

“Control de calidad de productos derivados de plaquetas para aplicación en Liquen Escleroso Peneano”

***Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa - Departamento Básico de Medicina,
Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República***

***Proyecto de investigación de pregrado
Ciclo de Metodología científica II - 2020 - Grupo 8***

***Protocolo Versión 1.0
Registro MSP Nro. 788862***

***Tutores
Prof. Agda.Touriño, Cristina;
Asist. Echarte, Lourdes; Asist. Posada, Marianela***

***Estudiantes
Br. Ituarte, Noelia
Br. Pedraja, Paula
Br. Pouso, María
Br. Rodriguez, Nadia
Br. Segredo, Florencia
Br. Tourn, Jennifer***

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
<i>Índice de tablas y figuras</i>	ii
<i>Resumen</i>	iii
<i>Introducción</i>	
<i>Justificación</i>	1
<i>Qué es el plasma rico en plaquetas</i>	1
<i>Factores de crecimiento</i>	2
<i>Clasificación</i>	2
<i>Métodos de obtención</i>	4
<i>Usos</i>	5
<i>Control de calidad</i>	6
<i>Seguridad</i>	6
<i>Pureza</i>	7
<i>Potencia</i>	8
<i>Objetivos generales</i>	9
<i>Objetivos específicos</i>	9
<i>Metodología</i>	10
<i>Resultados</i>	
<i>Evaluación de las pruebas de seguridad de los productos</i> <i>de PRP</i>	11
<i>Estudio de la pureza del PRP</i>	11
<i>Análisis de parámetros indicadores de potencia</i>	13
<i>Discusión</i>	19
<i>Conclusiones y perspectivas</i>	21
<i>Referencias Bibliográficas</i>	22
<i>Anexos</i>	25

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<i>Página</i>
Tabla 1. Clasificación de MARSPILL de PRP propuesta por Santos	3
Figura 1. Concentración de Leucocitos (Leu) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	11
Figura 2. Concentración de Leucocitos (Leu) por paciente.....	12
Figura 3. Concentración de Eritrocitos (GR) en Sangre periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	12
Figura 4. Concentración de Eritrocitos (GR) por paciente (P).....	13
Figura 5. Concentración de Plaquetas (PL) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	14
Figura 6. Número de Plaquetas totales (NPT) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	14
Figura 7. Masa Plaquetaria (MP) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	15
Figura 8. Número de Plaquetas totales (NPT), Factor de Enriquecimiento (FE) plaquetario y concentración de plaquetas en Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	16
Figura 9. Correlación entre Masa Plaquetaria (MP), Número de Plaquetas totales (NPT) y Factor de Enriquecimiento (FE) plaquetario en Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	17
Figura 10. Variación del Volumen Plaquetario Medio (VPM).....	18

LISTADO DE ACRÓNIMOS Y/O SÍMBOLOS

PL Plaquetas **PRP** Plasma Rico en Plaquetas **PRGF** Plasma Rico en Factores de Crecimiento **PRPGF** Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento **PPP** Plasma Pobre en Plaquetas **LR-PRP** Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos **LP-PRP** Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos **LEP** Liquen Escleroso Peneano **GR** Glóbulos Rojos **VPM** Volumen Plaquetario Medio **PDGF** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas **IGF 1** Factor de Crecimiento similar la Insulina tipo 1 **VEGF** Factor de Crecimiento Endotelial Vascular **CTGF** Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo **TGF-β** Factor de Crecimiento Transformante beta. **μl** Microlitro **ml** Mililitro **fl** Fentolitro **FE** Factor de Enriquecimiento **MP** Masa Plaquetaria **NPT** Número de Plaquetas totales **Leu** Leucocitos **F1** Fracción 1 **SP** Sangre periférica.

RESUMEN

OBJETIVO: El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto biológico derivado de las plaquetas (PL) empleado en terapias regenerativas cuyo mecanismo de acción se basa en la liberación de factores de crecimiento. En el presente trabajo se analizó el control de calidad de los productos de PRP elaborados en el ensayo clínico: “PRP autólogo para el tratamiento de liquen escleroso peneano (LEP) resistente a terapia convencional: un estudio Piloto”.

METODOLOGÍA: Fue un estudio descriptivo, observacional y retrospectivo a partir de datos anonimizados de 34 productos de PRP pertenecientes a 5 pacientes. Se evaluó seguridad del PRP analizando presencia de contaminantes microbiológicos; pureza a través del contenido de leucocitos (Leu), glóbulos rojos (GR) y hemoglobina (Hb); y potencia evaluando el factor de enriquecimiento (FE), el número de plaquetas totales (NPT) y la masa plaquetaria (MP).

RESULTADOS: No se detectó contaminación microbiológica. En relación a la pureza, se observó que la concentración de Leu en PRP fue menor al nivel en Sangre Periférica (SP: $6,6 \pm 1,4 \times 10^3$ Leu/ul vs. PRP: $0,3 \pm 0,3 \times 10^3$ Leu/ul) pudiendo considerar a los productos como pobres en Leu, pobres en GR (SP: $4,7 \pm 0,3 \times 10^6$ GR/ul vs PRP: $0,02 \pm 0,01 \times 10^6$ GR/ul); no detectándose niveles significativos de Hb. En relación a la potencia, si bien en el proceso de producción se perdió el 59.8 % de las PL, se logró un NPT de $3847 \times 10^6 \pm 2168 \times 10^6$, una MP de $2,44 \times 10^{10} \pm 1,44 \times 10^{10}$ fl y un FE de $4,3 \pm 1,9$.

CONCLUSIONES: Se pudo clasificar a los productos de PRP obtenidos, según MARSPILL, como: $M_{(H)}, A_{(A+)}, R_{(RBC-P)}, S_{(Sp2)}, P_{(PL[2-6])}, I_{(G-)}, L_{(Lc-P)}, L_{(A-)}$. Observándose que el sistema de producción establecido cumple con los criterios básicos de calidad necesarios para aplicación en LEP.

PALABRAS CLAVES: PRP, control de calidad, , seguridad, pureza, potencia, MARSPILL

SUMMARY

OBJECTIVE: Platelet-rich plasma (PRP) is a biological product derived from platelets (PL) used in regenerative therapies whose mechanism of action is based on the release of growth factors. In the present work, the quality control of the PRP products produced in the clinical trial was analyzed: “Autologous PRP for the treatment of lichen sclerosus penis (LSP) resistant to conventional therapy: a Pilot study”.

METHODOLOGY: It was a descriptive, observational and retrospective study based on anonymized data from 34 PRP products belonging to 5 patients. Safety of PRP was evaluated by analyzing the presence of microbiological contaminants; purity through the content of leukocytes (Leu), red blood cells (RBC) and hemoglobin (Hb); and potency evaluating the enrichment factor (EF), the number of total platelets (NTP) and the platelet mass (PM).

RESULTS: Microbiological contamination was not detected. In relation to purity, it was observed that the concentration of Leu in PRP was lower than the level in Peripheral Blood (PB: $6.6 \pm 1.4 \times 10^3$ Leu / ul vs. PRP: $0.3 \pm 0.3 \times 10^3$ Leu / ul) being able to consider the products as poor in Leu, poor in RBC (PB: $4.7 \pm 0.3 \times 10^6$ GR / ul vs PRP: $0.02 \pm 0.01 \times 10^6$ GR / ul); no significant levels of Hb were detected. In relation to potency, although 59.8% of the PL was lost in the production process, an NTP of $3847 \times 10^6 + 2168 \times 10^6$, a MP of $2.44 \times 10^{10} + 1.44 \times 10^{10}$ fl and an EF of 4.3 ± 1.9 were achieved..

CONCLUSION: The PRP products obtained, according to MARSPILL, could be classified as: M_(H), A_(A +), R_(RBC-P), S_(Sp2), P_(PL [2-6]), I_(G -), L_(Lc-P), L_(A-). Noting that the established production system meets the basic quality criteria necessary for clinical application in LEP.

KEY WORDS: PRP, quality control, safety, purity, potency, MARSPILL

1- INTRODUCCIÓN:

Justificación

A pesar de la gran cantidad de publicaciones, tanto experimentales como clínicas al respecto de la utilización del PRP en diversos ámbitos de la medicina regenerativa, pocas son las indicaciones en las que se encuentra plenamente demostrada su utilidad. A diferencia de las otras terapias regenerativas, la utilización de PRP es un método económico y no requiere de equipamiento o entrenamiento complejo para su ejecución. Asimismo, debido a características asociadas a su origen principalmente autólogo y a sus técnicas de obtención inocuas, los posibles riesgos infecciosos o de rechazo asociados al tratamiento con PRP son mínimos. Por estas razones, los hemoderivados enriquecidos en PL han cobrado gran relevancia en la última década (1).

La gran variabilidad existente en cuanto a los protocolos de obtención del PRP, pueden, en muchos casos, llevar a la producción de muestras con diferentes composiciones, y por ende pueden generar distinto grado de respuestas biológicas (1). Estos hechos ponen de manifiesto la importancia de realizar estudios clínicos adecuadamente diseñados y controlados que permitan demostrar los efectos del producto, al igual que estudios que permitan estandarizar los métodos de obtención, aplicación y control de calidad. El propósito de esta investigación es llevar a cabo un estudio descriptivo sobre el control de calidad del PRP utilizado en la patología liquen escleroso peneano, por lo anteriormente mencionado, en el marco de un ensayo clínico.

