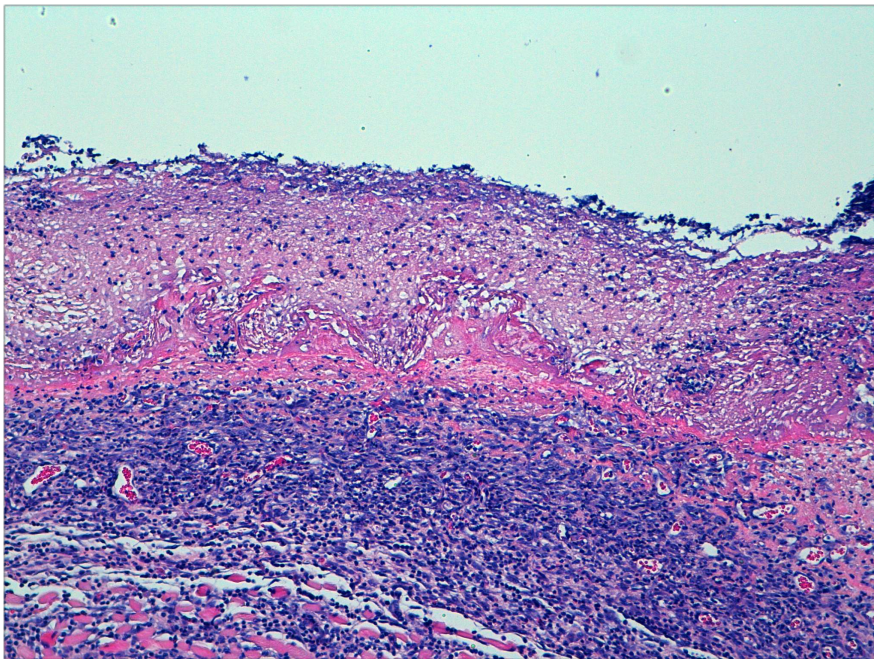




## **EVALUACIÓN DE LA EFICACIA Y SEGURIDAD DEL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL TRATAMIENTO DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS.**



José Javier Aguirre Anda

Vitoria-Gasteiz 2016



## Foto de portada:

Herida cutánea en ratón diabetizado transcurridos 8 días de cicatrización.  
HE 4X.

Autor: José Javier Aguirre

# Agradecimientos

Son muchas las personas a las que agradecer, y es posible que me olvide de alguna, pero es cierto que este trabajo no habría visto la luz sin el apoyo de algunas de ellas y la ayuda de otras.

En primer lugar debo dar las gracias a Jaime Algorta, que además de dirigir esta tesis me ha enseñado casi todo lo que sé respecto a la investigación clínica y al que además considero un buen amigo

También merecen un lugar preferente en esta apartado mis antiguas compañeras de la Unidad de Ensayos Clínicos, en especial a Silvia, Izaskun y Marian, que me ayudaron en todo el proceso experimental, colaborando tanto en el reclutamiento de pacientes como en la preparación del plasma y en la realización de las curas.

Asimismo debo citar en los primeros párrafos de este apartado a mi hermana Rosa Gemma, por compartir conmigo todo su buen hacer en la curación de las heridas.

Ese trabajo no podría haberse llevado a cabo sin el entusiasmo y la implicación de los servicios de traumatología y cirugía vascular del HUA Txagorritxu, sobre todo de los doctores Eduardo Ayerdi y Ana Isabel Cabezas que participaron desde el inicio del proyecto colaborando activamente en el diseño de los estudios, asesorando en las curas y participando directamente en las mismas en aquellos casos en los que por la complejidad de las heridas era requerida su presencia.

Asimismo su papel fue determinante en la selección de pacientes y control de los mismos.

Muchas gracias también al Dr Juan Bellido y al servicio de cirugía mínimamente invasiva de la Clínica Quirón Sagrado Corazón de

Sevilla, por su implicación en el proyecto que permitió evaluar la eficacia del PRGF en el tratamiento de heridas quirúrgicas.

Otras personas a las que debo agradecimiento son los doctores Eduardo Anitua, Isabel Andía y Gorka Orive por brindarme su ayuda durante todos estos años y haberme hecho partícipe de este proyecto.

Este agradecimiento se extiende todos mis compañeros en el Laboratorio de la Fundación Eduardo Anitua por responder a mis inoportunas preguntas sobre los mecanismos de acción del PRGF, tiempos y velocidades de centrifugado, y todas aquellas cuestiones de ciencia básica que se escapaban a mi conocimiento y que espolearon mi curiosidad hasta el punto de ser el motivo de que me hiciera patólogo. Aquí debo incluir también a los doctores Isabel Guerra y Ramón Díaz de Otazu por su apoyo incondicional.

Por último mencionar a mi mujer, hijos y padres que han sufrido conmigo en los periodos de bajón y han seguido creyendo en mí, empujándome a seguir en aquellos momentos en los que he estado a punto de tirar la toalla (que no han sido pocos).

Muchas gracias a todos.

# Dedicatoria





A Eukene, Pablo y Arantzazu

A mis padres

Por fin.



# Índice

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes y estado actual del conocimiento</b>	<b>5</b>
Importancia Clínico epidemiológica de las heridas de difícil cicatrización	7
Úlceras vasculares	7
Úlceras por presión	9
Costes asociados a las úlceras cutáneas	10
Heridas quirúrgicas de difícil cicatrización.	11
Mecanismos fisiológicos en la reparación tisular	13
Fases de la reparación tisular	14
Cronificación de las heridas	19
Papel de los factores de crecimiento en la reparación tisular	21
Utilidad terapéutica en el tratamiento de heridas	25
Seguridad de la aplicación de factores de crecimiento	27
Papel de las plaquetas como fuente de factores de crecimiento	29
Plasma rico en plaquetas	30
Obtención del PRP	31
Clasificación de los PRP	32
Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)	35
<b>Justificación del estudio</b>	<b>37</b>
<b>Objetivos del estudio</b>	<b>41</b>
Objetivo GENERAL	43
Objetivos específicos	43
<b>Fase experimental</b>	<b>45</b>
Artículo 1	47
Artículo 2	69
Artículo 3	83
Artículo 4	101
<b>Discusión</b>	<b>119</b>
Caracterización del PRGF	121
Concentración de plaquetas y factores de crecimiento	122
Propiedades antimicrobianas	125
Ética y diseño de los ensayos clínicos realizados	127
Selección de los pacientes	128
Diseño de los estudios	130
Resultados de los ensayos clínicos	139
Resultados de eficacia	139
Resultados de seguridad	144
Limitaciones de los estudios	146
<b>Conclusiones</b>	<b>149</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>153</b>



