



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DOCTOR EN MEDICINA**

**Control de calidad de plasma rico en  
plaquetas para tratamiento de úlceras  
venosas crónica**

**Ciclo de Metodología Científica II-2020 - Grupo 58**

Br. Diego Ardao<sup>1</sup>, Br. Enrique Cadenas<sup>1</sup>, Br. Maikol González<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>, Br. Esteban Lujan<sup>1</sup>, Br. Agustina Pavesio<sup>1</sup>, Br. Maria Belen  
Sartore<sup>1</sup>, Dr. Marianela Posada<sup>2</sup>, MSc. Lourdes Echarte<sup>2</sup>, Dr. Cristina Touriño<sup>3</sup>

1. Estudiantes de la Facultad de Medicina, UdelaR.
2. Asistente de la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en el Hospital de Clínicas “Doctor Manuel Quintela”.
3. Prof. Agda de la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en el Hospital de Clínicas “Doctor Manuel Quintela”.

## **CONTENIDO**

### **Páginas**

<b>1.RESUMEN.....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>9</b>
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>10</b>
<b>5. PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>10</b>
<b>6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>12</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>17</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>19</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>21</b>

## 1. RESUMEN

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un producto obtenido de la sangre compuesto por plasma con un contenido de plaquetas superior al nivel basal en sangre. Se plantea que el PRP potencia el proceso fisiológico de cicatrización a través de la liberación de factores de crecimiento plaquetarios. Su utilización es innovadora, aunque no existe adecuada estandarización de su preparación y posología de administración.

En este trabajo se realiza el análisis del control de calidad del PRP utilizado en el tratamiento de úlceras venosas.

**Objetivo general:** Analizar la calidad del Plasma Rico en Plaquetas elaborado en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas en el marco del ensayo clínico “Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo”. Como **objetivos específicos** se analizaron parámetros básicos de calidad vinculados a la pureza, la potencia, y la seguridad del producto.

**Metodología:** Estudio unicéntrico, observacional, descriptivo, transversal. Se analizaron los parámetros de potencia como el factor de enriquecimiento (FE), la masa plaquetaria y el número de plaquetas totales, parámetros de seguridad a través de la detección de contaminación microbiológica por cultivos bacteriológicos, y parámetros de pureza como la contaminación por eritrocitos y leucocitos. Se analizaron 91 productos de PRP.

**Resultados:** No se detectó contaminación bacteriana en la mayoría de los productos. Solo un producto dio positivo para *Staphylococcus warneri*, agente patógeno de la flora cutánea. Se obtuvo un FE entre 2 y 3 en 58,3% de los productos, por debajo de 2 en 33,3%, y no se obtuvieron datos en 3,1%. La media de la masa plaquetaria fue de  $2990 \times 10^3$  con DE de  $1800,8 \times 10^3$  y la media global del número de plaquetas totales fue de  $3749,6 \times 10^3$  plaquetas con DE de  $2897,2 \times 10^3$ .

El estudio de la pureza mostró 153 veces menos hematíes en el PRP que el hemograma basal y un recuento leucocitario medio 2,5 veces menor que el recuento en sangre periférica.

**Conclusiones:** Se realizó el análisis de calidad del PRP, mostrando que los productos obtenidos cumplen con los criterios básicos de calidad para uso terapéutico.

**Palabras clave:** Plasma rico en plaquetas. Factores de Crecimiento. MARSPILL. Control de Calidad.

### **ABSTRACT**

Platelet-rich plasma (PRP) enhances the physiological healing process, its use is innovative, although it lacks adequate standardization of preparation and administration dosage.

In this work, the analysis of the quality control of the PRP is carried out, due to the scarcity of scientific evidence on the adequate parameters for the management of this technique.

**General objective:** To analyze the quality of the Platelet Rich Plasma prepared in the Cell Therapy Unit of the Hospital de Clínicas within the framework of the clinical trial "Treatment of chronic venous ulcers of the lower limbs with autologous platelet rich plasma". Purity, potency, and safety were analyzed as **specific objectives**.

**Methodology:** Single-center, observational, descriptive, cross-sectional study. Potency parameters such as enrichment factor (EF), platelet mass and number of total platelets, safety parameters through the detection of microbiological contamination by bacteriological cultures, and purity parameters such as contamination by erythrocytes and leukocytes. 91 PRP products were analyzed.

**Results:** Bacterial contamination by *Staphylococcus warneri*, a pathogen of the skin flora, was found in one case. An EF between 2-3 was obtained in 58.33% of the products, below 2 in 33.33%, and no data was obtained in 3.12% of the products. The mean platelet mass was 2990 x106 with a DS of 1800.8 x106 and the global mean of the number of total platelets was 3749.6 x106 platelets with a DS of 2897.2 x106.

The purity study showed 153 times fewer red blood cells in the PRP than the baseline blood count and a mean white blood cell count 2.5 times lower than the peripheral blood count.

**Conclusions:** The quality analysis of the PRP was carried out, demonstrating that products suitable for therapeutic use were obtained.

