manual, aplicado de manera combinada en gel e inyectado, en las que obtienen la curación en un rango de 4 a 12 semanas.

Entre los ensayos con resultados que favorecen al grupo de PRP, se encuentra el realizado por Anitua y colaboradores¹⁰⁰, en el que incluyeron 14 úlceras, predominantemente venosas y por presión. La superficie cicatrizada a las 8 semanas, fue significativamente superior en los pacientes tratados con PRP (72,94 +/- 22,25%) a la del grupo control (21,48 +/- 33,56%) ($P < 0,05$).

En nuestro trabajo, la mediana de sesiones realizadas, predominantemente semanales, fue de 9, con un rango de 6 a 15. De 13 úlceras tratadas, obtuvimos la cicatrización completa en 10, reepitelización parcial en un caso y dos pacientes precisaron la aplicación de microinjertos (injertos en sello), que prendieron de manera exitosa. El beneficio de la aplicación de PRP previa al cubrimiento con injerto se ha descrito en series cortas^{102,103}, pero tiene enorme interés predominantemente en heridas extensas de miembros inferiores.

Este contraste entre los hallazgos desfavorables de la revisión sistemática citada con la buena respuesta clínica recogida en múltiples trabajos podría

explicarse por la dificultad que entraña la realización un metaanálisis con estudios que aún utilizando el mismo producto, éste ha sido obtenido de manera diferente, se ha aplicado en pacientes que no comparten criterios de inclusión y no existe uniformidad de las variables resultado medidas.

Con respecto a la llamativa disminución del dolor y la mejoría en la calidad de vida que hemos evidenciado en nuestro estudio, sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura que recoja estas variables resultado como medida de la utilidad del PRP en úlceras cutáneas crónicas¹³⁹. En un trabajo previo⁸⁷ se observó una disminución estadísticamente significativa en la cantidad de analgésicos intravenosos necesitados por los pacientes sometidos a esta terapia. Este efecto analgésico también se ha evidenciado en la aplicación de PRP en traumatología.¹⁴⁰ Asfaha y colaboradores,¹⁴¹ mediante estudios *in vitro*, han relacionado este efecto analgésico con la vía de PAR4 (receptor activado por proteinasas 4). Dado que el dolor es uno de los principales factores de impacto en la calidad de vida de los pacientes con úlceras cutáneas crónicas, sería interesante determinar el potencial papel del PRP en esta sintomatología.

A pesar de la importante limitación que implica el pequeño tamaño de nuestra serie de pacientes tratados, la heterogeneidad de las heridas incluidas y la ausencia de un grupo control, dado que todos los pacientes habían sido tratados previamente con tratamiento convencional adecuado sin mejoría, los resultados podrían interpretarse como si fuera un estudio cruzado, en el que cada paciente es su propio control.

Hay que tener en cuenta que el tiempo de seguimiento tras la curación ha variado entre los pacientes, desde semanas a meses, ya que se ha limitado

al período del estudio. Un seguimiento a largo plazo habría permitido determinar el porcentaje de recidiva de las lesiones.

Es fundamental la realización de ensayos clínicos bien diseñados para establecer unas claras indicaciones de uso, con protocolos sobre los modos de obtención y aplicación más adecuados.

La Medicina Regenerativa en las úlceras cutáneas es un campo en continua innovación, con el objetivo de proporcionar los elementos necesarios para reemplazar tejidos y órganos dañados, estimulando además la capacidad regenerativa intrínseca del organismo.^{25,142}

Se esperan grandes avances en este campo en los próximos años, principalmente debido a las potenciales propiedades regenerativas de las células madre embrionarias y adultas, y más recientemente de las células madre pluripotentes inducidas. Los estudios muestran el potencial beneficio del uso combinado de células madre con el PRP en el tratamiento de lesiones de origen mesenquimal, como tejidos blandos, hueso, cartílago o tendón.¹⁴³



VII. Conclusiones



CONCLUSIONES

1. El sistema de obtención de plasma rico en plaquetas propuesto es autólogo, ambulatorio, sencillo, económico y reproducible.
2. El método presentado obtiene una concentración de plaquetas superior a la basal. La cantidad de factores de crecimiento liberados no se correlaciona con la concentración de plaquetas.
3. Las diferencias entre la cinética de liberación de factores de crecimiento en PRP con gel de hidroxietilcelulosa y la del PRP sin añadir el polímero bioactivo es factor dependiente.
4. Al no haber diferencias significativas en los hallazgos de microscopía electrónica entre los diferentes preparados (sangre total, PRP y PRP gel), se puede concluir que la técnica de obtención y gelificación de PRP preserva la integridad de las plaquetas y no induce una activación precoz de las mismas.
5. Este método de obtención y aplicación de PRP representa una alternativa de tratamiento eficaz para el manejo de úlceras crónicas que no responden a tratamiento convencional, tanto de manera aislada como en combinación con otras técnicas regeneradoras.
6. Para establecer unas claras indicaciones de uso y extender su empleo en la práctica clínica habitual, se precisan ensayos clínicos bien diseñados que apoyen su utilidad.