¿Qué es el Plasma Rico en Plaquetas?

Una muestra de sangre típica consiste en elementos formados (glóbulos rojos, glóbulos blancos y PL), y plasma, representando en promedio 45% y 55% respectivamente. De los elementos formados, el 93% son glóbulos rojos, 6% de PL y 1% de glóbulos blancos. Los megacariocitos son células precursoras, altamente especializadas cuya función principal es producir y liberar PL en la circulación. A medida que se desarrollan las PL, reciben su contenido de gránulos y orgánulos como corrientes de partículas individuales transportadas desde el cuerpo celular de los megacariocitos (2). Las PL entonces son fragmentos citoplasmáticos pequeños y sin núcleo derivados de sus precursores, los megacariocitos. Aunque tradicionalmente han sido consideradas como los agentes responsables de la hemostasia, las PL juegan también un papel muy importante en la reparación y regeneración de diferentes tejidos como hueso, cartílago, tendones, ligamentos, etcétera. La activación plaquetaria tras un daño tisular o vascular produce: un tapón plaquetario y un coágulo que permite la homeostasis y la secreción de una gran variedad de moléculas tales como factores de crecimiento y otras citoquinas. La definición de PRP es muy controvertida. La única definición planteada consistentemente en la literatura, define el PRP como

un volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de PL superior al nivel basal (150.000 PL/ μ l a 350.000 PL/ μ l) (3).

Factores de crecimiento

Estudios *in vitro* han demostrado que el PRP contiene citocinas que intervienen en el proceso de neovascularización, proliferación de monocitos, fibroblastos, miocitos, condrocitos, así como el reclutamiento de células inflamatorias con efecto inhibitorio sobre citocinas proinflamatorias, con actividad antiinflamatoria y regenerativa. Estos mecanismos son la base para proponer un efecto terapéutico favorable para su uso en diversas patologías (4). El mecanismo de acción del PRP propuesto se basa en la liberación local de los factores de crecimiento naturales contenidos en las PL, una vez que éstas son activadas. Se han descrito varios factores de crecimiento plaquetarios implicados en los procesos de regeneración, como los que se ilustran en la tabla 1, entre ellos: factor de crecimiento derivado de plaquetas [platelet derived growth factor (PDGF)], factor de crecimiento transformante beta [transforming growth factor β (TGF- β)], factor de crecimiento insulínico tipo 1 [insulin - like growth factor 1 (IGF-1)], factor de crecimiento endotelial vascular [vascular endothelial growth factor (VEGF)], y factor de crecimiento de tejido conectivo [connective tissue growth factor (CTGF)]. Además de estos factores, el PRP contiene proteínas como la fibrina, fibronectina, vitronectina y trombospodina, que actúan como moléculas de adhesión celular, y son importantes para la migración de osteoblastos, fibroblastos y células epiteliales (5). La acción conjunta de estas moléculas modula secuencial y solapadamente 1) la revascularización del tejido dañado a través de la inducción de la migración, proliferación, diferenciación y estabilización de células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos, 2) la restitución del tejido conectivo dañado a través de la migración, proliferación y activación de fibroblastos, y 3) la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales que dan origen a los distintos tipos celulares específicos de cada tejido (1).

Clasificación del PRP

A pesar de que aún no se ha logrado un consenso para la clasificación de los productos derivados de las PL, existen diversas propuestas sobre el mismo. Dohan y colaboradores propusieron un sistema de clasificación cualitativo de los diferentes preparados de PRP en seis categorías, dependiendo del contenido en leucocitos, activación exógena plaquetaria y la presencia de una arquitectura fibrinosa (6). Por otra parte, en 2012 DeLong y colaboradores establecieron un sistema de clasificación llamado Plaquetas, activación, glóbulos blancos, que se basa en los siguientes parámetros: número absoluto de PL; forma de activación adoptada; y presencia o ausencia de glóbulos blancos. En esta clasificación, los autores identificaron cuatro diferentes

niveles de concentración de PL de la siguiente manera: P1 ($\leq$ línea base), P2 ($>$ línea base – 750,000 PL / μ l), P3 ($>$ 750,000– 1,250,000 PL / μ l) y P4 ($>$ 1,250,000 PL / μ l). Otros puntos considerados se refieren al uso o no de activadores de PL, presencia de glóbulos blancos y neutrófilos (por encima o por debajo de la línea de base presente en sangre total). Según los autores, la determinación precisa de componentes celulares, y el uso y tipo de activador adoptada, son información importante al comparar estudios con PRP (7) . Recientemente Santos y colaboradores propusieron una clasificación llamada MARSPILL, ver tabla 1. La misma tiene en cuenta los siguientes factores: M: method (método); A: activation (activación); R: red blood cell (glóbulos rojos); S: spins (centrifugación); P: platelets (plaquetas); I: image guide (guía de imagen); L: leukocytes (leucocitos); L: light activation (activación de luz). En este estudio se utilizó la clasificación MARSPILL; donde el método que utilizado es el abierto, las plaquetas se activaron con gluconato de calcio, la cantidad de glóbulos rojos se espera que sea pobre, así como la de los leucocitos. Se realizaron dos centrifugaciones, el enriquecimiento plaquetario que se busca es igual o mayor a 4 veces el valor inicial. No se empleó guía de imagen para la aplicación de PRP y tampoco se usó activación de luz (8).

Tabla 1. Clasificación de MARSPILL de PRP propuesta por Santos

Letter	Relates to	Type
M	Method	Handmade (H) Machine (M)
A	Activation	Activated (A+) Not activated (A-)
R	Red blood cells	Rich (RBC-R) Poor (RBC-P)
S	Spin	One spin (Sp1) Two spins (Sp2)
P	Platelet number (folds basal)	PL 2–3 PL 6–8 PL 4–6 PL 8–10
I	Image guided	Guided (G+) Not guided (G-)
L	Leukocyte concentration	Rich (Lc-R) Poor (Lc-P)
L	Light activation	Activated (A+) Not activated (A-)

Lc: Leukocyte concentration; PL: Platelet concentration; RBC: Red blood cell.

Nota: Tomada de Santos et. al, 2017 (8).

La obtención y activación de PL *ex vivo* es una técnica simple, rápida y económica que permite obtener un biomaterial rico en factores de crecimiento (1). Todos estos productos, aunque con diferencias en las técnicas de producción, se obtienen a partir de la sangre total y emplean la

centrifugación como método de separación de los componentes sanguíneos celulares y concentración de las PL. Puede procesarse sangre del propio paciente para aplicación autóloga o utilizarse productos alogénicos que derivan de la sangre de donantes sanos. Hasta el momento, mayoritariamente se han utilizado los productos autólogos, que no generan preocupación en cuanto a reacciones inmunológicas y transmisión de agentes infecciosos. Asimismo, debido a características asociadas a su origen principalmente autólogo y a sus técnicas de obtención inocuas, los posibles riesgos infecciosos o de rechazo asociados al tratamiento con PRP son mínimos. Por estas razones, los hemoderivados enriquecidos en PL han cobrado gran relevancia en la última década (1).

Métodos de obtención del PRP

Para la obtención de PRP autólogo la sangre es colectada con anticoagulante, luego centrifugada (usualmente con dos pasos de centrifugación diferencial) para descartar los glóbulos rojos y parte del plasma acelular, y coleccionar principalmente las PL. Ello puede realizarse aplicando técnicas estándares de banco de sangre -procesando en sistema cerrado de bolsas o por técnica abierta bajo cabina de flujo laminar- o mediante la utilización de distintos dispositivos comerciales automatizados. Cuando se centrifuga la sangre anticoagulada por gradiente de densidad se forman 3 capas: la capa inferior, compuesta por glóbulos rojos; la capa media, compuesta por glóbulos blancos y PL; y la capa superior, compuesta por plasma. La fase plasmática, a su vez puede subdividirse en 3 fracciones en función de la cantidad de PL presentes, que de superior a inferior son: una fracción pobre en PL, la fracción intermedia con una concentración media de PL y la fracción rica en PL, ilustrado en la imagen 1 (9). Dependiendo del sistema empleado, las concentraciones de PL, leucocitos, eritrocitos y factores de crecimiento pueden variar. Al utilizar los distintos métodos se obtienen diferentes fracciones, entre las que se encuentran: Preparado Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), Plasma Rico en Plaquetas y Factores de Crecimiento (PRPGF), Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Plasma Pobre en Plaquetas (PPP), Plasma Rico en Plaquetas y Rico en Leucocitos (LR-PRP), Plasma Rico en Plaquetas y Pobre en Leucocitos (LP-PRP) (3).