**Key words:** Platelet-rich plasma. Growth Factors. QA.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El plasma rico en plaquetas (PRP) se define como la fracción de plasma que tiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal<sup>(2)</sup>. Se plantea que el PRP podría incrementar el reclutamiento de distintos tipos celulares que participan en el proceso de reparación de los tejidos, mimetiza y potencia los eventos que suceden durante el proceso fisiológico de cicatrización debido a sus concentraciones suprafisiológicas de plaquetas y la liberación de factores de crecimiento contenidos en sus gránulos plaquetarios. Estas sustancias favorecen la cicatrización al atraer células diferenciadas a la recientemente formada matriz y estimulan su división. Asimismo promueven la capilarogénesis, aceleran la re-epitelización e interactúan con macrófagos favoreciendo la curación y regeneración de tejido dañado.

El PRP no solamente contiene plaquetas sino que también posee leucocitos, hematíes, proteínas de secreción y factores de crecimiento liberados de los gránulos plaquetarios<sup>(2)</sup>. Entre estos últimos se podrán encontrar el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), cada uno de ellos con diferentes mecanismos de acción que actúan en diferentes blancos. En la figura 1 se muestran las principales moléculas contenidas en los gránulos alfa plaquetarios y su función en la regeneración tisular. Al día de hoy, no hay evidencia que sostenga que la presencia de leucocitos en los preparados de PRP favorecen o no el proceso de regeneración<sup>(3)</sup>. Hay autores que indican que podría ser un factor protector frente a infecciones y otros que sostienen que los neutrófilos podrían liberar sustancias tóxicas a nivel celular no selectivas.<sup>(3)</sup>

El PRP se puede clasificar según su concentración de leucocitos y fibrina. Se clasifican en Plasma Rico en Plaquetas Puro o sin leucocitos (PRP-Plasma rico en plaquetas y leucocitos (L-PRP), plasma rico en plaquetas pobre en leucocitos y rico en fibrina (P-PRF) y el Plasma rico en plaquetas, leucocitos y fibrina (L-PRF), figura 2.

Molécula	Funciones
PDGF	Estimula la síntesis de proteínas, induce la quimiotaxis, estimula producción de IGF-1, y factores proangiogénicos. <sup>2</sup>
VEGF	Mayor inductor de la angiogénesis <sup>12</sup>
FGF	Estimula la reepitelización, angiogénesis, formación del tejido de granulación, acelera la regeneración. <sup>8</sup>
HGF	Regula el ciclo celular, estimula la reparación epitelial, la formación de tejido de granulación y angiogénico. <sup>13</sup>
IGF-1	Estimula la proliferación y diferenciación celular y síntesis de colágeno. <sup>6</sup>
EGF	Estimula el crecimiento, migración y diferenciación de queratinocitos. <sup>14</sup>
TGF- $\beta$	Factor más importante en la regeneración, induce la quimiotaxis, promueve la diferenciación de fibroblastos, formación de la MEC, contracción de la herida, aumenta proliferación de células epiteliales. <sup>6, 9</sup>
PF4	Estimula la inflamación, interviene en la hemostasis. <sup>15, 16</sup>
PDAF, PDEFG y ECGF	Promueven la angiogénesis. <sup>17, 18, 19</sup>
IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$	Proinflamatorios / Antiinflamatorios. <sup>6</sup>
Fibrinógeno, vitronectina, fibronectina, Factor von Willebran y trombospondina	Participan en la formación del trombo, estimulan la adhesión de células y promueven la mitosis. <sup>15, 20</sup>

Abreviaturas: factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF; factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF; factor de crecimiento de fibroblastos, FGF; matriz extracelular, MEC; factor de plaquetas 4, PF4; factor angiogénico derivado de plaquetas, PDAF; factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas, PDEFG; factor de crecimiento de células epiteliales derivado de plaquetas, ECGF; interleucina, IL; factor de necrosis tumoral, TNF.

**Figura 1. Principales moléculas contenidas en los gránulos alfa plaquetarios y su función en la regeneración tisular. Extraído de: Castro-Piedra, Arias-Varela. Actualización en plasma rico en plaquetas. Acta médica costarricense, 2019**

Recientemente se realizó un nuevo sistema de clasificación, denominado MARSPILL, que utiliza más variables. En la clasificación de MARSPILL se considera el método de preparación (M), el uso de un activador exógeno (A), la presencia o ausencia de eritrocitos (R), la velocidad de centrifugación (S), el enriquecimiento plaquetario (P), la guía por imágenes para la correcta aplicación del PRP cuando corresponda (I), la presencia o ausencia de leucocitos (L) y el uso de activación de luz (L), figura 3 <sup>(23)</sup>.

Clasificación	Presencia de leucocitos	Arquitectura de fibrina
PRP Puro (P-PRP)	No	Baja densidad
Plasma rico en plaquetas y en leucocitos (L-PRP)	Sí	Baja densidad
Fibrina rica en plaquetas pura (P-PRF)	No	Alta densidad
Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (L-PRF)	Sí	Alta densidad

**Figura 2. Clasificación del PRP según su contenido de leucocitos y fibrina. Extraído de: Castro-Piedra, Arias-Varela. Actualización en plasma rico en plaquetas. Acta médica costarricense, 2019**

Letra	Representación	Tipo
M	Método	Manual (H), automático (M)
A	Activación	Activado (A+), no activado (A-)
R	Eritrocitos	Rico (RBC-R), pobre (RBC-P)
S	Centrifugación (spin)	Uno (Sp1), dos (Sp2)
P	Número de plaquetas	PL 2-3, PL 4-6, PL 6-8, PL 8-10
I	Guía por imágenes	Guiado (G+), no guiado (G-)
L	Concentración de leucocitos	Rico (Lc-R), pobre (Lc-P)
L	Activación de luz	Activado (A+), no activado (A-)