# Abreviaturas



EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ECGF: Factor de crecimiento de células epiteliales

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico-2

GNAUPP: Grupo Estudio Ulceras de Presión y Heridas Crónicas

HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%

IGF-1: Factor de crecimiento derivado de la insulina

KGF: Factor de crecimiento de los queratinocitos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento

PRP: Plasma rico en plaquetas

RAGI: Reacción Adversa Grave Inesperada

TGF $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante alfa

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

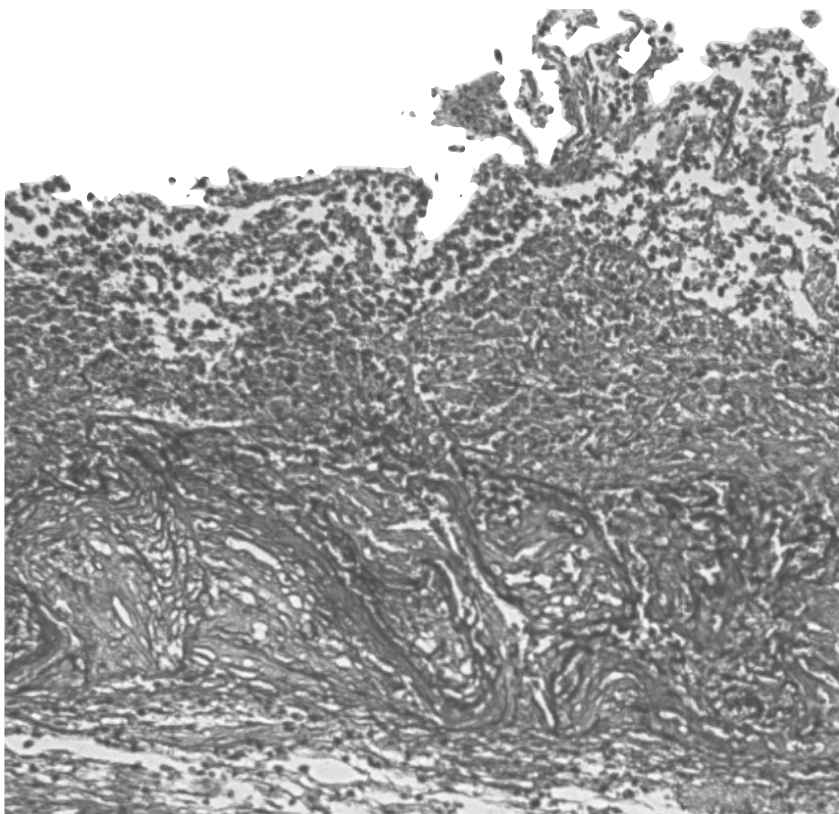
TSP-1: Trombospondina

VEGF: Factor de crecimiento endotelio vascular





## **Antecedentes y estado actual del conocimiento**





## ***Importancia Clínico epidemiológica de las heridas de difícil cicatrización***

Las heridas cutáneas de difícil cicatrización siguen constituyendo hoy en día un importante problema de salud en el mundo occidental tanto por su alta prevalencia como por sus consecuencias en el nivel de salud de quienes las padecen (dolor, complicaciones locales como la infección, afectación del nivel de independencia, disminución de capacidad para realizar las distintas actividades básicas de la vida diaria). Como se describe más adelante, estas secuelas se asocian con un descenso de la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus entornos cuidadores y conllevan un elevado consumo de recursos para el sistema de salud [Brem, 2010] .

A pesar de la importancia de este proceso tanto para clínicos como para gestores sanitarios, se ha evidenciado discrepancia en la literatura respecto a las cifras de prevalencia e incidencia de úlceras en los países desarrollados. Estas diferencias de valoración son probablemente secundarias a la heterogeneidad de los estudios en aspectos tan básicos como la propia definición de las úlceras, y criterios de clasificación de las mismas, basados casi en exclusiva en la semiología exploratoria, excesivamente dependiente de la experiencia clínica de cuidadores [Chaparro, 2003].

### **Úlceras vasculares**

Teniendo en cuenta las limitaciones expuestas en el párrafo anterior, las tasas de prevalencia de úlceras en extremidades inferiores oscila entre el 0,12% y el 2% de la población general, alcanzando el 3,6% en mayores de 65 años [Grahan, 2003, Rodriguez-Piñero, 2003, Gohel, 2010]

En nuestro medio, los datos difieren ligeramente de los publicados en el resto de Europa. En el primer Estudio Nacional de Prevalencia de Úlceras de Pierna coordinado por el Grupo de Estudio de Úlceras de Presión y Heridas Crónicas (GNAUPP) se estima que entre los años 2002 y 2003 la prevalencia de úlceras secundarias a insuficiencia vascular fue del 0,086%, valor inferior al arriba mencionado obtenido de publicaciones internacionales. Un 69% de las úlceras detectadas en este estudio eran de etiología venosa; el 56,5% eran recurrentes, y el 47,4% no habían sido diagnosticadas ni tratadas por especialistas. Solo en un tercio de los casos incluidos se había realizado un estudio hemodinámico de la extremidad [Rueda, 2004].

Atendiendo a la encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa crónica en España (estudio Detect-IVC 2006), el 3% de los pacientes que acuden al médico de atención primaria tienen úlceras venosas [Alvarez Fernandez, 2008]. Este valor evidencia de nuevo la enorme controversia y dificultad para determinar la prevalencia de esta condición.

En un estudio de prevalencia realizado en Portugal y publicado en 2005, se citan tasas de prevalencia en población general de 0,41%, (0,30% en hombre y 0,46% en mujeres) superando el 0,6% en pacientes mayores de 80 años. La mediana de duración de las lesiones fue de 18 meses. Un 66% de los pacientes presentaron úlceras con antigüedades superiores al año, superando los 5 años de duración un 17% de las úlceras estudiadas [Pina, 2005].

Otros factores epidemiológicos a tener en cuenta son el porcentaje de recidivas de las úlceras vasculares que fluctúa dependiendo de los distintos autores entre el 45 y el 70% de los casos tratados [Vowden, 2006].

Asimismo estas lesiones son patologías de larga duración refiriéndose cifras de hasta un 50% de úlceras abiertas hasta 9 meses, un 20% hasta dos años y un 8% hasta 5 años, e incluso se han descrito casos extremos de úlceras abiertas más de 62 años [Callam, 1987].