CONCLUSIONS

1. Le système d'obtention de plasma riche en plaquettes que l'on propose est autologue, ambulatoire, simple, bon marché et reproductible.
2. La méthode que l'on présente obtient une concentration de plaquettes supérieure à celle de base. Il n'existe pas de corrélation entre la concentration de plaquettes et la quantité de facteurs de croissance libérés.
3. Les différences entre la cinétique de libération de facteurs de croissance dans le gel d'hydroxyéthylcellulose et celle dans le PRP sans ajouter le polymère bioactive est facteur-dépendant.
4. Étant donné qu'il n'y a pas de différences entre les découvertes de microscopie électronique des différentes préparations (sang complet, PRP et gel de PRP), on peut en conclure que la technique d'obtention et gélification préserve l'intégrité plaquettaire et n'induit pas une activation précoce.
5. Cette méthode d'obtention et application de PRP constitue une alternative de traitement efficace pour les plaies chroniques qui ne répondent aux soins conventionnels, soit de manière isolée ou en combinaison avec d'autres techniques
6. Pour établir des instructions d'utilisation claires et étendre son utilisation dans la pratique clinique habituelle, on a besoin d'essais cliniques bien conçus afin de soutenir l'intérêt de ce traitement.

VIII. Bibliografía



- ¹ **Anitua E.** *Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants.* Int J Oral Maxillofac Implants 1999;14 (4):529-35.
- ² **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.
- ³ **Kaux JF, Le Goff C, Seidel L, Péters P, Gothot A, Albert A, et al.** *Comparative study of five techniques of preparation of platelet-rich plasma.* Pathol Biol 2011; 59(3):157-60.
- ⁴ **Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, et al.** *Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons.* Am J Sports Med 2012; 40(6):1274-81.
- ⁵ **Nakajima Y, Kawase T, Kobayashi M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H.** *Bioactivity of freeze-dried platelet-rich plasma in an adsorbed form on a biodegradable polymer material.* Platelets 2012;23(8):594-603.
- ⁶ **Rossi S, Faccendini A, Bonferoni MC, Ferrari F, Sandri G, Del Fante C et al.** *"Sponge-like" dressings based on biopolymers for the delivery of platelet lysate to skin chronic wounds.* Int J Pharm 2013;440(2):207-15.
- ⁷ *Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas, publicado el 23 de mayo de 2013. (Informe/V1/23052013).*
- ⁸ **Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, Expósito JA, Bolívar I, Rodríguez L, et al.** *Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds.* Cochrane Database Syst Rev 2012 Oct 17;10:CD006899.
- ⁹ **Caramella CM, Sandri G, Rossi S, Mori M, Cristina Bonferoni M, Ferrari F, et al.** *New therapeutic platforms for the treatment of epithelial and cutaneous lesions.* Curr Drug Deliv 2013;10(1):18-31.

- ¹⁰ **Izadi K, Ganchi P.** *Chronic wounds.* Clin Plast Surg 2005;32:209–22.
- ¹¹ **Leeper DJ, Durani P.** *Topical antimicrobial therapy of chronic wounds healing by secondary intention using iodine products.* Int Wound J 2008;5:361–8.
- ¹² **Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P.** *Wound healing in the 21st century.* J Am Acad Dermatol 2010;63:866–8.
- ¹³ **Phillips T.** *Ulcers.* In Bolognia JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editor. *Dermatology.* 2nd edition, London, Mosby, 2008, p. 1598.
- ¹⁴ **Mustoe TA, Gurjala A.** *The role of the epidermis and the mechanism of action of occlusive dressings in scarring.* Wound Repair Regen 2011;19 (Suppl 1):s16-21.
- ¹⁵ **Spilsbury K, Nelson A, Cullum N, Iglesias C, Nixon J, Mason S.** *Pressure ulcers and their treatment and effects on quality of life: hospital inpatient perspectives.* J Adv Nurs 2007;57:494-504.
- ¹⁶ **Torra JE, Soldevilla JJ, Rueda J, Verdú J, Roche E, Arboix Met al.** *Primer estudio nacional de prevalencia de úlceras de pierna en España.* Estudio GNEAUPP-UIFC-Smith . Gerokomos 2004;15(4):11-4.
- ¹⁷ **Velasco M.** *Aspectos diagnósticos y terapéuticos de las úlceras de las piernas.* Actas Dermosifiliogr 2011; 102:780-90.
- ¹⁸ **Sánchez M, Andia I, Anitua E, Sánchez P.** *Platelet Rich Plasma (PRP) Biotechnology: Concepts and Therapeutic Applications in Orthopedics and Sports Medicine.* Agbo EC ed. *Innovations in Biotechnology.* In Techs 2012;Feb:113-38.
- ¹⁹ **Moore Z, Butcher G, Corbett LQ, McGuinness W, Snyder RJ, van Acker K.** *AAWC, AWMA, EWMA Position Paper: Managing Wounds as a team.* J Wound Care 2014;23(5 Suppl.):S1-S38.