**Figura 3. Clasificación de MARSPILL. Extraído de: Castro-Piedra, Arias-Varela. Actualización en plasma rico en plaquetas. Acta médica costarricense, 2019**

Existen varios protocolos de preparación del PRP. Habitualmente el PRP se obtiene a partir de una extracción de sangre periférica. Esto se puede hacer con el uso de kits desechables, “técnica cerrada”, o mediante una forma manual, “técnica abierta”, manteniendo estrictas condiciones de asepsia y esterilidad. En ambos modelos la sangre es posteriormente sometida a procesos de centrifugación y separación de los elementos formes de la sangre según su densidad. Dependiendo de las diferentes configuraciones de estos procedimientos se pueden obtener distintos preparados de PRP<sup>(5)</sup>. Posteriormente, el PRP deberá ser activado para que sus gránulos alfa liberen sus mediadores quimiotácticos y cumplan con su mecanismo de acción estimulando la regeneración tisular<sup>(6)</sup>. Para ello se utiliza la adición de trombina exógena, cloruro cálcico(Cl<sub>2</sub>Ca) o gluconato de calcio.<sup>(7)</sup> El PRP puede ser aplicado por vía intradérmica, subdérmica, intralesional o inclusive en forma líquida o gelificado.<sup>(7)</sup>

Se destaca que existe una gran heterogeneidad en los productos de PRP utilizado con diversidad de métodos de preparación (sistemas automatizados y manuales), composición del producto final (concentración final de plaquetas, presencia o ausencia de leucocitos o eritrocitos, entre otros), las formas de activación (cloruro de calcio, gluconato de calcio, trombina), o bien, la formulación del producto final (líquido, gel o membrana). A esto se agrega, la posología de administración: dosis, frecuencia, vía. Tal y como se ha mencionado, todas estas variables en conjunto, incidirán directamente sobre el tipo y cantidad de los factores de crecimiento liberados, lo que afectará los resultados obtenidos para cada una de las diferentes condiciones clínicas <sup>(23)</sup>.

Durante el procesamiento del PRP se deberá aplicar parámetros que aseguren la calidad del producto. Las especificaciones de calidad que se requieren para los productos de terapia celular tiene que ver con determinados parámetros: 1) Potencia, con la cual evaluamos que el producto posee la función biológica necesaria para cumplir su acción; 2) Pureza, parámetro que trata de determinar sustancias no deseadas como contaminantes, y; 3) Seguridad, importante para comprobar que el producto no contenga agentes patógenos, como pueden ser microorganismos infecciosos entre otros. Estos parámetros de calidad básicos son aplicables a todos los productos biológicos <sup>(21)</sup>.

Desde la primera aplicación del PRP en el tratamiento de úlceras cutáneas en 1980, su uso se fue diversificando hacia una gran cantidad de terrenos de la medicina y para distintas aplicaciones. Entre estas áreas clínicas se encuentran patologías músculo-esqueléticas, heridas

quirúrgicas, úlceras crónicas, quemaduras, oftalmología, otorrinolaringología, cirugía estética y nervios periféricos.<sup>(5)</sup>

Las úlceras venosas crónicas de miembros inferiores (UVC MMII) son una afección frecuente, con alta incidencia en la población adulta. A pesar de un correcto tratamiento etiológico, y de contar con un gran abanico de opciones terapéuticas, existe un porcentaje de pacientes con evolución tórpida o refractaria a estos tratamientos, lo cual los transforma en un gran reto terapéutico<sup>(1)</sup>. Una de las nuevas opciones terapéuticas para estos pacientes podría ser el tratamiento con plasma rico en plaquetas. Se han puesto en práctica, entonces, múltiples ensayos clínicos que buscan evaluar la eficacia del PRP en UVC MMII refractarias a los tratamientos convencionales, destacando que aún no existe consenso en cuanto a su beneficio.

Para la obtención del PRP en el Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa (ATCMR-HC) se realiza la técnica de doble centrifugación con la cual se busca obtener un preparado con una mayor concentración de plaquetas que el recuento plaquetario basal de sangre periférica, obtenida a través del sistema cerrado al vacío Vacutainer. Al realizar estas centrifugaciones sucesivas, se obtienen al menos  $2,5-1000 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  suspendidas en plasma (de 2 a 7 veces el valor basal); cifra tomada como definición de PRP.<sup>(22)</sup> Mediante gluconato de calcio se realiza la activación plaquetaria como paso previo a disponerlo sobre la lesión.

Este trabajo está enfocado en el análisis de calidad del PRP elaborado en el marco de un ensayo clínico: “Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo”

## **2.1 JUSTIFICACIÓN**

La utilización de PRP es un tratamiento innovador, que a nivel internacional cada vez tiene mayor utilización pero sin la adecuada estandarización de la posología de administración.