La eficiencia de los diferentes métodos de obtención de PRP se valora por su capacidad de enriquecimiento plaquetario, que se define como la proporción de PL concentradas en el preparado obtenido respecto a su concentración en sangre periférica y resulta de dividir el recuento plaquetario final por el recuento inicial (10). La efectividad del enriquecimiento plaquetario dependerá de la velocidad, del tiempo y del número de centrifugados. Si la velocidad, tiempo o número de centrifugados no son los adecuados, se puede producir una activación temprana de las

PL y la pérdida del contenido de sus gránulos, y, por tanto, de los factores de crecimiento contenidos en ellos. No se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre edad, sexo, hematocrito o recuento plaquetario en sangre periférica con la concentración plaquetaria del PRP, ni la cantidad de factores de crecimiento (10).

Usos

Si bien ha sido ampliamente utilizado, no existe evidencia clara y contundente de las indicaciones y aplicaciones del PRP en las diferentes patologías. Algunos artículos muestran que el PRP podría tener un efecto potencial en la reparación de lesiones músculo-esqueléticas a través de modificar el proceso de cicatrización (4). Las aplicaciones clínicas son en la espondilitis, lesiones del manguito rotador, tendinopatías y ruptura del tendón de Aquiles, fracturas y sus complicaciones, osteoartritis, entre otras. Diversos estudios han demostrado que la aplicación de PRP en úlceras diabéticas crónicas acelera el proceso de cierre de las mismas y disminuye el dolor. En ginecología se ha utilizado para el manejo de heridas quirúrgicas, demostrando aspectos positivos en cuanto a la disminución del dolor y la necesidad de analgésicos. El PRP abre un horizonte en el tratamiento de diversas condiciones dermatológicas como son la psoriasis, el vitíligo, alopecia, liquen escleroso. Estudios con rigurosa metodología científica son necesarios para conocer el papel preciso del PRP en los padecimientos de la cubierta cutánea (4). Dada su naturaleza autóloga el PRP es un producto bastante seguro, que carece por definición del riesgo potencial de transmisión de enfermedades implícito en el uso de material sanguíneo de donantes. Hasta el momento actual no se ha demostrado un efecto sistémico de los factores de crecimiento liberados tras la aplicación local de PRP (9).

Este trabajo se desarrolla en el marco de un ensayo clínico piloto de carácter terapéutico prospectivo, abierto, de un solo brazo, en fase II para el tratamiento de liquen escleroso peneano (LEP) resistente al tratamiento convencional. El liquen escleroso es una afección inflamatoria crónica de la piel que con frecuencia afecta a la región anogenital. La clínica del LEP consiste en placas blanquecinas, piel atrófica o engrosada; generalmente asociada con úlceras y equimosis por rascado. En la última década, el PRP se ha utilizado ampliamente como complemento de los procedimientos de regeneración de tejidos. Inyecciones de PRP ha dado una mejoría general en el daño y los síntomas, en donde el mecanismo de acción planteado es a través de la desgranulación de los gránulos α de las PL, los cuales contienen los factores de crecimiento. Se estudió una serie de casos clínicos retrospectivo en el año 2017, con respecto a la metodología utilizada, se les aplicó el producto a 5 pacientes con LEP resistente a tratamiento convencional, fueron utilizados dos scores como el IGA (Índice Global del Investigador) y el score DLQI (Índice de Calidad de

Vida Dermatológica) tanto antes como después del procedimiento. Los resultados obtenidos fueron evidentes, tanto estéticamente, como funcionalmente. La falta de un grupo control es una limitación de este trabajo (11).

Control de calidad

El control de calidad se refiere a técnicas y actividades periódicas para asegurar el cumplimiento de los requisitos establecidos para un producto. Los ejercicios de control de la calidad permiten evaluar de forma continua en el tiempo la calidad de los procesos (12). Además, para asegurar la calidad de un producto final, es necesario realizar pruebas para determinar su potencia, pureza y seguridad; y esto se lleva a cabo aplicando procedimientos estandarizados.

Todo el procedimiento para la elaboración del PRP, desde la obtención de la sangre del paciente hasta su administración, independientemente de que el sistema usado, sea cerrado o abierto, debe estar descrito de manera detallada en un procedimiento normalizado de trabajo. Dentro de los estándares de calidad del PRP se debe considerar cómo se obtienen los componentes sanguíneos, las aplicaciones de los estándares de recolección, el procesamiento, el funcionamiento de los equipos empleados, la capacitación del personal involucrado, el almacenamiento de los productos, entre otros; de manera que sea posible garantizar la calidad y confiabilidad del producto biológico elaborado (13).

Seguridad

Las pruebas de seguridad tienen el propósito de confirmar que el producto final no esté contaminado con microorganismos o agentes adventicios (14). Los resultados microbiológicos en general están disponibles luego de la aplicación al paciente y se reportan como negativo o positivo. Cuando el producto está contaminado, la bacteria inoculada puede proliferar en horas hasta alcanzar un nivel de 10^6 /mL o mayor (15). De resultar un cultivo positivo se busca identificar al microorganismo. Los organismos implicados en la contaminación bacteriana de las PL incluyen al *Estafilococo* spp (42%), *Streptococo* spp (12%), *Escherichia Coli* (9%), *Bacillus* spp (9%), *Salmonella* spp (9%), *Serratia* spp (8%), *Enterobacter* spp (7%) y otros organismos (4%). Alrededor del 56% de los organismos son Gram positivos y la mayoría aerobios (16). El nivel de contaminación de 10^6 UFC/ml se ha asociado con reacciones graves, por lo tanto, la prueba ideal es aquella que pueda detectar un bajo nivel de contaminación de bacterias en el componente sanguíneo (15). Los cultivos se pueden realizar de manera manual o automatizada, sin embargo, en ambos pueden existir dificultades en mantener un microambiente aséptico durante la

transferencia de la muestra causando falsos positivos. Entre los sistemas a utilizar para el control de calidad del proceso de recolección de plaquetas, está el sistema Bact/Alert; el cual detecta a las bacterias basado en la producción de CO₂. Presenta alta sensibilidad para detectar <10² UFC/ml de bacterias. Los cultivos automatizados requieren grandes volúmenes de los componentes sanguíneos (5-10 ml) lo que mejora la sensibilidad de la detección de bacterias (17).

Pureza

Por otro lado, se encuentran las pruebas de pureza, las cuales aseguran que los productos de terapia celular estén libres de materiales no deseados. Interesa identificar contaminantes celulares como glóbulos rojos, glóbulos blancos y hemoglobina liberada por proceso de hemólisis.

Se espera que los glóbulos blancos tengan una concentración por debajo de la línea de base (recuento en sangre periférica) en el producto final. La presencia de glóbulos blancos en la preparación presenta controversia entre varios autores, algunos afirman que la presencia de GB en el preparado contribuye a la defensa natural contra infecciones y alergias. Otros autores plantean que los neutrófilos, además de actuar como primera línea en la defensa de los tejidos, cumplen un rol en la regeneración tisular. Otros granulocitos, como los eosinófilos y los basófilos, tienen la capacidad de producir factores de crecimiento como TGF β , PDGF y VEGF, que, en conjunto con los factores de crecimiento liberados por las plaquetas, participan en la angiogénesis y vasculogénesis (9). La presencia de neutrófilos, que son el 65% de los glóbulos blancos, puede ser perjudicial ya que pueden destruir el tejido circundante, incluso si el tejido no está lesionado. Estos neutrófilos liberan especies reactivas de oxígeno no selectivas y tóxicas que incluyen hipoclorito, superóxido y radicales hidroxilo a niveles altos. Algunos estudios también han demostrado que la concentración de glóbulos blancos está directamente relacionada con la expresión génica catabólica en el tendón y los ligamentos. La alta expresión génica catabólica puede afectar la cicatrización del tejido (18).

En cuanto a los GR, para ser considerado el PRP un producto pobre en los mismos, tiene que haber una reducción de aproximadamente 15 veces del valor de la línea de base, siendo este el valor de recuento eritrocitario en la sangre entera (9). En la hemólisis, los componentes de los GR no pueden eliminarse en un entorno basado en polímeros ex vivo, ya que no se producen reacciones que contrarrestan el secuestro de la haptoglobina o el bloqueo de hemina por la hemopexina, por lo tanto, la hemoglobina libre en plasma es un componente activo y dañino de cualquier vial de tratamiento biológico. Los GR no dañados se someten al proceso de eritosis, lo que conduce a la liberación del factor activador de PL, contribuyendo a la proinflamación y la

estimulación de la liberación de ceramida. Los GR eriptóticos se unen a la fosfatidilserina, lo que conlleva a la pro-adhesión y la formación de coágulos. El PPR cuando se entrega a un microambiente tisular local, los GR sufren eriptosis porque no pueden abandonar el cuerpo de forma natural a través del proceso de senectud. Esto podría conducir a condiciones inflamatorias secundarias. Además, el enorme depósito de citoquinas del factor inhibidor de la migración de macrófagos dentro de los GR es responsable de mayores niveles de inflamación (19).