- ²⁰ **Flanagan M.** *Principles of wound management. En: Flanagan M (ed) Wound Healing and Skin Integrity.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.p 66-86.
- ²¹ **Brölmann FE, Ubbink DT, Nelson EA, Munte AK, van der Horst CMAM, Vermeulen H.** *Evidence-based decisions for local and systemic wound care.* Br J Surg 2012; 99:1172–83.
- ²² **Winter GD.** *Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig.* Nature 1962;193:293-4.
- ²³ **Skórkowska-Telichowska K, Czemplik M, Kulma A, Szopa J.** *The local treatment and available dressings designed for chronic wounds.* J Am Acad Dermatol 2013;68(4):e117-26.
- ²⁴ **Moreno-Giménez JC, Galán-Gutiérrez M, Jiménez-Puy R.** *Tratamiento de las úlceras crónicas.* Actas Dermosifiliogr 2005;96:133-46.
- ²⁵ **Martínez-Santamaría L, Guerrero-Aspizua S, Del Río M.** *Bioingeniería cutánea: aplicaciones preclínicas y clínicas.* Actas Dermosifiliogr 2012;103:5-11.
- ²⁶ **Fuchs E.** *Skin stem cells: rising to the surface.* J Cell Biol 2008;180:273-84.
- ²⁷ **Jones JE1, Nelson EA, Al-Hity A.** *Skin grafting for venous leg ulcers.* Cochrane Database Syst Rev 2013 Jan 31;1:CD001737.
- ²⁸ **Wiemann TJ, Smiell JM, Su Y.** *Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study.* Diabetes Care 1998;21:822-7.
- ²⁹ **Berlanga-Acosta J1, Gavilondo-Cowley J, López-Saura P, González-López T, Castro-Santana MD, López-Mola E, et al.** *Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications.* Int Wound J 2009;6:331-46.

- ³⁰ **Tiaka EK, Papanas N, Manolakis AC, Georgiadis GS.** *Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update.* *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther* 2012;24(1):37-44.
- ³¹ **Cieslik-Bielecka A, Choukroun J, Odin G, Dohan Ehrenfest DM.** *L-PRP/L-PRF in esthetic plastic surgery, regenerative medicine of the skin and chronic wounds.* *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(7):1266-77.
- ³² **Pietramaggiore G, Kaipainen A, Czczuga 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.
- ³³ **Akingboye AA, Giddins S, Gamston P, Tucker A, Navsaria H, Kyriakides C.** *Application of autologous derived-platelet rich plasma gel in the treatment of chronic wound ulcer: diabetic foot ulcer.* *J Extra Corpor Technol* 2010;42(1):20-9.
- ³⁴ **Lacci KM, Dardik A.** *Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing.* *Yale J Biol Med* 2010;83(1):1-9.
- ³⁵ **Villela DL, Santos VL.** *Evidence on the use of platelet-rich plasma for diabetic ulcer: a systematic review.* *Growth Factors* 2010;28(2):111-6.
- ³⁶ **Salcido RS.** *Autologous platelet-rich plasma in chronic wounds.* *Adv Skin Wound Care* 2013;26(6):24-8.
- ³⁷ **Whiteheart SW.** *Platelet granules: surprise packages.* *Blood* 2011;118(5):1190-91.
- ³⁸ **Martínez-Gonzalez JM, Cano-Sanchez J, Gonzalo-Lafuente JC, Campo-Trape-ro J, Esparza-Gomez G, Seoane J.** *Do ambulatory-use Platelet-Rich Plasma (PRP) concentrates present risks?* *Med Oral* 2002;7(5):375-90.
- ³⁹ **Greenhalgh DG.** *The role of growth factors in wound healing.* *J Trauma* 1996; 41(1):159-67.