### **Úlceras por presión**

Si nos centramos en el otro gran grupo de heridas crónicas que son las úlceras por presión, al igual que en el caso de las úlceras de extremidades antes comentadas los datos de los diferentes estudios publicados son difícilmente comparables entre sí, ya que existen múltiples limitaciones metodológicas, poblaciones de estudio no comparables, variaciones en la forma de obtención de los datos y diferencias en el estadio de las lesiones [Verdú, 2003]

En el último estudio nacional de prevalencia de úlceras por presión en España la prevalencia detectada de úlceras por presión varía dependiendo del ámbito de detección, Las cifras de prevalencia obtenidas son: en hospitales, en adultos 7,87% (IC 95%: 7,31-8,47%); en unidades pediátricas de hospitales, 3,36% (IC 95%: 1,44-7,61%); en Centros Socio Sanitarios, 13,41% (IC 95%:12,6-14,2%), y en atención primaria, 0,44% (IC 95%: 0,41-0,47%) entre mayores de 65 años y 8,51% (IC 95%: 7,96-9,1%) entre pacientes en programas de atención domiciliaria. La prevalencia es más alta en unidad de cuidados intensivos, llegando al 18%. El mayor porcentaje de las lesiones mostró un tiempo de evolución de 30 días (mediana) y un área de 6 cm<sup>2</sup> (mediana) [Pancorbo, 2013]. Estos datos no difieren significativamente de los registrados en la anterior encuesta realizada y publicada por Soldevilla en 2006 habiéndose duplicado incluso las úlceras por presión detectadas en los centros sociosanitarios [Soldevilla, 2006].

### **Costes asociados a las úlceras cutáneas**

Debido a los factores hasta ahora descritos de elevada prevalencia y larga duración de las heridas crónicas, los gastos directos en el tratamiento de estas lesiones son crecientes a pesar de los avances en los métodos de prevención y del conocimiento de los factores de riesgo.

De hecho, se ha estimado que el costo directo por atención de heridas crónicas en Inglaterra se encuentra entre los 2,3 y 3,1 millones de libras, alcanzando un 3% del gasto total en salud [Phillips, 2015].

En España, el costo total de tratamiento de las úlceras por presión es aproximadamente de 461 millones de euros, (cerca del 5% del gasto sanitario anual). De este montante, el 15% lo representan el costo de apósitos y otros materiales, mientras que el 19% lo representan el costo del tiempo de enfermería, y el 45% del total lo representa el costo de las estancias extra en el hospital relacionadas con estas lesiones [Soldevilla, 2007].

Asimismo se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre los costes y determinados factores entre los que destacan: la duración del tratamiento, el tamaño inicial de la úlcera y la presencia de por lo menos una enfermedad concomitante [Kerstein, 2001].

La dependencia de estos factores hace que los gastos anuales de tratamiento de una úlcera venosa de la pierna puedan variar en algo más de 1.000 euros dependiendo del tiempo transcurrido desde su instauración hasta el inicio del tratamiento [Tenvall, 2005].

### **Heridas quirúrgicas de difícil cicatrización.**

Muchos procedimientos quirúrgicos se realizan en regiones anatómicas donde las opciones de reparación del defecto quirúrgico se ven limitadas debido a la imposibilidad de realizar cierre simple de los márgenes quirúrgicos o de obtener colgajos cutáneos adecuados debido al excesivo tamaño de la misma en relación con la piel disponible en el entorno.

El sinus pilonidal es un proceso inflamatorio crónico asociado a la presencia de pelo en el tejido celular subcutáneo, generalmente en el pliegue interglúteo, aunque puede aparecer en otras localizaciones (regiones inguinal, umbilical y axilar).

Actualmente se reconoce la enfermedad pilonidal como un padecimiento adquirido, con cierta predisposición ocupacional, ya que es muy raro en niños y se presenta más frecuentemente en aquellos pacientes masculinos con hirsutismo.

La enfermedad pilonidal es frecuente, sobre todo en el varón joven. Afecta a alrededor del 0,7% de la población. Su incidencia se evalúa entre 10-26/100.000. Los varones están afectados casi el doble que las mujeres, habitualmente entre los 15-30 años. La media de edad sería de 21 años en el varón y 19 años en la mujer. Es una patología rara después de los 40 años [Faglin, 2015].

Con frecuencia se encuentran factores predisponentes de tipo intrínseco y extrínseco. Los factores intrínsecos son la raza caucásica, la pilosidad importante, los antecedentes familiares de la enfermedad y la existencia de una hendidura sacra congénita. Los factores extrínsecos son los traumatismos locales (rozamientos, irritaciones, posición sentada prolongada, etc.), el sedentarismo, la obesidad, el tabaquismo y la falta de higiene.

En cambio, la enfermedad es más rara en las personas de origen africano o asiático.

Su tratamiento se basa en la resección del mismo seguido por un cierre primario con marsupialización de la herida o el manejo de la herida en forma abierta sin marsupialización. En forma general, se ha descrito una mayor tasa de cicatrización con el cierre primario de las heridas, sin embargo se ha observado un mayor índice de recurrencias con este procedimiento. De forma contraria, se presenta una cicatrización mucho más lenta en aquellas heridas manejadas en forma abierta o con marsupialización, siendo el índice de recurrencia mucho menor. No obstante, se ha señalado una tasa de recidiva que va de 20 a 40%, independientemente de la técnica empleada [Rodríguez-Medina, 2014].

La importancia de la enfermedad pilonidal radica en la relación tiempo/hombre perdido en sus actividades diarias secundario a sus múltiples hospitalizaciones y visitas requeridas para el manejo de la enfermedad, así como de las complicaciones asociadas a los procedimientos para tratar la enfermedad.

De hecho, el seno pilonidal constituye un problema de salud que origina importantes costos económicos, tanto directos como indirectos, y debido a que no existe un consenso respecto al tratamiento ideal la elección de un correcto abordaje terapéutico cobra importancia, porque estos pacientes, generalmente población activa asocian un tiempo considerable de baja laboral, habiéndose estimado que el tiempo medio de baja es de 30 días.



## ***Mecanismos fisiológicos en la reparación tisular***

La curación de las heridas es un proceso fisiológico de gran complejidad que tiene la finalidad de restaurar la integridad de la piel y evitar, así, cualquier anomalía en su función barrera.