Potencia

Por último, las pruebas de potencia miden la actividad biológica apropiada, confirman que el producto posee las funciones biológicas inherentes o inducidas, siendo relevantes para el tratamiento de la indicación clínica prevista. En el caso del PRP, se podría evaluar, el recuento plaquetario en el producto final, el enriquecimiento plaquetario en relación al nivel basal, como aproximación a la potencia de este producto (en sangre periférica), la masa plaquetaria, así como analizar la concentración de factores de crecimiento, entre otros. El recuento plaquetario se realizó de manera automatizada utilizando un contador hematológico. El tamaño de las PL, evaluado mediante el volumen plaquetario medio (VPM), es un marcador de la función y actividad plaquetaria. El VPM mide el volumen plaquetario, el cual se mide en fentolitros (fl) y su valor normal es de 7.5 a 10 fl. Otro concepto que es importante incluir en la interpretación de la actividad de las PL es la masa plaquetaria, que se define como número de PL totales por el VPM de las PL (4).

2- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS:

Objetivos Generales.

- Analizar los controles de calidad de los productos del Plasma Rico en Plaquetas elaborados en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas en el marco del proyecto *“Plasma rico en plaquetas autólogo para el tratamiento de liquen escleroso peneano resistente a terapia convencional: un estudio Piloto”*

Objetivos específicos

- Evaluar elementos de calidad vinculados a la seguridad del producto a través de la existencia o no de contaminantes microbiológicos.
- Estudiar la pureza del PRP obtenido analizando la contaminación con leucocitos, eritrocitos y hemoglobina.
- Analizar la potencia a través del estudio de la concentración de plaquetas en relación al nivel basal (factor de enriquecimiento, FE), número de plaquetas totales (NPT) y MP.

3- METODOLOGÍA

El proyecto contó con el aval institucional (ver Anexo 1), fue inscripto en el Registro de autorización de proyectos de investigación en seres humanos del Ministerio de Salud Pública (MSP, ver Anexo 2) y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas (ver resolución en Anexo 4). El ensayo clínico marco fue aprobado anteriormente por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas y el MSP (ver Anexo 4).

Fue un estudio descriptivo, observacional y retrospectivo donde se analizó la calidad de los productos de PRP obtenidos durante el periodo 12/2017 a 8/2019. La población estudiada, constó de todos los productos de PRP producidos por la Unidad de Terapia Celular para el ensayo clínico mencionado (n=34). Los datos fueron adquiridos de una base de datos anonimizada obtenida del registro de productos procesados en la Unidad de Terapia Celular construida por los responsables del ensayo clínico de forma de mantener la confidencialidad de los datos de los pacientes (n=5).

Se evaluaron las siguientes variables: recuento plaquetario en Sangre Periférica (SP, $\times 10^3/\text{ul}$), recuento plaquetario en Fracción intermedia de procesamiento (F1, $\times 10^3/\text{ul}$), recuento plaquetario en PRP ($\times 10^3/\text{ul}$), recuento de Glóbulos rojos (GR, $\times 10^3/\text{ul}$) en SP, F1 y PRP, concentración de hemoglobina (Hb) en SP, F1 y PRP (g/dl), VPM en SP, F1 y PRP (fL) y control microbiológico de PRP (positivo/negativo). Así como el volumen en mililitros (ml) de SP, F1 y PRP.

Teniendo en cuenta la clasificación de MARSPILL para elaborar el PRP, el método el cual se produjo el PRP fue manual. Se trabajó con centrífuga de banco de sangre bajo cabina de flujo laminar. Se activó con gluconato de calcio para que las PL liberen el contenido de los gránulos. El total de las centrifugaciones fueron dos para obtener el PRP. El FE se obtuvo mediante el cociente entre la concentración de PL en el PRP sobre la concentración de PL en SP. Por otro lado, el NTP se estimó a través del producto entre la concentración de PL en PRP y el volumen de PRP. La MP se obtuvo a través del producto de NPT por VPM.

Los datos obtenidos de variables cuantitativas continuas se expresaron como media $\pm$ desvío estándar (SD). Se analizó la variabilidad entre individuos de los distintos parámetros y la variación del VPM utilizando el test no paramétrico de Kruskal Wallis, considerándose estadísticamente significativo $p < 0,05$. Para evaluar la correlación entre el NPT, FE y MP se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman, considerándose estadísticamente significativo $p < 0,05$. Las gráficas y análisis estadístico fueron llevados a cabo con GraphPad Prism 6.0.

4- RESULTADOS

Evaluación de la seguridad del PRP

En base al control microbiológico no se detectó contaminación microbiológica en los preparados de PRP analizados. Estos resultados fueron obtenidos de un total de 34 muestras de PRP, de los cuales 33 fueron negativas y para una muestra no hubo determinación.

Estudio de la pureza del PRP

Para evaluar la pureza se analizó la presencia de Leu, GR y Hb en los productos de PRP en relación a los niveles basales de la SP de partida.

Considerando todas las muestras, la concentración promedio en SP fue de $6,0 \pm 1,5 \times 10^3$ Leu/ul; en F1 fue de $0,4 \pm 0,4 \times 10^3$ Leu/ul, y en PRP $2,1 \pm 2,1$ Leu/ul, ver figura 1. Por lo tanto, la concentración de Leu en PRP fue menor al nivel basal pudiendo considerar a los productos de forma global como pobres en Leu.

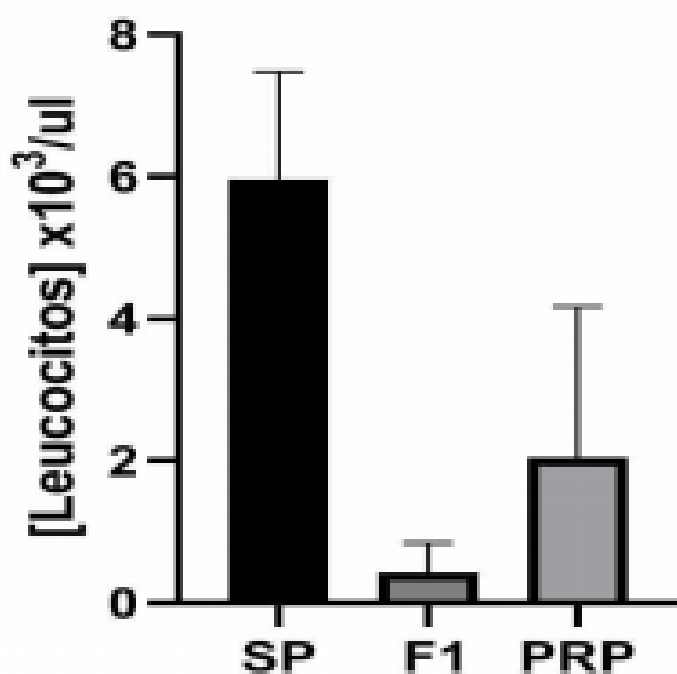


Figura 1. Concentración de Leucocitos (Leu) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se representa la concentración de Leu promedio con el desvío estándar obtenido considerando todos los productos.

Se analizó la variabilidad interpaciente en la concentración de Leu en el SP y PRP, ver

figura 2. Siendo dicha variación estadísticamente significativa en SP (valor-p < 0,0001) y no en PRP (p-valor de 0,2638).

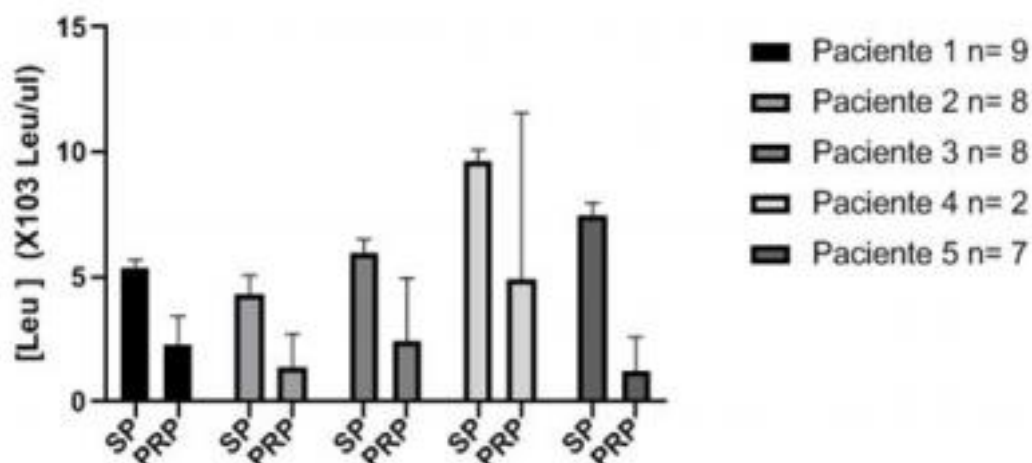


Figura 2. Concentración de Leucocitos (Leu) por paciente. Se representa la concentración de Leu promedio con el desvío estándar obtenido en sangre periférica (SP) y Plasma rico en Plaquetas (PRP) agrupado por paciente.