- ⁴⁰ **Bennet NT, Schultz GS.** *Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing.* Am J Surg 1993;166:74-8.
- ⁴¹ **Marx RE.** *Platelet-rich plasma: evidence to support its use.* J Oral Maxillofac Surg 2004;62:489-96.
- ⁴² **Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR.** *Platelet rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:638-46.
- ⁴³ **Grageda E.** *Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol.* Implant Dent 2004;13(4):301-9.
- ⁴⁴ **Pierce GF, Mustoe T, Ligelbach J, Masakowski G.** *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta: enhance tissue repair activities by unique mechanisms.* J Cell Biol 1989; 109: 429-40.
- ⁴⁵ **Arnás M, Ballester JF, Molinos JR, Álvarez A.** *Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual.* Rev Esp Odontoestomat Implant 2002; 10(4):202-8.
- ⁴⁶ **Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT.** *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration.* Thromb Haemost 2004;91(1):4-15.
- ⁴⁷ **Wroblewski AP, Melia HJ, Wright VJ.** *Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair.* Oper Tech Orthop 2010; 20:98-105.
- ⁴⁸ **Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I.** *Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study.* Int Wound J 2011;8(3):307-12.
- ⁴⁹ **Krasna M, Domanovi D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M.** *Platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro.* Acta Dermatovenerol Alp Paenonica Adriat 2007;16(3):105-10.

- ⁵⁰ **Molina-Miñano F, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Vicente-Ortega V.** *The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits.* Int Wound J 2009;6(2):145-8.
- ⁵¹ **Lozano ML.** *Fisiología de la hemostasia.* En: Moraleda JM, editor. Pregrado de Hematología. 3ª ed. Madrid: Luzán 5, S.A.; 2011. p. 517-35.
- ⁵² **Roy S, Driggs J, Elgharably H, Biswas S, Findley M, Khanna S, et al.** *Platelet-rich fibrin matrix improves wound angiogenesis via inducing endothelial cell proliferation.* Wound Repair Regen 2011;19(6):753-66.
- ⁵³ **Lubkowska A, Dolegowska B, Banfi G.** *Growth factor content in PRP and their applicability in medicine.* J Biol Regul Homeost Agents 2012;26(2 Suppl 1):3S-22S.
- ⁵⁴ **Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G.** *Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation.* Oper Tech Orthop 2012; 22(1):25-32.
- ⁵⁵ **Lundquist R, Holmstrøm K, Clausen C, Jørgensen B, Karlsmark T.** *Characteristics of an autologous leukocyte and platelet-rich fibrin patch intended for the treatment of recalcitrant wounds.* Wound Repair Regen 2013;21(1):66-76.
- ⁵⁶ **Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G.** *Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains.* Clin Exp Dermatol 2012;37(6):652-7.
- ⁵⁷ **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.
- ⁵⁸ **Edelblute CM1, Donate AL, Hargrave BY, Heller LC.** *Human platelet gel supernatant inactivates opportunistic wound pathogens on skin.* Platelets 2015;26(1):13-6.

- ⁵⁹ **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.
- ⁶⁰ **Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, Rutkowski JL.** *Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice.* J Oral Implantol 2014;40(4):500-10.
- ⁶¹ **Kimura A, Ogata H, Yazawa M, Watanabe N, Mori T, Nakajima T.** *The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats.* J Dermatol Sci 2005;40(3):205-8.
- ⁶² **Demidova-Rice TN, Wolf L, Deckenback J, Hamblin MR, Herman IM.** *Human platelet-rich plasma- and extracellular matrix-derived peptides promote impaired cutaneous wound healing in vivo.* PLoS One 2012;7(2):e32146.
- ⁶³ **Moroz A, Deffune E.** *Platelet-rich plasma and chronic wounds: remaining fibronectin may influence matrix remodeling and regeneration success.* Cytother. 2013;15(11):1436-9.
- ⁶⁴ **Kim SA, Ryu HW, Lee KS, Cho JW.** *Application of platelet-rich plasma accelerates the wound healing process in acute and chronic ulcers through rapid migration and upregulation of cyclin A and CDK4 in HaCaT cells.* Mol Med Rep 2013;7(2):476-80.
- ⁶⁵ **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 2014;29(4):248-54.
- ⁶⁶ **Marx R, Meltzer A.** *Donde no hay hueso no hay implantes.* Rev Esp Odontostomat Implant 2000; 8(1):32-3.
- ⁶⁷ **Wasterlain AS, Braun HJ, Dragoo JL.** *Contents and Formulations of Platelet-Rich Plasma.* Oper Tech Orthop 2012;22:33-42.