Todo ser vivo lleva en su clave genética los elementos necesarios para intentar reparar la integridad anatómica. Ante cualquier agresión capaz de dañar las células y los tejidos, el organismo es capaz de poner en marcha una serie de mecanismos que permitan contener el daño y recuperar la capacidad anatómica y funcional del tejido dañado.

Así, pueden diferenciarse diferentes procesos de reparación tisular [Kumar, 2013]:

- **Reparación:** que hace referencia al completo restablecimiento de la arquitectura y función tisulares después de una lesión.
- **Cicatrización:** cuando las estructuras de soporte del tejido han resultado seriamente dañadas y son incapaces de un restablecimiento completo, el tejido es sustituido por tejido conjuntivo (fibroso).
- **Regeneración:** algunos tejidos, como la mayoría de los epitelios superficiales tienen la capacidad de renovarse reemplazando los componentes dañados, siendo capaces de retornar al estado previo a la lesión debido a que sus células poseen una elevada capacidad proliferativa.

Para que la transformación que supone la regeneración sea ordenada es necesaria la presencia de una matriz extracelular especializada, que a modo de un andamio de estructura

dinámica, permita alcanzar una reconstrucción lo más parecida posible a la estructura previamente dañada.

### **Fases de la reparación tisular**

Independientemente del tipo de herida de que se trate y de la extensión que abarque la pérdida de tejido, para restablecer la integridad del área lesionada se producen distintos acontecimientos que se solapan en el tiempo y no pueden ser disociados unos de otros que son conocidos como fases de la reparación cutánea.

De manera didáctica, estos eventos se han clasificado tradicionalmente en tres etapas: una fase inflamatoria aguda, una segunda fase de proliferación y reparación y una tercera fase de remodelado.

#### **Fase inflamatoria**

En las primeras 24-48 horas, y nada más producirse una lesión tisular, los daños ocasionados en las membranas celulares, originan cambios en la permeabilidad vascular fomentándose la migración leucocitaria hacia la zona de la herida, sobre todo de granulocitos y macrófagos, cuya función prioritaria consiste en limpiar y proteger a la herida de posibles infecciones a través de la fagocitosis, liberándose al mismo tiempo mediadores bioquímicamente activos, capaces de activar y estimular células de gran importancia para la siguiente fase del proceso curativo de la herida.

Esta fase puede ser dividida en dos acontecimientos:

- Uno vascular que incluye los mecanismos de hemostasia.
- Otro celular que implica la llegada y participación de leucocitos

al área lesionada.

Una hemostasia adecuada requiere la formación de un coágulo y la activación de la cascada de la coagulación (vías intrínseca y extrínseca)

El coágulo formado en el proceso hemostático contiene principalmente fibrina y plaquetas y constituye una matriz dinámica y viable de proteínas y células que contribuye no sólo a la hemostasia sino también a la llegada de células inflamatorias, fibroblastos y factores de crecimiento indispensables para que tenga lugar el proceso de cicatrización [Broughton G, 2006].

La fibrina se forma a partir del fibrinógeno bajo la acción de la trombina y es capaz de inducir la subsiguiente fase inflamatoria de la cicatrización tras unirse a receptores localizados en la superficie de monocitos y neutrófilos, sirviendo de reservorio de ciertos factores de crecimiento, como el FGF-2 y el VEGF y de citocinas que estimulan la proliferación de los fibroblastos y la angiogénesis.

Las plaquetas una vez activadas por la exposición a distintos componentes de la matriz extracelular, incrementan el número de receptores de superficie, liberan sustancias biológicamente activas y terminan por agregarse.

Las principales sustancias activas liberadas por las plaquetas son la serotonina, el difosfato de adenosina (ADP), el tromboxano A<sub>2</sub> y las liberadas por los gránulos alfa como la selectina P, el fibrinógeno, la albúmina y factores de crecimiento (PDGF, IGF-1, TGF $\beta$ , EGF y HGF) que influyen en la actividad de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, favoreciendo la mitosis y la quimiotaxis de éstas hacia la zona lesional, para formar la matriz

provisional o tejido de granulación [Anitua, 2008].

Los neutrófilos atraídos por la acción de estas proteínas, se unen a la fibrina y sus proteasas intervienen en la defensa antimicrobiana y en el desbridamiento del tejido desvitalizado en la herida. Posteriormente, los monocitos son atraídos hacia el tejido dañado mediante diferentes factores como fibronectina, colágeno, elastina, trombina y TGF $\beta$  terminando por reemplazar a los neutrófilos, para adherirse a la matriz extracelular gracias a los receptores de integrinas.

En esta matriz provisional, los monocitos se activan gracias a la interleucina 2, al interferon-sigma derivado de los linfocitos T, y a los estímulos procedentes de los microorganismos implicados y del PDGF [Broughton G, 2006]. Una vez activados, los monocitos ahora macrófagos fagocitan residuos como bacterias y tejido necrótico al tiempo que secretan diferentes metaloproteinasas, elastasas y colagenasas que favorecen el desbridamiento del tejido lesionado.

En las etapas finales de esta primera fase inflamatoria, los macrófagos estimulan la formación de tejido de granulación mediante la secreción de factores de crecimiento que estimulan la proliferación de los fibroblastos (PDGF), la síntesis de colágeno (TGF $\beta$ ) y la neoformación de vasos sanguíneos (FGF y VEGF).

De estos factores de crecimiento citados, el FGF presenta un papel destacado en este proceso, ya que es un mitógeno energético para las células endoteliales, acelera la formación de tejido de granulación al incrementar la proliferación de fibroblastos y la acumulación de colágeno y a su vez, proporciona el estímulo angiogénico inicial [Benavides J, 2008].

El resultado final de esta fase es la formación de un coágulo-entramado de fibrina con neutrófilos, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales.

### **Fase de Proliferación.**

En esta fase, ocurren dos eventos fundamentales como son la formación del tejido de granulación y el restablecimiento de una epidermis intacta sobre el mismo.

Los fibroblastos estimulados por diversas citoquinas y factores de crecimiento (PDGF, TGF $\alpha$ , EGF) secretados por las plaquetas y macrófagos durante la fase inflamatoria migran al interior de la herida.

Esta migración se produce de una forma ordenada, dirigida por las de las metaloproteinasas e integrinas expresadas en su superficie celular, que interactúan con los diversos componentes de la matriz (fibrina, fibronectina, vitronectina y ácido hialurónico) [Bielsa I, 2006].