Al día de hoy se han llevado a cabo numerosos ensayos clínicos que evalúan el uso de PRP en diversas afecciones. A pesar de ello existe una diversidad de opiniones con respecto a su uso, algunos autores justifican que el uso de PRP es beneficioso<sup>(2)(9)</sup>, pero por otro lado, múltiples estudios concluyen que, con los datos obtenidos no hay evidencia suficiente para confirmar que el tratamiento con PRP sea más beneficioso que el tratamiento convencional.<sup>(10-11)</sup> Una de las razones por las cuales no se puede llegar a un consenso universal es debido a que no existe una

estandarización del producto tanto en el método de preparación, clasificación del producto final y forma de aplicación.<sup>(12-14)</sup> Esto determina la importancia de realizar un adecuado control de calidad de los productos con el fin de conocer la calidad del producto administrado, poder realizar un correcto análisis estadístico de los resultados obtenidos y poder extraer conclusiones del ensayo clínico.<sup>(8)</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL:**

- o Analizar la calidad del Plasma Rico en Plaquetas elaborado en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas en el marco del ensayo clínico “Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo”.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- o Determinar la presencia de contaminación microbiológica, como parámetro de seguridad del producto.
- o Analizar el factor de enriquecimiento del producto final (PRP), como parámetro de potencia del producto.
- o Cuantificar hematíes y leucocitos presentes en el producto final, como parámetro de pureza del producto.
- o Identificar factores que pueden haber influenciado en el rendimiento del PRP.

#### **4. METODOLOGÍA**

Se realizó un estudio unicéntrico en el Hospital de Clínicas “Doctor Manuel Quintela”, en el Área de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, observacional, descriptivo, transversal. El mismo cuenta con el aval del Comité de Ética del Hospital de Clínicas y fue registrado en el Ministerio de Salud Pública (Ver Anexos 1 y 2). Cabe destacar que la recolección de datos fue retrospectiva porque se trata de muestras tomadas anteriormente. Se incluyeron los datos anonimizados obtenidos del registro de productos biológicos de origen humano elaborados en la Unidad de Terapia Celular y Regenerativa del Hospital de Clínicas.

#### **5. PROCEDIMIENTO**

Se analizaron las diferentes características del plasma rico en plaquetas elaborado en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas para su uso en el ensayo “Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo”.

A través de una base de datos anonimizada se analizaron los parámetros de los productos obtenidos de cada paciente que participó del ensayo clínico. Nuestra población de estudio fueron todos los productos de PRP obtenidos en el ensayo clínico, teniendo un N total de 91.

Las variables analizadas fueron:

- Factor de enriquecimiento (FE): Parámetro de potencia. Se define como el cociente entre el recuento plaquetario en el producto final (PRP) y el recuento plaquetario inicial en sangre periférica del paciente. Para evaluar el enriquecimiento en todo el proceso de producción se evaluó el recuento plaquetario inicial (en Sangre Periférica), el recuento plaquetario en la fracción intermedia (F1) y en el producto final.
- Masa plaquetaria: definida como el producto de la concentración plaquetaria con el volumen plaquetario medio (VPM). Parámetro de potencia
- Número de plaquetas totales (NPT) en PRP: Definido como el producto de la concentración plaquetaria y el volumen total en el PRP. Parámetro de potencia.
- Presencia de agregados plaquetarios: Parámetro de potencia.
- Presencia o no de microorganismos patógenos: Parámetro de la seguridad del producto. Se evaluó la presencia o no de contaminación bacteriana a través de los resultados de cultivos realizados al PRP.

- Recuento leucocitario, recuento de hematíes y presencia de hemoglobina libre en el PRP: Parámetro de la pureza del producto.
- Presencia o no de hemólisis: valorando el aspecto macroscópico del producto, como parámetro de pureza.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados a través de medidas de tendencia central como la media y de dispersión como la varianza y desvío estándar. Se realizó test t student para analizar si existían diferencias significativas entre la concentración de plaquetas en PRP en relación con la concentración de SP en cada paciente considerando un p significativo menor a 0.05. Para este trabajo se realizó la búsqueda bibliográfica acerca del tema en buscadores calificados.

## 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los datos para la realización de este estudio fueron proporcionados en una planilla anonimizada. Se analizaron 91 muestras de PRP, que fueron administrados a 7 pacientes (denominados P1 a P7) incluidos en el proyecto “*Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con Plasma Rico en plaquetas autólogo*”. A cada paciente se le realizó entre 6 y 12 aplicaciones de PRP por úlcera a tratar. En la tabla 1 se muestran los valores hematimétricos promedios y desvíos estándares obtenidos de los hemogramas basales, fracción 1 (F1) y PRP a través de equipos automatizados de los pacientes incluidos en el estudio.

**Tabla 1: Valores hematimétricos promedios y desvíos estándares de los hemogramas de los pacientes incluidos en el estudio y de sus productos (n=91).**

	<b>Media</b>	<b>Desvío estándar (DE)</b>
<b>Recuento plaquetario en SP (<math>\times 10^3/\text{ul}</math>)</b>	240.7	43.9
<b>Hemoglobina en SP (g/dl)</b>	13.86	1.39
<b>Recuento Glóbulos Rojos (millones/ml) en SP</b>	4.65	0.49
<b>Leucocitos en SP (<math>\text{mil}/\text{mm}^3</math>)</b>	6.68	1.76
<b>Volumen de SP obtenido (ml)</b>	38.53	21.71
<b>Recuento plaquetario F1 (<math>\times 10^3/\text{ul}</math>)</b>	333.45	290.10
<b>Recuento plaquetario en PRP (<math>\times 10^3/\text{ul}</math>)</b>	526.15	217.06
<b>Volumen de PRP obtenido (ml)</b>	6.79	4.74
<b>Recuento leucocitos en PRP (<math>\times 10^3/\text{ul}</math>)</b>	2.64	3.17
<b>Recuento de Glóbulos rojos (<math>\text{mill}/\text{mm}^3</math>)</b>	0.03	0.03
<b>Hemoglobina en PRP (g/dl)</b>	0.01	0.06
<b>Volumen plaquetario medio en PRP (fl)</b>	6.02	0.97

SP: Sangre Periférica. F1: fracción 1. PRP: Plasma rico en plaquetas.