- ⁶⁸ Conde-Montero E, Horcajada-Reales C, Clavo P, Delgado-Sillero I, Suárez-Fernández R. *Neuropathic ulcers in leprosy treated with intralesional platelet-rich plasma*. *Int Wound J* 2014. En prensa.
- ⁶⁹ Burón Alvarez I, Fernández-Tresguerres A, Calvo M, Alfageme F, Villegas C, Fernández R. *Tratamiento de úlceras cutáneas crónicas con plasma autólogo rico en plaquetas*. *Piel* 2012;27:429-34.
- ⁷⁰ Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. *Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria*. *J Oral Implants* 2014;40(4):511-21.
- ⁷¹ La WG, Yang HS. *Heparin-Conjugated Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Nanospheres Enhance Large-Wound Healing by Delivering Growth Factors in Platelet-Rich Plasma*. *Artif Organs* 2015;39(4):388–94.
- ⁷² Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Sakamoto M, Liem PH, et al. *Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model*. *J Artif Organs* 2015;18(1):64-71.
- ⁷³ Evangelista V. *Semi-synthetic platelet gel and method for the preparation thereof*. U.S. Cl. 424/93.72. Pub data. 26 Jun 2006. 7p.
- ⁷⁴ Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. *Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF)*. *Ann Surg* 1986; 204(3):322-30.
- ⁷⁵ Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. *Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula*. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170(1):56–60.
- ⁷⁶ Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R. *Platelet-Rich Plasma: Applications in Dermatology*. *Actas Dermosifiliogr* 2015;106(2):104-11.

- ⁷⁷ **Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, et al.** *Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds.* *Transfus Apher Sci* 2004;30(2):145-51.
- ⁷⁸ **Ficarelli E et al.** *Treatment of chronic venous leg ulcers by platelet gel.* *Dermatologic Therapy* 2008;21:S13–S17.
- ⁷⁹ **Bernuzzi G, Tardito S, Bussolati O, Adorni D, Cantarelli S, Fagnoni F, et al.** *Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma.* *Blood Transfus* 2010;8(4):237-47.
- ⁸⁰ **Frykberg RG, Driver VR, Carman D, Lucero B, Borris-Hale C, Fylling CP, et al.** *Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: a prospective case series.* *Ostomy Wound Manage* 2010;56(6):36-44.
- ⁸¹ **Jeong KH, Shin MK, Kim NI.** *Refractory lipodermatosclerosis treated with intraleisional platelet-rich plasma.* *J Am Acad Dermatol* 2011;65(5):e157-8.
- ⁸² **Sell SA, Ericksen JJ, Reis TW, Droste LR, Bhuiyan MB, Gater DR.** *A case report on the use of sustained release platelet-rich plasma for the treatment of chronic pressure ulcers.* *J Spinal Cord Med* 2011;34(1):122-7.
- ⁸³ **Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, García-Martínez O, Díaz-Rodríguez L, Ruiz C.** *Use of platelet-rich plasma to treat pressure ulcers: a case study.* *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2013;40(2):198-202.
- ⁸⁴ **Sarvajnamurthy S, Suryanarayan S, Budamakuntala L, Suresh DH.** *Autologous platelet rich plasma in chronic venous ulcers: study of 17 cases.* *J Cutan Aesthet Surg* 2013;6(2):97-9.
- ⁸⁵ **Kanemaru H1, Kajihara I, Yamanaka K, Igata T, Makino T, Masuguchi S, et al.** *Platelet-rich plasma therapy is effective for the treatment of refractory skin ulcers in patients with systemic sclerosis.* *Mod Rheumatol* 2014;16:1-2.