En respuesta al PDGF, los fibroblastos comienzan a sintetizar componentes de una matriz extracelular provisional como el colágeno tipo III, los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos que estimulan la migración y posterior proliferación de los queratinocitos vecinos en la zona de la herida.

A medida que se va formando la matriz provisional, y de forma casi simultánea, las células epiteliales localizadas en la periferia de la herida comienzan a proliferar y a enviar proyecciones con el objeto de establecer una barrera protectora contra las pérdidas de líquido y la proliferación bacteriana.

Esta proliferación es estimulada por la acción de los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y transformante alfa (TGF $\alpha$ ),

procedentes de plaquetas y macrófagos, así como por las integrinas expresadas en su superficie, favoreciendo su interacción con los diversos elementos de la matriz extracelular (fibrina, fibronectina, vitronectina), y liberando enzimas que degradan diversos componentes de esta matriz con el fin de facilitar la migración [Pierce, 2006].

El desarrollo del tejido de granulación durante la cicatrización de heridas necesita la formación de nuevos capilares. La neoformación de vasos o ramificación de los preexistentes se llama angiogénesis, siendo primordial en el desarrollo de este proceso, ya que estos nuevos vasos participan en la formación del tejido de granulación, proporcionando nutrición y oxígeno al tejido en crecimiento.

El proceso de angiogénesis, es iniciado mediante un reclutamiento de células endoteliales desde los tejidos adyacentes que van a participar en la formación de nuevas estructuras vasculares, y es estimulado por factores de crecimiento con potencial angiogénico como el VEGF y el FGF-2. Asimismo las células endoteliales producirán plasmina, metaloproteinasas y radicales libres capaces de degradar la fibrina y comienzan a proliferar desde los capilares venosos intactos adyacentes formando nuevas ramificaciones capilares que invaden el lecho de la herida rico en fibrina para organizar en pocos días un entramado microvascular a través del tejido de granulación [Laurens K, 2006].

Finalmente los fibroblastos se transforman, por la mediación de distintas citoquinas y factores de crecimiento como el PDGF y el TGF $\beta$  en miofibroblastos adquiriendo microfilamentos de actina en su citoplasma.

Estos miofibroblastos van a emitir pseudópodos y bandas de actina, que van a ligar con la fibronectina extracelular unida al colágeno fibrilar, arrastrando las fibras de colágeno hacia la célula, provocando con ello la retracción de la lesión.

### **Fase de remodelación**

Podemos afirmar que el proceso de remodelación consiste básicamente en la fragmentación del colágeno formado y el reordenamiento de sus fibrillas, a la vez que, se inicia la degradación del colágeno III, proceso mediado por las metaloproteinasas inducidas en este período por citoquinas, factores de crecimiento y la síntesis del colágeno tipo I. Con el tiempo, las fibrillas aumentan su grosor, se incrementan las uniones interfibrilares y se organizan de manera ordenada, con lo que se maximiza su resistencia. [Benavides J, 2008]. Este proceso, que tiene lugar durante un período de semanas, meses e incluso años, solapa su inicio con la formación del tejido de granulación en la fase proliferativa.

### **Cronificación de las heridas**

Los pasos descritos hasta ahora, se corresponden con la cicatrización normal de las heridas; sin embargo, hay casos en los que por distintas razones, el proceso de cicatrización se detiene en cualquiera de las fases detalladas en este epígrafe (hemostasia, inflamación, proliferación o remodelación) y no llega a producirse la reparación total de la herida; es entonces cuando hablamos de heridas crónicas.

Podemos definir las heridas crónicas como aquellas lesiones de la integridad cutánea en las que no se sigue un proceso de reparación normal, se estancan en alguna fase de la cicatrización, sin que se restaure la integridad anatómica ni funcional del tejido

lesionado.

Este desequilibrio parece tener una relación directa con un aumento de las citoquinas proinflamatorias, así como con una disminución de los factores de crecimiento por acción de las proteasas, una disminución de la actividad mitogénica de las células en comparación con la población celular de las heridas agudas y una alteración en el depósito de colágeno y de la matriz extracelular, lo que lleva a una alteración de la proliferación celular y de la síntesis proteica, con un aumento de la apoptosis [Tregove NJ, 1996]

Este retraso en la cicatrización también parece estar directa o indirectamente relacionado con la persistencia tisular de óxido nítrico por sus efectos sobre la vascularización, El óxido nítrico se combina con los radicales libres hidróxilos formando peroxinitrato, un potente radical libre, que ocasiona la destrucción tisular. [Blakytyn R. 2006]

La mayoría de heridas crónicas están afectadas por una anomalía fisiológica subyacente, como la diabetes, insuficiencia vascular o isquemia, que pueden contribuir aún más al retraso de la cicatrización de heridas.

La clave para estimular una cicatrización más rápida es una corrección inmediata de los problemas fisiológicos subyacentes junto a la adecuada preparación del lecho de la herida. El proceso de cicatrización de heridas crónicas se verá significativamente afectado si la patología subyacente no se toma en consideración junto con las barreras locales.



## ***Papel de los factores de crecimiento en la reparación tisular***

El concepto de los factores de crecimiento como impulsores de la reparación está basado tanto en el hecho de que están presentes durante el proceso de reparación tisular como en que las células implicadas en la reparación expresan receptores para estos factores de crecimiento e interaccionan con ellos [Dahlgren LA, 2005].

Los factores de crecimiento son generalmente proteínas que las células secretan en el espacio intercelular y que desempeñan un papel fundamental como mediador biológico en la regulación de los fenómenos antes descritos como la migración, diferenciación y proliferación celular [Prigent, 1992].

Se trata habitualmente de proteínas solubles que actúan de mediadores biológicos naturales siendo responsables de distintos eventos celulares como la mitosis, la quimiotaxis (desplazamiento de las células en el medio líquido), la citodiferenciación y la síntesis de la matriz entre otros.

Hablando en sentido estricto, el término factores de crecimiento debería utilizarse para las proteínas que aumentan el tamaño celular. Sin embargo, la mayoría de los factores de crecimiento además de estimular la proliferación celular, estimulan la migración, diferenciación y contractilidad, favoreciendo asimismo la síntesis de proteínas especializadas como el colágeno en los fibroblastos, por lo que se ha generalizado el término factor de crecimiento para toda aquella proteína capaz de expandir las poblaciones celulares, estimular la división celular y promover la supervivencia celular [Hill, 1989, Kumar, 2008].