Por otro lado, se evaluó la presencia de GR. Los datos brindaron un promedio de GR en SP de $4,73 \pm 0,27 \times 10^6$ GR/ul; en F1 fue de $0,01 \pm 0,02 \times 10^6$ GR/ul; y en PRP fue de $0,02 \pm 0,01 \times 10^6$ GR/ul. Para obtener una reducción promedio 15 veces menor que la concentración en SP, la concentración en PRP debería ser menor a $0,31 \times 10^6$ GR/ul. Obteniendo un resultado final de $0,02 \pm 0,01 \times 10^6$ GR/ul para el PRP, se puede afirmar que el PRP es pobre en GR, ver figura 3.

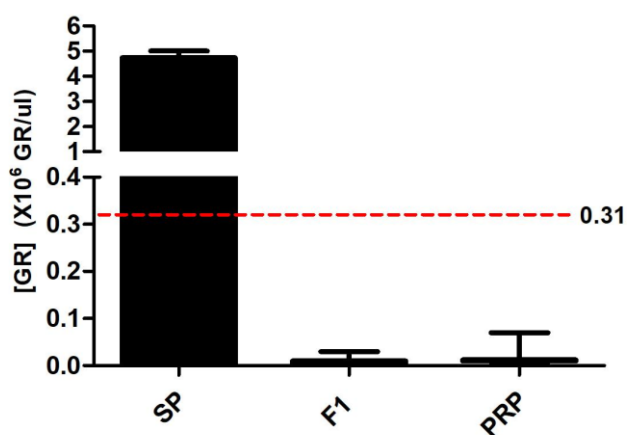


Figura 3. Concentración de Glóbulos Rojos (GR) en Sangre Periférica (SP), Fracción (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se representa la concentración de GR promedio con el desvío estándar considerando todos los productos (n=34). La línea punteada en rojo representa la concentración máxima de GR que puede tener el PRP ($0,31 \times 10^6$ GR/uL) para ser considerado pobre en eritrocitos.

Se analizó la variabilidad interpaciente en la concentración de GR del PRP, ver figura 4. No observándose diferencias interpaciente estadísticamente significativas (p-valor de 0,4671):

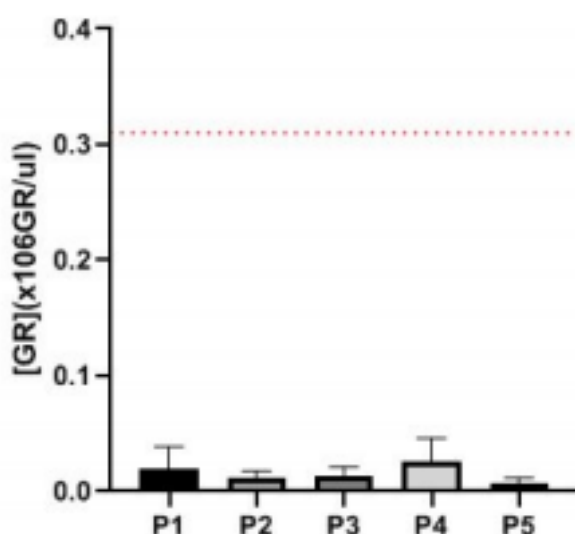


Figura 4. Concentración de Glóbulos rojos (GR) por paciente (P). Se representa la concentración de GR promedio con el desvío estándar obtenido en el Plasma rico en Plaquetas (PRP) agrupado por paciente. La línea punteada en rojo representa la concentración máxima de GR que puede tener el PRP (0.31×10^6 GR/uL) para ser considerado como pobre.

Se analizaron los valores de la concentración de Hb en SP y en los productos finales para evidenciar hemólisis, siendo en promedio $13,8 \pm 4,5$ g/dL en SP, y $0,0 \pm 0,0$ g/dL en PRP. De las 34 muestras, 33 no evidenciaron presencia de Hb a excepción de una única muestra en la cual se detectaron 0,1 g/dL en PRP.

Análisis de parámetros indicadores de potencia

Como forma de evaluar la actividad biológica del PRP, se analizó el factor de enriquecimiento plaquetario (FE), el número de plaquetas totales obtenidas (PL) y la masa plaquetaria (MP).

En la figura 5 se muestra la concentración de PL promedio obtenida en SP, F1 y PRP. El factor de enriquecimiento (FE), considerando todas las muestras ($n=34$), fue para F1 fue de $1,3 \pm 0,3$, y para PRP fue de $4,3 \pm 1,9$.

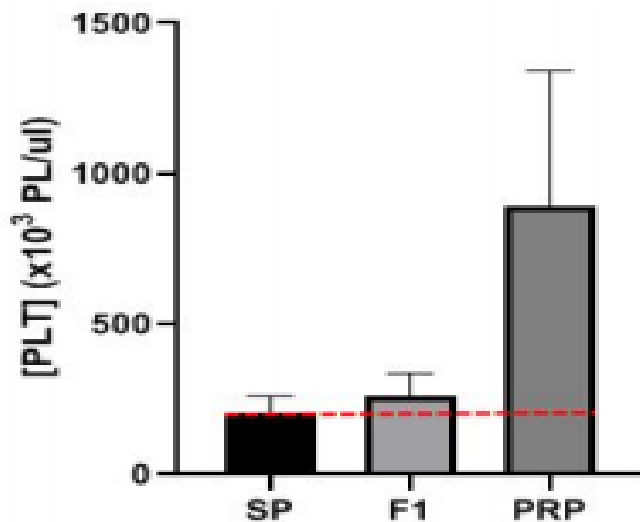


Figura 5. Concentración de Plaquetas (PL) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se representa el promedio y desvío estándar de todas las muestras procesadas (n= 34).

Se analizó la cantidad de PL totales en SP, F1 y PRP, ver figura 6. Considerando todas las muestras en promedio se logra obtener $3847 \times 10^6 \pm 2168 \times 10^6$ PL en el PRP. Se observó que a medida que se lleva a cabo el proceso producción del PRP si bien se logra concentrar las PL, la cantidad va disminuyendo desde SP a PRP. En F1 se perdió el 47,5% de las PL, y en PRP el 59,8%. Si se compara F1 con PRP se obtiene como resultado que en la segunda centrifugación se pierde 12,3% de las PL totales.

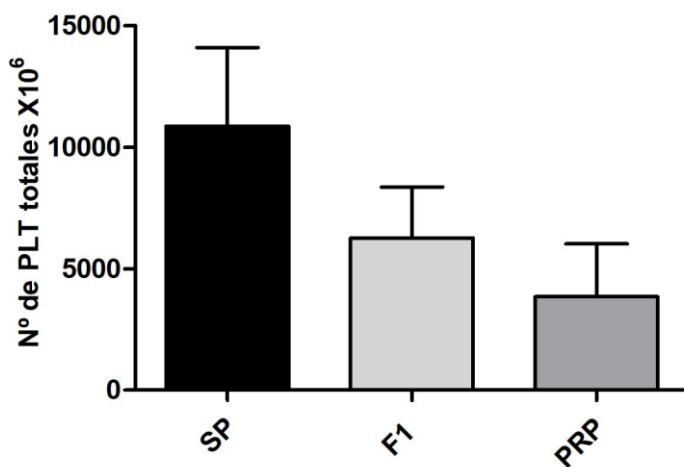


Figura 6. Número de Plaquetas totales (NPT) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se representa el promedio y desvío estándar de todas las muestras procesadas (n= 34).

Se evaluó la MP en SP, F1 y PRP, ver figura 7. Considerando todas las muestras en promedio se logra obtener $2,44 \times 10^{10} \pm 1,44 \times 10^{10}$ fl de MP en el PRP. Observándose también pérdida de MP a medida que se procesan las muestras desde SP a PRP. La pérdida de MP en relación a SP fue de 53% en F1, y en el PRP del 69%.

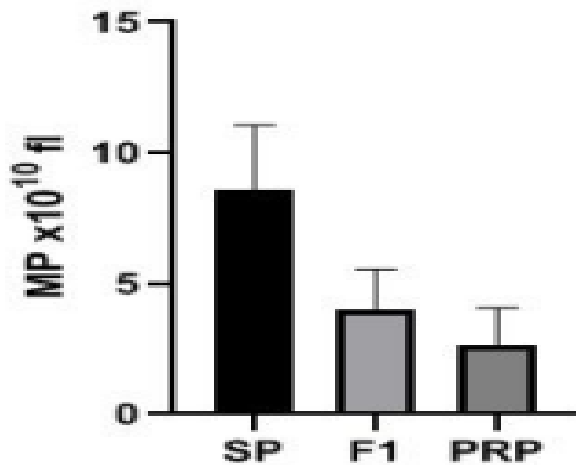


Figura 7. Masa Plaquetaria (MP) en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y Plasma Rico en Plaquetas (PRP). Se representa el promedio y desvío estándar obtenido de todas las muestras procesadas (n= 34).

Para evaluar la variabilidad interpaciente de los parámetros indicadores de potencia se analizó el NPT, el FE y la concentración de PL en PRP agrupados por paciente. Al comparar el NPT interpaciente, se observó una diferencia estadísticamente significativa (p-valor de 0,0271). Realizando el post test de Dunn's se llegó a la conclusión de que la diferencia se debió a la disparidad en el NPT entre paciente 2 y paciente 3 (p-valor 0,0238), ver figura 8 A. No observándose diferencias estadísticamente significativas interpaciente en la concentración de PL (p-valor de 0,4153), ni en el FE plaquetario (p-valor de 0,2502), ver figura 8 B y C respectivamente.