- ⁸⁶ Singh R, Rohilla RK, Dhayal RK, Sen R, Sehgal PK. *Role of local application of autologous platelet-rich plasma in the management of pressure ulcers in spinal cord injury patients.* Spinal Cord 2014;52(11):809-16.
- ⁸⁷ Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. *Use of platelet rich plasma gel on wound healing: A systematic review and meta-analysis.* J Plast Surg. 2011; 11:382-410.
- ⁸⁸ Carter MJ, Fylling CP, Li WW, de Leon J, Driver VR, Serena TE, et al. *Analysis of run-in and treatment data in a wound outcomes registry: clinical impact of topical platelet-rich plasma gel on healing trajectory.* Int Wound J 2011;8(6):638-50.
- ⁸⁹ Sakata J, Sasaki S, Handa K, Uchino T, Sasaki T, Higashita R, et al. *A retrospective, longitudinal study to evaluate healing lower extremity wounds in patients with diabetes mellitus and ischemia using standard protocols of care and platelet-rich plasma gel in a Japanese wound care program.* Ost Wound Manage 2012;58(4):36-49.
- ⁹⁰ de Leon JM, Driver VR, Fylling CP, Carter MJ, Anderson C, Wilson J, et al. *The clinical relevance of treating chronic wounds with an enhanced near-physiological concentration of platelet-rich plasma gel.* Adv Skin Wound Care 2011;24(8):357-68.
- ⁹¹ Jørgensen B, Karlsmark T, Vogensen H, Haase L, Lundquist R. *A pilot study to evaluate the safety and clinical performance of Leucopatch, an autologous, additive-free, platelet-rich fibrin for the treatment of recalcitrant chronic wounds.* Int J Low Extrem Wounds 2011;10(4):218-23.
- ⁹² Dionyssiou D, Demiri E, Foroglou P, Cheva A, Saratzis N, Aivazidis C, et al. *The effectiveness of intralesional injection of platelet-rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers: an experimental and clinical study.* Int Wound J 2013;10(4):397-406.
- ⁹³ Wanden-Berghe C, Granell L, Giménez JL, De Dios Praes J, Muñoz-Puller P, Cases C, et al. *Autologous growth factors in the treatment of chronic wounds.* Rev Enferm 2014;37(5):51-4.

- ⁹⁴ **Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH.** *A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report.* J Vasc Surg 1991;14(4):526–32.
- ⁹⁵ **Stacey MC, Mata SD, Trengove NJ, Mather CA.** *Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing.* Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;20(3): 296–301.
- ⁹⁶ **Senet P, Bon FX, Benbunan M, Bussel A, Traineau R, Calvo F.** *Randomized trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers.* J Vasc Surg 2003;38(6):1342–8.
- ⁹⁷ **Weed B, Davis MDP, Felty CL, Liedl DA, Pineda AA, Moore SB, et al.** *Autologous platelet lysate product versus placebo in patients with chronic leg ulcerations: a pilot study using a randomized, double-blind, placebo controlled trial.* Wounds 2004;16(9):273–82.
- ⁹⁸ **Driver VR, Hanft J, Fylling CP, Beriou JM; Autologel Diabetic Foot Ulcer Study Group.** *A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers.* Ost Wound Manage 2006;52(6):68-70, 72, 74 passim.
- ⁹⁹ **Kakagia D, Kazakos K, Xarchas K, Karanikas M, Georgiadis G, Tripsiannis G, et al.** *Synergistic action of proteasemodulating matrix and autologous growth factors in healing diabetic foot ulcers. A prospective randomized trial.* J Diabetes Complications 2007;21(6):387–91.
- ¹⁰⁰ **Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al.** *Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2008;84(2):415-21.
- ¹⁰¹ **Planinsek Rucigaj T, Lunder T.** *Stimulation of venous leg ulcers with thrombocytic growth factors: A randomised study.* 17th Conference of the European Wound Management Association; Glasgow, Scotland; 2-4 May, 2007:62 Abstract No.93.

- ¹⁰² **Chen TM, Tsai JC, Burnouf T.** *A novel technique combining platelet gel, skin graft, and fibrin glue for healing recalcitrant lower extremity ulcers.* *Dermatol Surg* 2010;36(4):453-60.
- ¹⁰³ **Sano H, Ichioka S, Minamimura A, Tanaka R, Ikebuchi K, Suzuki M.** *Treatment of chronic ulcer with elastic plasma protein and platelet film for wound dressing.* *J Plast Surg Hand Surg* 2013;47(6):462-6.
- ¹⁰⁴ **Tzeng YS, Deng SC, Wang CH, Tsai JC, Chen TM, Burnouf T.** *Treatment of non-healing diabetic lower extremity ulcers with skin graft and autologous platelet gel: a case series.* *BioMed Research International* 2013. ID 837620.
- ¹⁰⁵ **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.
- ¹⁰⁶ **Kim DH, Je YJ, Kim CD, Lee YH, Seo YJ, Lee JH, et al.** *Can Platelet-rich Plasma Be Used for Skin Rejuvenation? Evaluation of Effects of Platelet-rich Plasma on Human Dermal Fibroblast.* *Ann Dermatol* 2011;23:424-31.
- ¹⁰⁷ **Park HB, Yang JH, Chung KH.** *Characterization of the cytokine profile of platelet rich plasma (PRP) and PRP-induced cell proliferation and migration: Upregulation of matrix metalloproteinase-1 and-9 in HaCaT cells.* *Korean J Hematol* 2011;46:265-73.
- ¹⁰⁸ **Shin MK, Lee JW, Kim YI, Kim YO, Seok H, Kim NI.** *The effects of platelet-rich clot releasate on the expression of MMP-1 and type I collagen in human adult dermal fibroblasts: PRP is a stronger MMP-1 stimulator.* *Mol Biol Rep* 2014;41(1):3-8.
- ¹⁰⁹ **Redaelli A, Romano D, Marcianó A.** *Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients.* *J Drugs Dermatol* 2010;9:466-72.
- ¹¹⁰ **Anitua E, Sánchez M, Sarabia R, Sanz J, Aguirre JJ, Orive G.** *Eficacia y seguridad del PRGF® (plasma rico en factores de crecimiento) en la regeneración cutánea*