### Análisis de seguridad

En el análisis de la seguridad del producto se evidenció la ausencia de contaminación microbiana en el 99 % de los productos (n=90), y en el 1% de los productos (n=1) se detectó contaminación microbiológica, en este caso el agente contaminante fue el *Staphylococcus warneri*, el cual es un agente comúnmente presente en la flora epitelial. El análisis microbiológico fue llevado a cabo a través del sistema Bact Alert con resultados a los 5 días del cultivo.

### **Análisis de potencia**

Los parámetros de potencia analizados fueron el factor de enriquecimiento (FE), la masa plaquetaria (MP) y el número de plaquetas totales (NPT).

Del total de 91 productos se determinó el FE de 88 productos, la MP en 85 productos y el NPT en 89 productos; esto se debe a que en algunos casos faltaron datos de valores hematimétricos tanto del hemograma del paciente como del producto de PRP en la planilla proporcionada. La media del FE global fue de 2.2 con un desvío estándar de 0.8. Del total de pacientes, 3 obtuvieron un PRP con FE promedio por encima de la media global, mientras que los 4 restantes estuvieron por debajo de esta. Con respecto al total de los productos, el factor de enriquecimiento fue de entre 2-3 en un 58.3% de los productos, por debajo de 2 en un 33.3% y en un 3.12% no se obtuvieron datos.

A su vez, la potencia fue evaluada a través de un test de “t” de student comparando el recuento plaquetario en sangre periférica con el recuento plaquetario en el PRP. Se demostró con un intervalo de confianza del 95% con un valor P significativo de 0.0189 de que la concentración de plaquetas es mayor en el PRP que en sangre periférica.

La media de la masa plaquetaria fue de  $2990 \times 10^3$  con un DE de  $1800.8 \times 10^3$  y la media global del número de plaquetas totales fue de  $3749.6 \times 10^3$  plaquetas con un DE de  $2897.2 \times 10^3$ . En la tabla 2 se muestra la media de los FE obtenidos de cada paciente, masa plaquetaria y N° de plaquetas totales con sus respectivos desvíos.

**Tabla 2. Caracterización de los productos aplicados a cada paciente (FE, MP, NTP expresados en medias y desvíos estándar).**

	<b>P1</b> (n=5)	<b>P2</b> (n=12)	<b>P3</b> (n=10)	<b>P4</b> (n=22)	<b>P5</b> (n=12)	<b>P6</b> (n=18)	<b>P7</b> (n=9)
<b>FE</b>	1.2 ±1.0	2.1 ±0.5	2.0 ±1.0	2.2±0.61	1.6±0.8	2.5± 0.5	3.1± 0.7
<b>MP</b> (x10 <sup>3</sup> / fl)	634.8 ± 671.2	4417.3 ± 1368.1	1657.9± 1310.1	3132.33± 2145.8	2224.9 ± 1264.5	3042.6 ± 594.2	4679.7 ±1384.2
<b>NPT (x10<sup>3</sup>)</b>	655.0 ± 698.5	6240.3 ± 3546.9	1304.5 ± 1161.1	4431.48 ± 2859.0	1574.9 ±845.5	5048.1± 2717.1	3554.6 ±1019.4

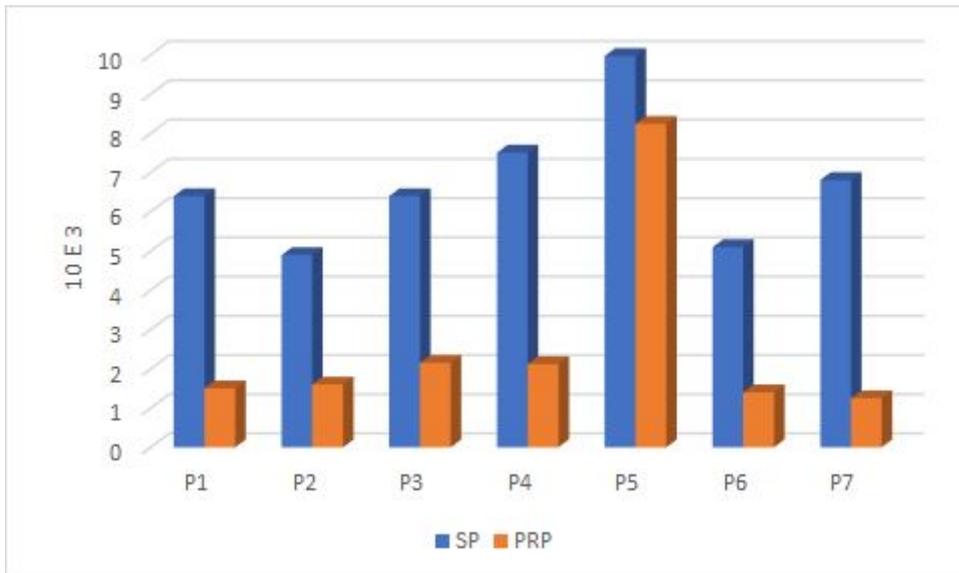
*FE: Factor de Enriquecimiento, MP: Masa Plaquetaria, NPT: Número Total de Plaquetas, P1: paciente 1, P2: paciente 2, P3: paciente 3, P4: paciente 4, P5: paciente 5, P6: paciente 6, P 7: paciente 7*