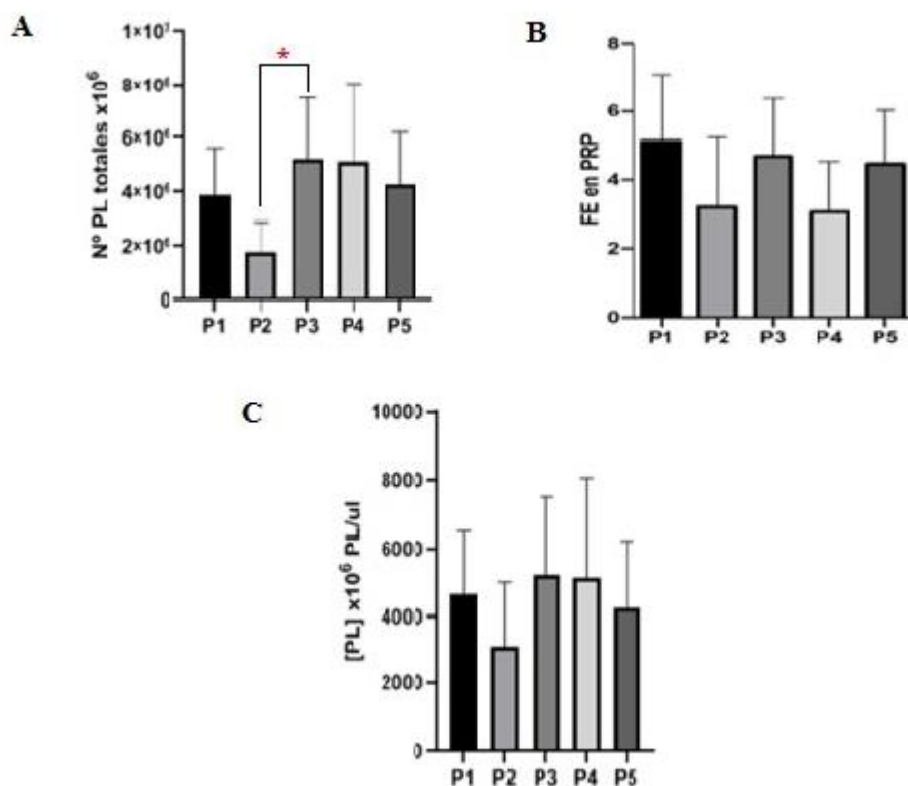


Figura 8. Número de Plaquetas totales (NPT), Factor de Enriquecimiento (FE) plaquetario, y concentración de plaquetas (PL) en Plasma Rico en Plaquetas (PRP) agrupado por paciente (P). A. N° total de PL donde en asterisco se representa donde se demostró la variabilidad, B. FE, y C. Concentración de PL.* p- valor: 0,0238

Por otro lado, se analizó la relación entre los parámetros empleados para analizar la potencia de los productos de PRP. Para ello se realizaron análisis de correlación entre los valores de MP y NPT obtenidos, entre MP y FE y finalmente entre FE y PL totales. Al analizar la relación entre MP y NPT se observó que existe una asociación lineal positiva entre dichos parámetros, ver figura 9 A. Existiendo una correlación muy alta, con un coeficiente de correlación de Spearman de $r= 0.9850$ y un p-valor < 0.0001 . Al analizar la relación entre MP y FE también se observó una asociación lineal, aunque no tan marcada, ver figura 9 B. Existiendo una correlación alta, con un coeficiente de correlación de Spearman de $r= 0.7777$ y un p-valor <0.0001 . En tanto la relación entre FE y NPT también se observa una asociación lineal, ver figura 9C. Existiendo una correlación alta, con un coeficiente de correlación de Spearman de $r= 0.75455$ y un p-valor <0.0001 .

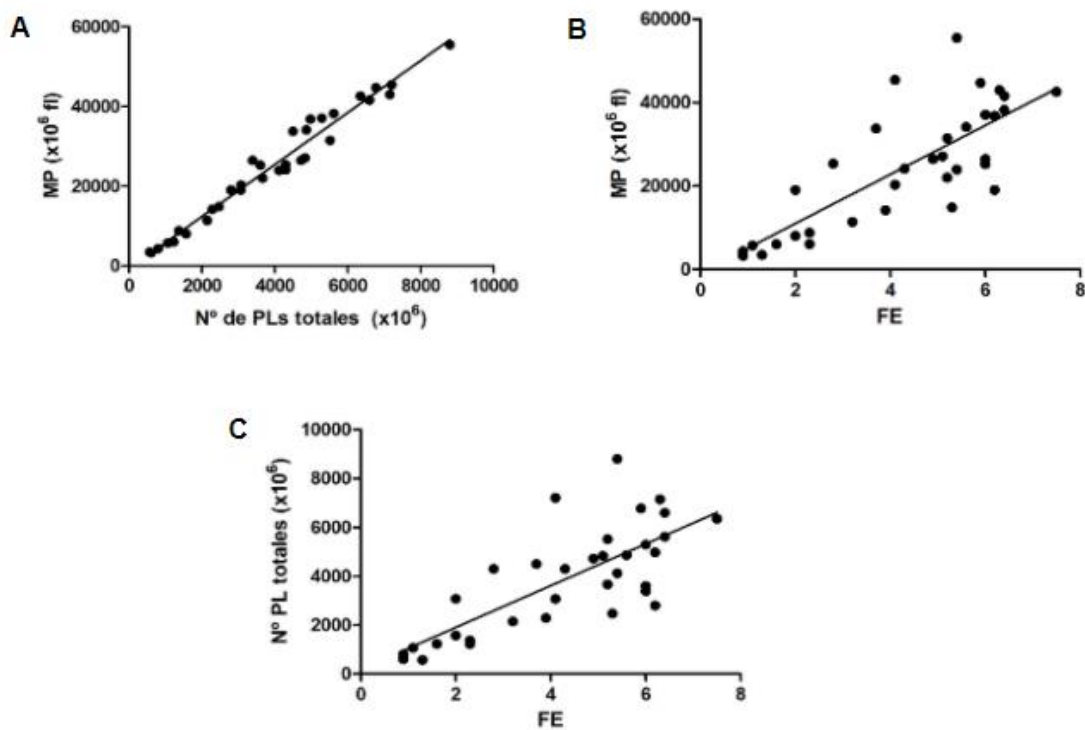


Figura 9. Correlación entre Masa Plaquetaria (MP), Número de Plaquetas totales (NPT) y Factor de Enriquecimiento (FE) en Plasma Rico en Plaquetas (PRP). A. Correlación entre MP y NPT. B. Correlación entre MP y FE y C. Correlación entre NPT y FE.

Finalmente se analizó si hubo modificaciones en el VMP durante el proceso de producción del PRP, ver figura 10. Se obtuvo que el VMP promedio en SP fue de $8,1 \pm 1,0$ fl; en F1 de $6,5 \pm 0,7$ fl; y en PRP de $6,2 \pm 0,8$ fl; observándose en F1 una pérdida del VMP del 19,8% en comparación con SP, y en PRP una pérdida del 23,5% de VPM. Aplicando el test Kruskal-Wallis se observó que las diferencias observadas en el VMP entre SP, F1 y PRP son estadísticamente significativas ($p\text{-valor} < 0.0001$). Aplicando post test de Dunn's se observó que dicha diferencia es estadísticamente significativa ($p\text{-valor} < 0.05$) entre SP y F1, SP y PRP, pero no resultó significativa entre F1 y PRP.

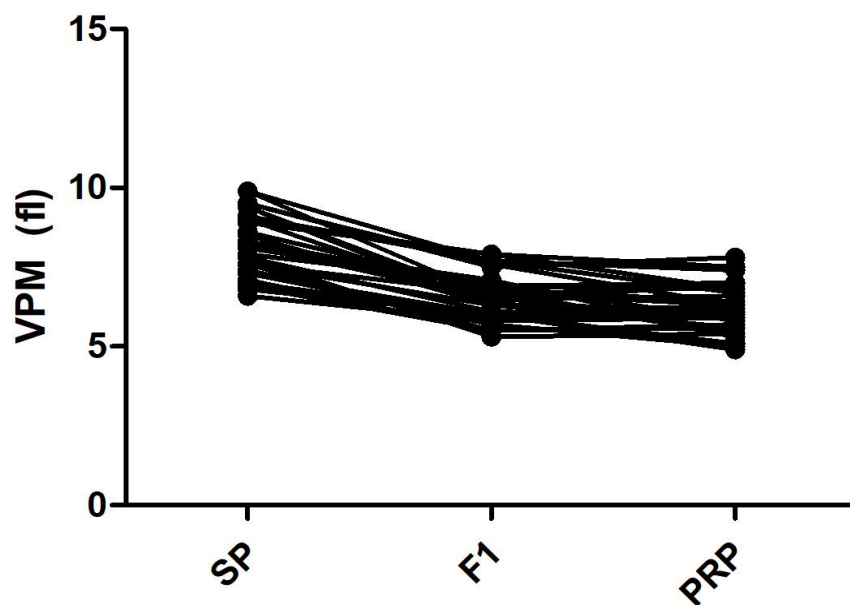


Figura 10. Variación del Volumen Plaquetario Medio (VPM). Se grafican los valores de VPM de todas las muestras procesadas en Sangre Periférica (SP), Fracción 1 (F1) y PRP.