- facial*. Ensayo clínico, randomizado y controlado con ácido hialurónico. Rev AE-CEP 2011; Feb:23-33.
- ¹¹¹ **Na JI, Choi JW, Choi HR, Jeong JB, Park KC, Youn SW, et al.** *Rapid Healing and Reduced Erythema after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing Combined with the Application of Autologous Platelet Rich Plasma*. Dermatol Surg 2011;37:4 -8.
- ¹¹² **Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, et al.** *Application of platelet-rich plasma to fat grafting during plastic surgical procedures: clinical and in vitro evaluation*. Tissue Eng Part C Methods 2009;15:625–34.
- ¹¹³ **Rodríguez-Flores J, Palomar-Gallego MA, Enguita-Valls AB, Rodríguez-Peralto JL, Torres J.** *Influence of Platelet-Rich Plasma on the Histologic Characteristics of the Autologous Fat Graft to the Upper Lip of Rabbits*. Aesth Plast Surg 2011;35:480–6.
- ¹¹⁴ **Price VH.** *Treatment of hair loss*. N Engl J Med 1999;341:964–73.
- ¹¹⁵ **Uebel CO, da Silva JB, Cantarelli D et al.** *The role of platelet plasma growth factors in male pattern baldness surgery*. Plast Reconstr Surg 2006; 118: 1458-66.
- ¹¹⁶ **Li ZJ, Choi HI, Choi DK et al.** *Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth*. Dermatol Surg 2012;38:1040-6.
- ¹¹⁷ **Kang JS, Zheng Z, Choi MJ, Lee SH, Kim DY, Cho SB.** *The effect of CD34+ cell-containing autologous platelet-rich plasma injection on pattern hair loss: a preliminary study*. J Eur Acad Dermatol Venereol 2014;28(1):72-9.
- ¹¹⁸ **Trink A, Sorbellini E, Bezzola P, Rodella L, Rezzani R, Ramot Y, et al.** *A randomized, double-blind, placebo and active-controlled, half-head study to evaluate the effects of platelet rich plasma on alopecia areata*. Br J Dermatol 2013;169(3):690-4.
- ¹¹⁹ **Findikcioglu F, Findikcioglu K, Yavuzer R, Lortlar N, Atabay K.** *Effect of preope-*

rative subcutaneous platelet-rich plasma and fibrin glue application on skin flap survival. *Aesthetic Plast Surg* 2012;36(5):1246-53.