### **Análisis de la pureza**

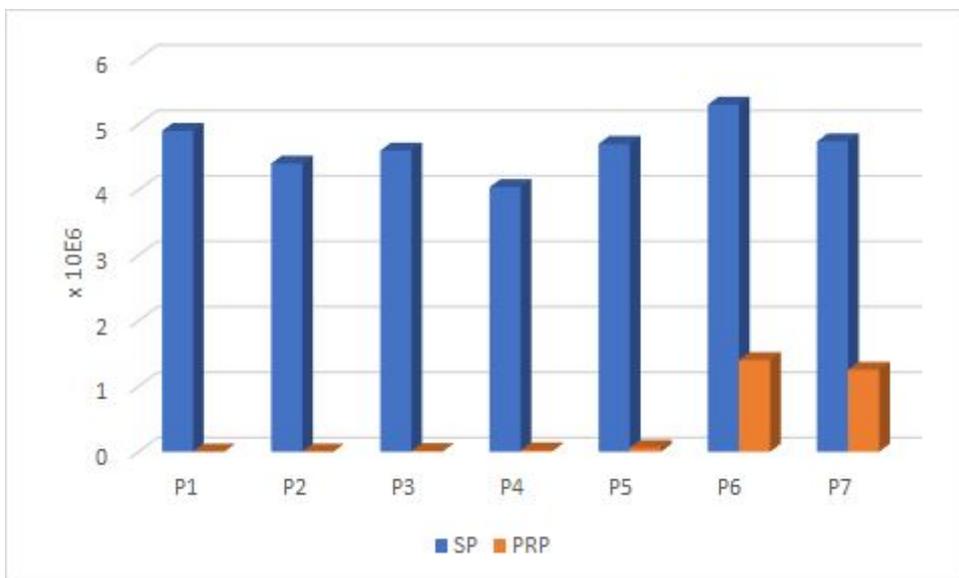
Para evaluar la pureza del producto final, se valoró la presencia o ausencia de contaminación con leucocitos, hematíes y hemoglobina tomando en cuenta los recuentos basales en los hemogramas de los pacientes y los recuentos en el PRP.

Con respecto a la contaminación leucocitaria del PRP se evidenció una concentración de leucocitos en PRP media 2.5 veces menor que el recuento en SP. En cuanto a la concentración de hematíes en el PRP se evidenció una disminución media de 153 veces con respecto al recuento en el hemograma basal.

En la figura 4 se representa la concentración media de leucocitos en SP y en PRP, y en la figura 5 se representa la concentración media de eritrocitos en SP y en el PRP de cada paciente.



**Figura 4: Concentración media de leucocitos en SP y en PRP de cada paciente. En el eje de las y se muestra la concentración media de leucocitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$**



**Figura 5: Concentración media de eritrocitos en SP y en los productos de PRP de cada paciente. En el eje de las y se muestra media de eritrocitos  $\times 10^6/\text{mm}^3$**

Con respecto al análisis macroscópico del producto final, no se evidenció la presencia de hemólisis en ninguno de los productos según los datos proporcionados. En 9 productos se registró la presencia de microagregados y macroagregados plaquetarios.

## **7. DISCUSIÓN**

La preparación del PRP difiere según los diferentes protocolos utilizados, lo cual puede generar productos divergentes en su contenido de células y factores de crecimiento y por lo tanto en su funcionalidad. La definición de PRP requiere la presencia de al menos  $250-1000 \times 10^3$  plaquetas/ul suspendidas en plasma (2-7 veces superior al recuento basal)<sup>23</sup>. Algunos trabajos evidencian que menores concentraciones plaquetarias no tienen efecto fisiológico y mayores concentraciones no incrementan la respuesta biológica, y podría tener efectos inhibitorios en la regeneración de las heridas<sup>23</sup>. Asimismo, por ser un producto de origen biológico debe ser procesado por personal capacitado, ya que no está exento de riesgos. Una adecuada estandarización de su producción permite cumplir con objetivos determinados y obtener resultados más veraces en los ensayos clínicos que utilizan estos productos. Como se mencionó anteriormente existen diferentes métodos de clasificación del PRP. Según la clasificación de MARSPILL se obtuvieron productos procesados de forma manual (M, los productos fueron obtenidos a través de centrifugaciones y fue manipulado bajo cabina de flujo laminar), activados (previo a su utilización, A+), pobres en contenido de eritrocitos (RBC-P, definidos como aquellos productos que contienen un recuento de glóbulos rojos al menos 15 veces inferior al recuento en SP), obtenidos por 2 centrifugaciones (Sp2), con un factor de enriquecimiento medio entre 2 y 3 (PL 2-3), con una aplicación no guiada por imagen (G-), pobre en leucocitos (Lc-P, definido como aquellos productos con recuento leucocitario inferior que el recuento basal), sin activación por la luz (A-). Se destaca la homogeneidad de los productos obtenidos en el ensayo clínico según MARSPILL.