5- DISCUSIÓN

Los estudios reportados a la fecha para el tratamiento de LEP no han analizado parámetros de calidad vinculados a la seguridad, pureza y potencia con los que se pueda comparar (20). Al utilizar la clasificación de MARSPILL para caracterizar a los productos obtenidos los mismos fueron: $M_{(H)}$, $A_{(A+)}$, $R_{(RBC-P)}$, $S_{(Sp2)}$, $P_{(PL[2-6])}$, $I_{(G-)}$, $L_{(LC-P)}$, $L_{(A-)}$. Como ya se había comentado, el producto fue $M_{(H)}$ porque no se utilizaron equipos automáticos para la obtención del PRP, se trabajó con centrífuga de banco de sangre y el producto fue expuesto al ambiente bajo cabina de flujo laminar. $S_{(Sp2)}$ porque se realizaron dos centrifugaciones para llegar al PRP, $A_{(A+)}$ porque fue activado con gluconato de calcio para que las PL liberen el contenido de los gránulos. $L_{(A-)}$ porque no se empleó la activación con luz e $I_{(G-)}$ porque no se utilizó imagen guiada para la aplicación del PRP. En base a los resultados obtenidos se pudo confirmar que la concentración de glóbulos rojos (R), en inglés Red blood cells (RBC) fue pobre (RBC-P). En cuanto a la cantidad de plaquetas (PL) evaluada como FE, el PRP fue rico, ya que el nivel de enriquecimiento obtenido aumentó en promedio $4,3 \pm 1,9$ veces el valor basal. La clasificación MARSPILL divide a los productos de PRP en cuatro categorías según su cantidad de PL, en este caso si consideramos el promedio estaría dentro del grupo PL4-6, pero debido a la dispersión observada para ser más estrictos tendríamos que clasificarlo como PL2-6 (8)

En cuanto a la seguridad, el PRP para uso autólogo es considerado de bajo riesgo (21). En este estudio se pudo observar que la forma de producción empleada parece ser segura a la hora de evitar la contaminación microbiológica, pese a utilizar un método manual y abierto. Existiendo como limitante del método empleado para evaluar esterilidad que no permite detectar el crecimiento de algunas bacterias como *Francisella* spp., *Leptospira* spp., *Bartonella* spp. y *Mycoplasma* spp., parásitos ni virus (22).

El análisis de pureza de un producto basado en células debe garantizar que no contenga más que un porcentaje definido y consistente de células no objetivo (14). En cuanto al contenido Leu, GR y Hb se pudo determinar que los productos cumplieron con los parámetros preestablecidos. El beneficio de incluir Leu en el producto de PRP sigue siendo controvertido y se han realizado pocos estudios para evaluar los efectos de la interacción entre PL y Leu sobre las concentraciones de los factores de crecimiento. Siendo relevante poder establecer un método de producción estandarizado con un contenido en Leu definido, según la patología a tratar, para lograr mejores resultados de los ensayos clínicos con PRP (23).

En cuanto a los parámetros indicadores de potencia, autores como Ozer et. al 2018, sugieren que no se debería emplear únicamente el análisis de la concentración de PL, siendo apropiado evaluar otros parámetros como NPT o MP (24). En este estudio se evaluó además de la concentración de PL, el FE, NPT y MP, observando que existe entre ellas una correlación alta o muy alta. Esto podría ser útil para comparar con otros estudios donde no siempre se presentan todos los parámetros referidos. Una limitante del estudio fue que los datos se basan únicamente en los recuentos hematológicos y medida del volumen de los productos obtenidos. Ambas mediciones tienen sus limitantes, en particular el recuento plaquetario pudo verse afectado por la formación de agregados plaquetarios (25). Se reportó la presencia de agregados en algunos de los productos analizados observándose que los mismos tenían recuentos plaquetarios bajos. Esta formación de agregados puede ser responsable del bajo recuento plaquetario. Los agregados plaquetarios contienen gran número de plaquetas, que, al formar partículas de mayor tamaño, pueden determinar que el contador automático las cuente con otros elementos formes, ya que la calibración de estos equipos se realiza en base al tamaño de las partículas analizadas. Por otro lado, la reducción en el VPM durante el proceso de producción se podría deber a la pérdida de PL más grandes durante el proceso de centrifugación (26). No se considera que se deba a la activación de PL durante el proceso de producción, ya que la activación de las PL se ha asociado a un aumento de VPM (27).

6- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Al analizar los controles de calidad realizados en los productos del PRP elaborados en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas en el marco del proyecto *“Plasma rico en plaquetas autólogo para el tratamiento de liquen escleroso peneano resistente a terapia convencional: un estudio Piloto”* observamos que el sistema de producción parece ser seguro, ya que se logró obtener productos no contaminados con los estudios realizados. En cuanto a la pureza, se estableció que los productos resultaron pobres en leucocitos y eritrocitos. No observándose tampoco contaminación con Hb. En relación a la potencia se pudo determinar que se logró el enriquecimiento necesario para ser considerado PRP, obteniéndose un FE de $4,3 \pm 1,9$. Lográndose un producto de calidad necesaria para la aplicación clínica en LEP.

Como se mencionó en la literatura hay muchos métodos de preparación de PRP, no hay una nomenclatura estandarizada y en consecuencia se pueden observar diferentes formas de llamar a un mismo tipo de PRP (8). En este trabajo se observó que cumplió con los criterios de calidad establecidos y se pudo clasificar a los productos de PRP producidos para el ensayo clínico de LEP, lo que permitirá realizar comparaciones con otros estudios.

Queda por delante aumentar el número de productos de PRP a analizar, en particular para evaluar la variabilidad interpaciente. Por otro lado, sería relevante analizar el contenido de alguno de los factores de crecimiento liberados por las PL. Así poder correlacionar la cantidad de alguno de los factores con los otros indicadores de potencia y con la eficiencia terapéutica del producto analizada en el ensayo clínico.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Etulain J. PRP: Fundamento de su mecanismo de acción [Internet]. <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/12-vol-20-congre-2016.pdf>. 2016 [citado 23 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/12-vol-20-congre-2016.pdf>
2. Ozer K, Kankaya Y, Çolak Ö. An important and overlooked parameter in platelet rich plasma preparation: The mean platelet volume. *J Cosmet Dermatol*. 2019;18(2):474-82.
3. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad ezg. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas. :5.
4. Carrillo-Mora P, González-Villalva A, Macías-Hernández SI, Pineda-Villaseñor C. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa? *Cir Cir*. 2013;(1):9.
5. Civinini R, Macera A, Nistri L, Redl B, Innocenti M. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):25-31.
6. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1131-7.
7. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1 de julio de 2012;28(7):998-1009.
8. Santos Duarte Lana JF, Purita J, Paulus C, Huber SC, Rodrigues BL, Rodrigues AA, et al. Contributions for classification of platelet rich plasma - proposal of a new classification: MARSPILL. *Regen Med*. 2017;12(5):565-74.
9. Conde Montero E, Fernández Santos ME, Suárez Fernández R. Plasma rico en plaquetas: aplicaciones en dermatología. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 1 de marzo de 2015;106(2):104-11.
10. García VP. Controversias del empleo de plasma rico en plaquetas en cirugía ortopédica y traumatología. *Reparación y Aplicación*. :9.
11. Casabona F, Gambelli I, Casabona F, Santi P, Santori G, Baldelli I. Autologous platelet-rich plasma (PRP) in chronic penile lichen sclerosus: the impact on tissue repair and patient quality of

life. Int Urol Nephrol. abril de 2017;49(4):573-80.

12. Santana Porbén, S.. (2012). Sistema de control y aseguramiento de la calidad: Su lugar dentro de un programa de intervención alimentaria, nutrimental y metabólica. Nutrición Hospitalaria, 27(3), 894-907. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.3.5751>

13. FUNDACIÓN PARA LA CALIDAD EN TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA,. Estándares en hemoterapia [Internet]. 5ta Edición. 2019. 212 p. Disponible en: http://www.catransfusion.es/media/upload/arxiu/estandares/HEMOTERAPIA_CAT_20_19.pdf

14. Carmen J, Burger SR, McCaman M, Rowley JA. Developing assays to address identity, potency, purity and safety: cell characterization in cell therapy process development. Regen Med. enero de 2012;7(1):85-100.

15. Murphy WG, Smyth J. Testing for bacteria in platelet concentrates: defining the parameters. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis. junio de 2001;24(3):247-9.

16. Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. Vox Sang. 2004;86(3):157-63.