Independientemente de su origen, la mayoría de los factores de crecimiento tienen efectos pleiotrópicos estimulando además de la proliferación, la migración, la diferenciación y contractilidad celulares, siendo capaces de inducir la proliferación celular uniéndose a receptores específicos, previniendo la apoptosis y estimulando la síntesis de proteínas celulares en preparación para la mitosis [Kumar, 2008].

Para llevar a cabo esta estimulación, un factor de crecimiento puede actuar sobre un tipo de célula específica o sobre múltiples tipos celulares, estimulando la proliferación de algunas células e inhibiendo el ciclo de otras, pudiendo provocar respuestas opuestas en la misma célula dependiendo de su concentración [Anitua, 2007]

Las principales vías de señalización intracelular inducidas por los receptores de los factores de crecimiento son similares a las de otros muchos receptores celulares que reconocen ligandos extracelulares.

La unión de una de estas proteínas de señalización a su receptor, desencadena una serie de acontecimientos de transducción de las señales extracelulares al interior de la célula. Estas señales permiten a la célula percibir los cambios en su ambiente y modificar su propia expresión génica para adaptarse a dichos cambios [Sitaras, 1987].

Podríamos decir que la producción de factores de crecimiento es un proceso dinámico que atiende a las distintas necesidades. De esta forma, diferentes factores de crecimiento pueden producirse por diferentes células en un tejido o por la misma célula bajo diferentes circunstancias. Asimismo los distintos factores de crecimiento pueden interactuar entre sí limitando su liberación o la

respuesta a su liberación y de ese modo controlar sus acciones [Anitua, 2007].

Entre los tipos celulares productores de factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos. Además existen lugares de almacenamiento, como son las plaquetas.

De hecho, las plaquetas desempeñan un papel fundamental en el proceso de reparación tisular gracias tanto a su capacidad sellante [George JN, 2000, Ruggeri ZM, 2002], como por su capacidad de almacenar y secretar proteínas de señalización imprescindibles para el correcto desarrollo del proceso de cicatrización [Lacci, 2010, Di Michelle, 2012].

Para facilitar su estudio, los factores de crecimiento se han clasificado en familias, atendiendo a sus características estructurales y efectos biológicos.

La mayoría de factores de crecimiento de una familia tienen moléculas con una estructura tridimensional parecida y se piensa que esta similitud significa que hay regiones químicas o físico-químicas en las moléculas que producen el efecto funcional y dan similitud a la acción de factores del mismo grupo familiar. Sin embargo, el nombre asignado a los factores de crecimiento se debe más al efecto originariamente observado que a su familia o a otros efectos descubiertos posteriormente.

Entre las distintas familias de factores de crecimiento implicadas en los procesos de regeneración celular, podemos citar, como directamente implicados en los procesos de regeneración cutánea:

**Antecedentes y estado actual del conocimiento**

---

- Familia del factor de crecimiento epitelial (EGF)
- Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)
- Familia del factor de crecimiento transformante (TGF)
- Familia del factor de crecimiento derivado de la insulina (IGF)
- Familia de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF)
- Familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y
- Familia del factor de crecimiento hepatocitario.

En la **tabla 1** se muestran distintas familias de factores de crecimiento que afectan a la cicatrización, las células que los producen y las dianas:

Tabla 1: Principales factores de crecimiento que influyen en la cicatrización

<b>Factor de crecimiento</b>	<b>Células productoras</b>	<b>Célula diana y efectos principales.</b>
<i>Familia de factores crecimiento epidérmico</i>		
EGF	Plaquetas, macrófagos, queratinocitos	Mitógeno para queratinocitos y fibroblastos: Estimula la migración de queratinocitos y la formación de tejido de granulación.
TGF $\alpha$	Macrófagos, queratinocitos, linfocitosT	
<i>Familia de factores de crecimiento fibroblástico</i>		
FGF- $\beta$	Plaquetas, macrófagos, queratinocitos, células endoteliales, macrófagos	Proliferación fibroblástica y angiogénesis
FGF- $\alpha$		

## Antecedentes y estado actual del conocimiento

Factor de crecimiento	Células productoras	Célula diana y efectos principales.
KGF	Fibroblastos	Proliferación y motilidad de las células epidérmicas
<i>Familia de factores de crecimiento transformante</i>		
TGF $\beta_1$ , $\beta_2$ y $\beta_3$	Plaquetas, Linfocitos T, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos Macrófagos	Motilidad epidérmica Quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos, angiogénesis Síntesis de matriz extracelular Remodelación Efectos anticicatriciales
<i>Otros</i>		
PDGF	Plaquetas, células endoteliales Macrófagos y células epidérmicas	Proliferación fibroblástica, de células endoteliales y células musculares lisas. Quimiotaxis y activación de PMN, macrófagos y fibroblastos. Estimula la angiogénesis y remodelado de la herida
VEGF	Células epidérmicas, macrófagos	Angiogénesis y aumento de la permeabilidad vascular
IGF	Fibroblastos, células epidérmicas	Reepitelización y formación del tejido de granulación

### Utilidad terapéutica en el tratamiento de heridas

La identificación de estos factores de crecimiento como mediadores fundamentales en los procesos celulares y moleculares de la curación de úlceras, y su posterior obtención en el laboratorio mediante técnicas de ADN recombinante ha creado expectativas respecto a una nueva vía en el tratamiento de heridas de diferente origen.

De hecho en las últimas décadas y desde que en 1989 Knighton publicó los resultados de un estudio en el que sugería que la aplicación local de factores de crecimiento derivados de las plaquetas se relacionaba con la curación de úlceras cutáneas, se han llevado a cabo distintos estudios orientados a confirmar la

eficacia de la aplicación tópica de los distintos factores de crecimiento en el tratamiento de estas lesiones, destacando los llevados a cabo con el PDGF [Knighton, 1990; Wieman, 1998; Embil, 2000; Kallininen, 2000; Shackerlford, 2002].

En otro estudio retrospectivo de cohortes realizado en 2005 se analizó una cohorte de 24.898 pacientes diabéticos con úlceras neuropáticas tratadas en centros de atención primaria entre los años 1998 y 2004, habiendo sido tratados con PDGF un total de 2.394 sujetos (prácticamente el 10%) siendo el resto de los pacientes sometidos a terapia habitual.

Mediante la utilización de un modelo de regresión logística en el que incluyeron aquellas covariables que podían intervenir en la evolución de la lesión como la edad, el sexo, las características iniciales de la lesión (antigüedad, diámetro y profundidad basales), y el número inicial de lesiones por paciente, se concluyó que la aplicación de PDGF aumentaba la proporción de úlceras curadas disminuyendo asimismo el tiempo de cicatrización [Margolis, 2005].