Dentro de los objetivos, nos planteamos evaluar la seguridad del producto final, el parámetro utilizado para tal fin fue el estudio de la contaminación microbiológica. Del total de 91 muestras obtenidas, se aisló un microorganismo en un único producto, probándose la presencia de *Staphylococcus warneri*. Este mismo es un germen residente de la microbiota de la piel lo que nos lleva a hipotetizar sobre las posibles causas de contaminación, como por ejemplo una inadecuada asepsia de la piel del paciente previo a la extracción de sangre o la manipulación incorrecta en la preparación del producto, como por ejemplo el no mantenimiento de las condiciones estrictas de esterilidad, o la contaminación al obtener la muestra para cultivo para

su envío al laboratorio.

Durante el estudio de la potencia se verificó que 58,3% de los productos obtuvieron un FE entre 2 y 3 y un 33,3% del total por debajo de 2, dentro de las posibles causas de esta variabilidad podríamos considerar la presencia de microagregados y macroagregados plaquetarios observados en algunos productos. Aunque no se pudo obtener evidencia significativa sobre el efecto de macroagregados sobre el producto final debido a la falta de registro de datos de todos los productos, consideramos que la presencia de estos podrían influenciar en los resultados del factor de enriquecimiento. Basado en los pocos datos recolectados, se registró la presencia de macroagregados en un total de 9 productos y de estos un 88,8% presentaron un factor de enriquecimiento menor a 2,0. Pensamos que en estos productos el enriquecimiento debió ser mayor, y que los recuentos plaquetarios obtenidos por el contador automático no fueron reales, lo cual determinó una subestimación del factor de enriquecimiento plaquetario. Para complementar y determinar adecuadamente la potencia de los productos elaborados se debería realizar la cuantificación de los factores de crecimiento presentes en el PRP, cuyos resultados no son dependientes de la presencia de macroagregados o evaluar su actividad biológica en ensayos biológicos celulares.

## **8. CONCLUSIONES**

La elaboración de productos biológicos como herramienta terapéutica hace necesaria la estandarización de su procesamiento, de modo tal de obtener un producto homogéneo y reproducible. Esto garantiza que el rendimiento del PRP no se vea modificado por determinadas variables, y de esta forma poder confiar en ciertos aspectos como la potencia, seguridad y pureza de la técnica. De esta forma, los resultados terapéuticos de la aplicación de estos productos no se verán afectados por esta variable.

En este trabajo se realizó el análisis de la calidad del Plasma Rico en Plaquetas elaborado en la Unidad de Terapia Celular del Hospital de Clínicas en el marco del ensayo clínico “Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo”, mediante un estudio observacional, descriptivo, y transversal, con una recolección de datos retrospectiva.

Con respecto a la evaluación del parámetro de seguridad del PRP, se analizó la presencia de microorganismos patógenos mediante cultivos microbiológicos, donde se obtuvo ausencia de contaminación en el 99% de las muestras estudiadas. La medición del factor de enriquecimiento

evidenció una potencia media muestral de 2 - 3 en la clasificación MARSPILL. En la evaluación del parámetro de pureza, se contabilizaron valores bajos de hematíes y leucocitos, por lo tanto se clasificó al PRP como: pobre en glóbulos rojos y pobre en leucocitos por lo cual podemos decir que se obtuvo un producto con una pureza adecuada. Dentro de los factores que pueden influenciar el rendimiento del PRP, se destacan: agentes microbianos contaminantes y la presencia de macro y microagregados plaquetarios. Se obtuvieron productos que cumplen con los parámetros establecidos para su uso terapéutico.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Cacua Sánchez T. Experience in the Management of Patients with Chronic Vascular Ulcers of the Lower Limbs Using Negatively Charged Polystyrene Microspheres. *Int J Vasc Med* 2020 Jan 22;2020:3673657.
2. Schwartz, A. Martínez- Sánchez, G. Re, L. (2011). Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Revista Española de Ozonoterapia*. Vol.1, nº 1, pp. 54-73
3. Perez, A., y cols., Relevant Aspects of Centrifugation Step in the Preparation of Platelet-Rich Plasma, *International Scholarly Research Notices*, 2014.
4. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27(3):158-167. doi:10.1016/j.tibtech.2008.11.009
5. Carrillo-Mora P, González-Villalva A, Macías-Hernández SI, et al. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa. *Cir Cir.* 2013;81(1):74-82.
6. Quintana Pineda, Jeannine Maria. Eficacia del plasma enriquecido en plaquetas como tratamiento en úlceras por insuficiencia venosa en miembros inferiores vs. cura con sulfadiazina de plata en pacientes atendidos en consulta externa de cirugía plástica del Hospital Antonio Lenin Fonseca en el periodo Mayo 2013 a Mayo 2015[Tesis Doctoral]. Nicaragua, Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 2016
7. González M, Arteaga-Vizcaíno M, Benito M, Benito M. Aplicación del plasma rico en plaquetas (PRP) y sus derivados en implantología dental y cirugía plástica [Application of platelet rich plasma (PRP) and its derivatives in dental implantologie and plastic surgery]. *Invest Clin.* 2012;53(4):408-418.
8. Carrillo-Mora P, González-Villalva A, Macías-Hernández SI, et al. Plasma rico en plaquetas. Herramienta versátil de la medicina regenerativa. *Cir Cir.* 2013;81(1):74-82
9. Carter MJ, Fylling CP, Parnell LK. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty.* 2011;11:e38.
10. Martinez-Zapata MJ, Martí-Carvajal AJ, Solà I, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(5):CD006899. Published 2016 May 25. doi:10.1002/14651858.CD006899.pub3
11. Del Pino-Sedeño T, Trujillo-Martín MM, Andia I, et al. Platelet-rich plasma for the treatment of diabetic foot ulcers: A meta-analysis. *Wound Repair Regen.* 2019;27(2):170-182. doi:10.1111/wrr.12690