17. Quintana-González S. VIII. Contaminación bacteriana de los componentes sanguíneos. 2004;140(3):5.

18. Perez AGM, Lana JFSD, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA. Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. ISRN Hematol [Internet]. 25 de marzo de 2014 [citado 18 de mayo de 2020];2014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005024/>

19. Everts PA, Malanga GA, Paul RV, Rothenberg JB, Stephens N, Mautner KR. Assessing clinical implications and perspectives of the pathophysiological effects of erythrocytes and plasma free hemoglobin in autologous biologics for use in musculoskeletal regenerative medicine therapies. A review. Regen Ther. diciembre de 2019;11:56-64

20. Tedesco, M., Pranteda, G., Chichierchia, G., Paolino, G., Latini, A., Orsini, D., Cristaudo, A., Foddai, M., Migliano, E. and Morrone, A. (2019), The use of PRP (platelet- rich plasma) in patients affected by genital lichen sclerosis: clinical analysis and results. J Eur Acad Dermatol

Venereol, 33: e58-e59. doi:10.1111/jdv.15190

21. Kawase T, Okuda K. Comprehensive Quality Control of the Regenerative Therapy Using Platelet Concentrates: The Current Situation and Prospects in Japan. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6389157.

22. Loza, E.; Planes, A. y Rodriguez M. (2003). *Procedimientos de Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. ISBN: 84-609-2289-8. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap10.pdf> Consultado el 17 de mayo 2013

23. Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, Takaku T, Komatsu N, Kaneko K. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci*. 2016 Sep;21(5):683-9. doi: 10.1016/j.jos.2016.07.009. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27503185

24. Ozer, K., Kankaya, Y., Colak, O., & Kocer, U. (2019). The Impact of Duration and Force of Centrifugation on Platelet Content and Mass in the Preparation of Platelet-Rich Plasma. *Aesthetic plastic surgery*, 43(4), 1078–1084. <https://doi.org/10.1007/s00266-019-01375-9>

25. Aizawa H, Kawabata H, Sato A, Masuki H, Watanabe T, Tsujino T, et al. A comparative study of the effects of anticoagulants on pure platelet-rich plasma quality and potency. *Biomedicines*. 25 de febrero de 2020;8(3):42

26. Femia EA, Pugliano M, Podda G, Cattaneo M. Comparison of different procedures to prepare platelet-rich plasma for studies of platelet aggregation by light transmission aggregometry. *Platelets*. 1 de febrero de 2012;23(1):7-10.

27. Park Y, Schoene N, Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues. *Platelets*. enero de 2002;13(5-6):301-6

8- ANEXOS

Anexo 1: Carta aval de la institución.

Anexo 2: Registro de autorización de proyectos de investigación en seres humanos en MSP.

Anexo 3: Resolución del Comité de Ética.

Anexo 4: Aprobación por MSP del ensayo clínico LEP.



HOSPITAL DE CLÍNICAS
Dr. Manuel Quintela



Montevideo, **02 JUN 2020**

La Dirección del Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela" otorga el aval Institucional al Proyecto titulado: "Análisis del control de calidad de productos derivados de plaquetas elaborados en el marco de un ensayo clínico para el tratamiento del Liquen Escleroso Peneano", y el protocolo de dicha investigación.

Monografía de pregrado, grupo número 8 del curso de Metodología Científica II, integrado por: Br. Ituarte, Noelia; Br. Pedraja, Paula; Br. Pouso, María; Br. Rodriguez, Nadia, Br. Segredo, Florencia; Br. Tourn, Jennifer. Los tutores responsables de la investigación son Prof. Agda. Dra. Touriño, Cristina; Asist. Echarte, Lourdes y Asist. Posada, Marianela.

Prof. Dra. Marina Stoll
Directora Técnica
Hospital de Clínicas

CT/M



Ministerio
de Salud Pública

**Dirección General de la Salud
División Evaluación Sanitaria**

Solicitud de registro/autorización de proyectos de investigación en seres humanos

Montevideo, 28-05-2020.

Constancia de Solicitud de Registro de Proyecto

El presente documento hace constar que el proyecto: Análisis del control de calidad de productos derivados de plaquetas elaborados en el marco de un ensayo clínico para el tratamiento del Liquen Escleroso Peneano fue ingresado el día 28-05-2020, bajo el Nro. 788862 con los siguientes datos:

Datos del investigador coordinador del proyecto

Nombre: Maria Pouso

Documento de identidad: cedula : 48936459

Institución a la cual pertenece: Facultad de Medicina

Función en el proyecto: Autor

Correo electrónico: victoria.pouso@hotmail.com

Teléfono de contacto: 098461131

“Esta constancia no implica la aprobación del protocolo registrado ni la autorización para su realización”

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
HOSPITAL DE CLÍNICAS
"DR. MANUEL QUINTELA"
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE COMISIONES
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Montevideo, 24 de Junio de 2020

Se transcribe resolución del Comité de Ética del Hospital de Clínicas de fecha 24 de Junio de 2020

En relación al proyecto presentado por el Departamento Básico de Medicina

"Análisis del control de calidad de productos derivados de plaquetas elaborados en el marco de un ensayo clínico para el tratamiento del Liquen Escleroso Peneano"

Investigadores Responsables: Dra. Cristina Touriño; Bres. Noelia Ituarte, Paula Pedraja, María Pouso, Nadia Rodríguez, Florencia Segredo, Jennifer Tourn

El Comité de Ética de la Investigación del Hospital de Clínicas resuelve aprobar la realización de este proyecto en esta Institución.

La aprobación otorgada por este Comité de Ética es desde el 24 de Junio de 2020 hasta la fecha de finalización del mismo.

Prof. Dr. Raúl Ruggia
Coordinador del Comité de Ética de la Investigación

Integrantes del Comité de Ética del Hospital de Clínicas

Prof. Dr. Raúl Ruggia	Coordinador – Ex Director de Neuropediatría
Dra. Gabriela Ballerio	Abogada- Asistente Académica de Dirección
Prof. Adj. Dra. Aurana Erman	Ex- Profesora Adjunta de Neurocirugía Especialista en Medicina Legal
Prof. Agda. Lic. Enf. Inés Umpiérrez	Integrante Licenciada en Enfermería
Prof. Adj. Dra. Leticia Cuñetti Terapéutica	Ex- Profesora Adjunta de Farmacología y Especialista en Nefrología y Farmacología
Lic. Psic. Sandra Torres	Secretaría Administrativa
Lic. C. P. Nadia Almeida	Secretaría Administrativa

Ministerio de Salud Pública
Dirección General de la Salud

VISTO: la gestión promovida por el Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”;

RESULTANDO: que solicita autorización para la realización del estudio clínico titulado: “Plasma rico en plaquetas autólogo para el tratamiento de liquen escleroso peneano resistente a terapia convencional: un estudio piloto” Estudio piloto de una sola rama a llevarse a cabo en el Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” en pacientes con liquen escleroso peneano resistente a terapia convencional, de acuerdo al Protocolo versión 3.0 de 22 de diciembre de 2017, a cargo de la Dra. Cristina Touriño en carácter de Investigadora Principal y los Dres. Jorge Navarrete, Alexandra Sujanov y Caroline Agorio en carácter de co-investigadores;

CONSIDERANDO: I) que la realización del mismo cuenta con el aval del Comité de Ética y Dirección del referido Hospital;

II) que según lo expresado por la Comisión Nacional de Ética en Investigación y la División Evaluación Sanitaria, no existen objeciones en acceder a lo solicitado;

ATENTO: a lo expuesto y a lo establecido en el Artículo 2º y concordantes de la Ley N° 9.202 “Orgánica de Salud Pública” de 12 de enero de 1934 y en la Ordenanza Ministerial N° 19 de 11 de enero de 2018;

LA DIRECCIÓN GENERAL DE LA SALUD

en ejercicio de las atribuciones delegadas

RESUELVE:

- 1º) Autorízase al Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela”, la realización del estudio titulado: “Plasma rico en plaquetas autólogo para el tratamiento de liquen escleroso peneano resistente a terapia convencional: un estudio piloto” Estudio piloto de una sola rama a llevarse a cabo en el Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” en

pacientes con líquen escleroso peneano resistente a terapia convencional, de acuerdo al Protocolo versión 3.0 de 22 de diciembre de 2017, a cargo de la Dra. Cristina Touriño en carácter de Investigadora Principal y los Dres. Jorge Navarrete, Alexandra Sujanov y Caroline Agorio en carácter de co-investigadores.

2º) Dispónese que la Investigadora Principal, Dra. Cristina Touriño informará, en los plazos previstos los informes de avance y los resultados obtenidos a la División Evaluación Sanitaria.

3º) Establécese que la responsabilidad por la producción, control de calidad y uso del referido producto será compartida solidariamente por la Investigadora Principal Dra. Cristina Touriño y el Dr. Ismael Rodríguez.

4º) Comuníquese. Tomen nota la Dirección General de la Salud, la Comisión Nacional de Ética en la Investigación y la División Evaluación Sanitaria. Cumplido, archívese.

Ref. N° 001-5118/2017

/MPT