La eficacia mostrada en estos ensayos clínicos ha hecho que se haya comercializado un producto tópico basado en factores de crecimiento recombinante obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética como es el caso de la becaplermina (PDGF) comercializado bajo el nombre de Regranex (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Janssen-Cilag) con la indicación autorizada como tratamiento tópico adyuvante en las úlceras diabéticas neuropáticas crónicas.

Además del PDGF, otros factores de crecimiento también han demostrado su eficacia en el tratamiento de heridas cutáneas de diferente origen entre los que podemos citar el factor de

crecimiento nervioso [Landi, 2003] y el factor de crecimiento epidérmico [Tsang, 2003; Berlanga, 2013; Gainza, 2014].

### **Seguridad de la aplicación de factores de crecimiento**

A pesar de la capacidad terapéutica demostrada, en los últimos años han surgido llamadas de atención a la seguridad a largo plazo de la aplicación tópica de factores de crecimiento de origen recombinante.

De hecho, hay autores que consideran que los concentrados terapéuticos de factores de crecimiento podrían actuar, además de iniciadores, como promotores en la carcinogénesis, favoreciendo la división y promoción de células previamente mutadas o como facilitadores de la evolución clonal y de una posible inmortalización y progresión maligna celular, aunque este fenómeno estaría sometido a las exigencias dependientes del tiempo de evolución y de las alteraciones previas para desarrollar una neoplasia [Martínez-González, 2002].

Estudios de experimentación animal han relacionado al factor de crecimiento IGF-1 con un efecto promotor de la tumorigénesis cutánea en lesiones previamente iniciadas [DiGiovanni, 2000] y otros autores han considerado el potencial carcinogénico de los factores de crecimiento tras establecer la capacidad antiapoptótica de diversos factores de crecimiento como el IGF-1 y el VEGF [Pollac, 2000]

Govindarajan publicó en 2005 los resultados de un estudio in vitro en el que se observaba que la sobreexpresión de PDGF provocaba la carcinogénesis en ratones fenotípicamente desnudos, y aunque todavía no se conoce con exactitud su papel, existen indicios que sugieren su papel en la inactivación de la p16 y en el aumento de la glicolisis como se puede observar en

tumores como el mieloma múltiple y el melanoma que habitualmente sobreexpresan factores de crecimiento aberrantes.

Por otro lado, en un estudio de seguimiento post comercialización, se ha relacionado el uso de más de tres envases del tratamiento mediante factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Regranex®) con un aumento de mortalidad en pacientes diabéticos con antecedentes de neoplasias previas aunque no se ha demostrado asociación entre la aplicación de este tratamiento y la aparición de nuevos procesos cancerosos. Como consecuencia la aplicación tópica del factor de crecimiento derivado de las plaquetas ha sido incluida en el programa de vigilancia de la FDA .

Si unimos los interrogantes hasta ahora descritos respecto a la seguridad de la aplicación de formulaciones que incluyan un único factor de crecimiento al hecho de que las necesidades del tejido lesionado son múltiples, diferentes autores han propuesto la administración de una combinación equilibrada de distintos mediadores.

Esta afirmación se basa en la necesidad de orientar las distintas vías de señalización que permitan una comunicación fluida entre los distintos agentes implicados en la cicatrización [Gianchandani, 2006; Anitua 2008].



## ***Papel de las plaquetas como fuente de factores de crecimiento***

Las plaquetas desempeñan un papel fundamental en el proceso de reparación tisular gracias tanto a su capacidad sellante [George JN, 2000, Ruggeri ZM, 2002], como por su capacidad de almacenar y secretar proteínas de señalización imprescindibles para el correcto desarrollo del proceso de cicatrización [Anitua, 2004].

Los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas contienen numerosas proteínas con una función determinante tanto en los procesos de reparación tisular como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ), el factor plaquetario 4 (PF4), la interleuquina (IL-1), el factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento endotelial derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de células epiteliales (ECGF), el factor de crecimiento insulina-like (IGF), la osteocalcina, la osteoconectina, el fibrinógeno, la vitronectina, la fibronectina y la trombospondina (TSP-1).

Cuando se produce una lesión vascular, las plaquetas se encuentran con las proteínas constituyentes de la matriz extracelular (de las que el colágeno es la más importante) y proteínas adicionales (siendo crítico el factor de von Willebrand). Tras el contacto con estas proteínas las plaquetas sufren un proceso de activación en el que se liberan las sustancias contenidas en sus gránulos.

Este proceso también conocido como degranulación, provoca que los gránulos  $\alpha$  se fundan con la membrana celular de las

plaquetas, donde algunas de las proteínas secretoras como el PDGF y el TGF $\beta$  pasan al estado activo al añadirseles histonas y cadenas laterales de carbohidratos.

Esta actividad secretora comienza 10 minutos después de haberse formado el coágulo, habiéndose liberado en la primera hora hasta el 95% del contenido granular.

Tras esta salva inicial de proteínas liberadas, las plaquetas sintetizan y secretan proteínas adicionales mientras se mantienen vivas (entre 5 y 10 días) [Flores, 2012].

Cuando empieza a disminuir la influencia directa de las plaquetas, los macrófagos que llegan arrastrados por el torrente vascular estimulados por las plaquetas asumen la responsabilidad de la regulación de la cicatrización secretando sus propios factores.

### ***Plasma rico en plaquetas***

El estudio de los factores de crecimiento junto con el descubrimiento de su liberación por parte de las plaquetas ha conducido al desarrollo de concentrados plaquetarios buscando estimular la proliferación y la diferenciación celular en el lecho lesional. Estos concentrados son conocidos como plasma rico en plaquetas y de forma abreviada se denominan comúnmente PRP.

El plasma rico en plaquetas se define como una fracción de plasma obtenido de sangre autóloga que tiene una concentración de plaquetas superior a la del plasma en condiciones basales.

Este concentrado plaquetario es obtenido mediante un centrifugado controlado de la sangre del propio paciente para obtener diferentes fracciones de plasma con concentraciones de plaquetas crecientes y conocidas.

De esta forma se consigue no solo un alto nivel de plaquetas, sino también de los factores de crecimiento que son secretados activamente por las plaquetas.