- ¹²⁰ **Lee JW, Kim BJ, Kim MN, Mun SK.** *The efficacy of autologous platelet rich plasma combined with ablative carbon dioxide fractional resurfacing for acne scars: a simultaneous split-face trial.* *Dermatol Surg* 2011;37:931-8.
- ¹²¹ **Nicoli F, Balzani A, Lazzeri D, Gentile P, Chilgar RM, Di Pasquali C, et al.** *Severe hidradenitis suppurativa treatment using platelet-rich plasma gel and Hyalomatrix.* *Int Wound J* 2013. En prensa.
- ¹²² **Iervolino V, Di Costanzo G, Azzaro R, Diodato AM, Di Macchia CA, Di Meo T, et al.** *Platelet gel in cutaneous radiation dermatitis.* *Sup Care Cancer* 2013;21(1):287-93.
- ¹²³ **Lorente Pérez-Sierra A.** *Estudio de microscopía electrónica y cuantificación de los factores de crecimiento mediante un nuevo procedimiento de obtención de plasma rico en plaquetas.* Tesis doctoral. 2010. Universidad Complutense de Madrid.
- ¹²⁴ **FDA Wound Healing Clinical Focus Group.** *Guidance for Industry: Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds.- Developing Products for Treatment.* *Wound Repair Regen* 2001;9(4):258-68.
- ¹²⁵ **Finlay AY, Khan GK.** *Dermatology Life Quality Index (DLQI)- a simple practical measure for routine clinical use.* *Clin Exp Dermatol* 1994;19:210-6.
- ¹²⁶ **De Tiedra AG, Mercadal J, Badia X, Mascaró JM, Herdman M, Lozano R.** *Adaptación transcultural al español del cuestionario Dermatology Life Quality Index (DLQI): El Índice de Calidad de Vida en Dermatología.* *Actas Dermosifilogr* 1998;89:692-700.
- ¹²⁷ **Elalamy I, Gkalea V, Gerotziapas G, Hela Ketatni H, Hatmi M.** *The usefulness of platelet function evaluation in clinical practice.* *Ann Biol Clin* 2013;71(S1):47-57.

- ¹²⁸ **Wagner T, Vetter A, Dimovic N, Guber SE, Helmberg W, Kroll W, et al.** *Ultrastructural changes and activation differences in platelet concentrates stored in plasma and additive solution.* Transfusion 2002;42:719-27.
- ¹²⁹ **Berezin V, Skladchikova G, Bock E.** *Evaluation of cell morphology by video recording and computer-assisted image analysis.* Cytometry 1997;27:106-16.
- ¹³⁰ **Basra M.** *Minimal Clinically Important Difference (MCID) of the Dermatology Life Quality Index (DLQI) scores and responsiveness to change in inflammatory dermatoses.* J Invest Dermatol. 2013;133 Suppl 1: S95.
- ¹³¹ **Weibrich G, Kleis W.** *Curasan PRP Kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma.* Clin Oral Impl Res 2002;13:437-43.
- ¹³² **Peñarrocha M, Sanchis JM, Martínez JM.** *Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral.* Periodoncia 2001;11(3):205-16.
- ¹³³ **Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R.** *Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application.* Transfusion 2001;41(10):1217-24.
- ¹³⁴ **Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Drago J.** *Comparison of growth factor and platelet concentration from commercial platelet-rich plasma separation systems.* Am J Sports Med 2011;39(2):266-71.
- ¹³⁵ **Appel TR, Pöttsch B, Müller J, von Lindern J, Bergé ST, Reich RH.** *Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment.* Clin Oral Impl Res 2002;13:522-8.
- ¹³⁶ **Anitua E.** *Protocolo de obtención y evaluación clínica e histológica de plasma rico en factores de crecimiento para la preparación de áreas futuras en implantología. Estudio con SEM y evaluación clínica e histológica.* Tesis Doctoral, Valencia 2002.

- ¹³⁷ **Weibrich G, Kleis W, Hafner G.** *Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by two different methods: Curasan-type PRP Kit versus PCCS PRP System.* *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17:184-90.
- ¹³⁸ **Schmidmaier G, Herrmann S, Green J, Weber T, Scharfenberger A, Haas NP, et al.** *Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation.* *Bone* 2006;39:1156-63.
- ¹³⁹ **Salazar-Álvarez AE, Riera-del-Moral LF, García-Arranz M, Álvarez-García J, Concepción-Rodríguez NA, Riera-de-Cubas L.** *Uso de plasma rico en plaquetas para cicatrización de úlceras crónicas de miembros inferiores.* *Actas Dermosifiliog* 2014;105:597-604.
- ¹⁴⁰ **Randelli P, Arrigoni P, Ragone V, Aliprandi A, Cabitza P.** *Platelet rich plasma in arthroscopic rotator cuff repair: a prospective RCT study, 2-year follow-up.* *J Shoulder Elbow Surg* 2010;20(4):518-28.
- ¹⁴¹ **Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, et al.** *Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation.* *Br J Pharmacol* 2007;150(2):176-85.
- ¹⁴² **MacNeil S.** *Progress and opportunities for tissue-engineered skin.* *Nature* 2007;445:874-80.
- ¹⁴³ **Griffeth RJ, García-Párraga D, Mellado-López M, Crespo-Picazo JL, Soriano-Navarro M, Martínez-Romero A, et al.** *Platelet-Rich Plasma and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine-Associated Treatments in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*).* Mezey E, ed. *PLoS ONE* 2014;9(9):e108439.