12. Nowotny J, Farack J, Vater C, et al. Translation of cell therapy into clinical practice: validation of an application procedure for bone marrow progenitor cells and platelet rich plasma. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2016;14(1):e1-e8. Published 2016 Apr 6. doi:10.5301/jabfm.5000255
13. Singh SP, Kumar V, Pandey A, Pandey P, Gupta V, Verma R. Role of platelet-rich plasma in healing diabetic foot ulcers: a prospective study. *J Wound Care*. 2018;27(9):550-556. doi:10.12968/jowc.2018.27.9.550
14. DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012;28(7):998-1009. doi:10.1016/j.arthro.2012.04.148
15. Moreno R. y cols., Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora, *Farm Hosp*. vol.39 n.3 Toledo May./Jun. 2015
16. Hardt C, Conforti R, Garcia R, Garcia A. Úlceras diabéticas crónicas tratadas con plasma autólogo rico en plaquetas. *Med Cutan Iber Lat Am* 2015; 43 (2): 145-148.
17. Etulain J; Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets* 2018 Sep;29(6):556-568
18. Zhicheng H. Shangiang Q. Jian Z. Xiaoling C. Peng W. Shaobin H. Fen S. Yunxian D. Jun W. Bing T. Jiayuan Z. Efficacy and Safety of Platelet-Rich Plasma for Patients With Diabetic Ulcers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Advanced wound care*: 2019 July 1;8(7): 298-308.
19. Shutar M. Gupta S. Bukhari S. Ponemone V; Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *Journal of Biomedical Science* (2017) 24:16
20. Xia Y, Zhao J, Xie J, Lv Y, Cao DS. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma Dressing for Chronic Nonhealing Ulcers: A Meta-Analysis of 15 Randomized Controlled Trials. *Plast Reconstr Surg*. 2019;144(6):1463-1474. doi:10.1097/PRS.00000000000006281
21. Carmen J et al: Developing assays to address identity, potency, purity and safety: cell characterization in cell therapy process development, *Regen. Med*. (2012) 7(1), 85–100
22. Magalon J, Chateau A, Bertrand B, Louis M, Silvestre A, Giraudo L et al. DEPA classification: a proposal for standardizing PRP use and a retrospective application of available devices. *BMJ Open Sport Exerc Med*. 2016. 2: 1-5.
23. Castro-Piedra, Arias-Varela. Actualización en plasma rico en plaquetas. *Acta médica costarricense*, 2019

## Anexo 1

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

**"Control de calidad de plasma rico en plaquetas para el tratamiento de úlceras venosas crónica"**

**Investigadores Responsables:** Dras. Cristina Touriño, Lourdes Echarte, Marianela Posada ; Bres Diego Ardao, Enrique Cadenas, Maikol González, Esteban Luján, Agustina Pavesio, María Belen Sartore

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

Anexo 2

*Ministerio de Salud Pública*

Montevideo, **2** DIC 2016

**VISTO:** la gestión promovida por la Coordinadora del Área Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Hospital de Clínicas;

**RESULTANDO:** que solicita autorización para la realización del estudio clínico titulado: "Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo", Fase II, Protocolo PRP-UV-2016 Versión 2, Consentimiento informado Versión 2, a llevarse a cabo en el Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela, a cargo de las Dras. Cristina Touriño y Gabriela Otero en carácter de investigadoras principales y de las Dras. Sofía Falco, Alexandra Sujanov, Natalia Lamela y la Lic. Lourdes Echarte en carácter de co-investigadoras;

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

II) que la División Evaluación Sanitaria informa favorablemente al respecto;

III) que la Comisión Nacional de Ética en Investigación no formula objeciones a la realización del citado estudio;

IV) que de acuerdo a lo expresado por la Dirección General de la Salud se estima pertinente proceder en consecuencia;

**ATENCIÓN:** 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;

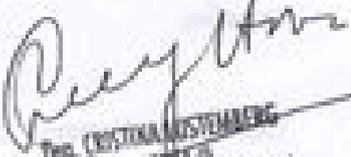
**LA MINISTRA (D) DE SALUD PÚBLICA**  
**RESUELVE:**

- 1º) Autorízase a las Investigadoras Principales Dras. Cristina Touriño y Gabriela Otero y sus Co-investigadores, la realización del estudio clínico titulado: "Tratamiento de úlceras venosas crónicas de miembros inferiores con plasma rico en plaquetas autólogo", Fase II, Protocolo PRP-LIV-2016 Versión 2, Consentimiento informado Versión 2, a llevarse a cabo en el Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela".
- 2º) Dispónese que las Investigadoras Principales informarán en los plazos previstos los informes de avance y los resultados obtenidos a la División Evaluación Sanitaria.
- 3º) Establécese que la responsabilidad por el uso del referido producto será compartida por las Investigadoras Principales y la Dirección Técnica del Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela".
- 4º) Comuníquese. Tomen nota la Dirección General de la Salud y la División Evaluación Sanitaria. Cumplido, archívese.

Ord. N° 1259

Ref. N° 001-1-950-2016

NM

  
Dra. CRISTINA MUSTENBERG  
MINISTRE(D)  
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

  
En copia del  
MIRIAM OJEDA  
Directora Departamento  
Acuerdos y Restricciones