Además también aporta proteínas que actúan a nivel de la adhesión celular (fibrina, fibronectina, y vitronectina), por lo que proporciona el soporte estructural necesario para la migración celular, y para la proliferación y crecimiento tridimensional de los tejidos sobre los que actúa. Este andamiaje biológico contribuye a facilitar interacciones celulares complejas gracias a su peculiar estructura tridimensional, a su viscoelasticidad y a la capacidad de aportar sitios de unión para distintos elementos proteicos [Mosseson, 2005].

El PRP tiene efectos no solo directamente sobre las células diana para los factores de crecimiento, sino también como matriz extracelular para la estimulación de la reparación y/o regeneración del tejido de un modo global.

### **Obtención del PRP**

Aunque existen diferentes protocolos de obtención, normalmente el plasma rico en plaquetas se consigue mediante un proceso de centrifugación controlada de una pequeña cantidad de sangre procedente del propio paciente.

Este procedimiento deberá realizarse de tal forma que evite una fragmentación temprana de las plaquetas durante el proceso, lo que llevaría a una activación precoz, de las mismas. Este proceso de fragmentación llevaría asociado una liberación temprana de proteínas que podría comprometer la bioactividad de las mismas.

Para alcanzar del objetivo de integridad plaquetaria el centrifugado deberá realizarse a baja velocidad en un periodo de

tiempo relativamente corto. Este parámetro varía dependiendo de los diferentes kits utilizados para la obtención de los concentrados plaquetarios.

Asimismo los tubos de extracción sanguínea utilizados deberán llevar una pequeña cantidad de anticoagulante con el objetivo de secuestrar el calcio y bloquear la cascada de la coagulación.

Después de su preparación, el PRP debe activarse para que los gránulos  $\alpha$  liberen sus contenidos. Para ello también se han descrito diferentes protocolos que van desde el uso de cloruro cálcico solo o combinado con trombina hasta la mezcla cuantificada de PRP, cloruro cálcico/trombina, aire y variables tiempos de agitación [Eppley, 2006].

Independientemente del método utilizado para la activación de las plaquetas, la mezcla activada debe aplicarse antes de 10 minutos para evitar que se retraiga el coágulo y que secuestre en su superficie las proteínas secretoras.

### **Clasificación de los PRP**

Ante la variedad de productos y metodología aplicadas para la obtención de los mismos y con el objeto de clarificar términos, en 2009 se procedió a realizar una clasificación de los mismos atendiendo tanto al contenido en leucocitos como a las características del coágulo de fibrina que reagrupaba los PRPs en 4 familias [Dohan DM, 2009]:

1. **Pure Platelet-Rich Plasma (P-PRP)** o plasma rico en plaquetas pobre en leucocitos. Se caracterizan por la ausencia de leucocitos y por una red de fibrina de baja densidad. Por definición todos los concentrados plaquetarios incluidos en este grupo pueden usarse en forma líquida como en forma de gel

tras la activación plaquetaria.

2. **Leukocyte-and Platelet-Rich Plasma (L-PRP)** o plasma rico en plaquetas con presencia de leucocitos y una red de fibrina de baja densidad. Igual que el grupo anterior se puede aplicar en forma líquida o en forma de gel tras la activación de las plaquetas.
3. **Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF)** – o plasma rico en fibrina sin presencia de leucocitos, que se caracteriza por una red de fibrina de alta densidad, que por definición únicamente se utiliza en forma de gel tras ser activado y no puede ser inyectado.
4. **Leukocyte-and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF)** o plasma rico en plaquetas rico en leucocitos con matriz de fibrina de alta densidad.

En la **tabla 2**, se resumen algunos de los métodos de obtención más consolidados de plasmas ricos en plaquetas actualmente comercializados.

**Tabla 2:** Métodos de obtención consolidados de PRP [deLong, 2012]

Nombre del dispositivo	Tiempo centrifuga	Vol sangre inicial (mL)	Volumen PRP (mL)	Concentración plaquetaria	Contenido leucocitario
<b>P-PRPs</b>					
Arthrex (Naples/FL) ACP (Edison NJ)	5	16	4-7	2x-3x	-
Cascade/MTF Fibrin	6 (plasma) 21 (coágulo)	9	4,5 (plasma) 2 (coágulo)	1,3x-1,7x	-
PRGF (BTI, Spain)	8	9	2-3	2x-3x	-
<b>L-PRPs</b>					
GPSI/III Biomet (Warsaw,IN)	12-15	30 o 60	3 o 6	2x-8x	Superior al basal

## Antecedentes y estado actual del conocimiento

Nombre del dispositivo	Tiempo centrifuga	Vol sangre inicial (mL)	Volumen PRP (mL)	Concentración plaquetaria	Contenido leucocitario
SmartPREP 2 Harvest (Plymouth,MA) Symphony II (Warsaw,IN)	12-15	20 o 60	3 o 7-10	3x-7x	Superior al basal
Magellan Arteriocyte Medtronic (Minneapolis,MN)	14-20	30 o 60	3-10	3x-7x	Superior al basal
Abreviaturas	ACP, autologous conditioned platelets; BTI biotechnology Institute; GPS, gravitational platelet separation; MTF, musculoskeletal transplant foundation; PRGF, platelet rich plasma				

## ***Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)***

El PRGF objeto del estudio de la presente tesis es un plasma rico en plaquetas obtenido a partir de la sangre del propio paciente que presenta una serie de características diferenciales respecto al resto de productos disponibles.

Como la mayoría de los PRP anteriormente comentados, se trata de un método autólogo, esto es, se utiliza la sangre del propio paciente.

La primera diferencia respecto a otros sistemas viene determinada desde el mismo momento de su obtención, ya que el PRGF se prepara a partir de una centrifugación controlada y monoetápica de pequeños volúmenes de sangre del propio paciente, que pueden variar dependiendo de las características de la lesión.

Esta tecnología permite una concentración de plaquetas entre 2 y 3 veces mayor respecto a existente en sangre periférica, lo que se ha relacionado con un beneficio biológico óptimo [Weibrich, 2004], de hecho, en la literatura se ha descrito que concentraciones inferiores pueden resultar subterapéuticas mientras que concentraciones superiores pueden inducir efectos adicionales que incluso pueden llegar a ejercer acciones inhibitorias. [Knighton DR, 1986, Marx RE 2001].

Otra de las características del PRGF es la ausencia total de leucocitos en el producto obtenido, lo que permite evitar los efectos pro-inflamatorios de las proteasas y las hidrolasas ácidas contenidas en los leucocitos [Snabel, 2007].

Un último factor diferencial de este producto es el hecho de que la activación de plaquetas se realiza mediante la adición de cloruro

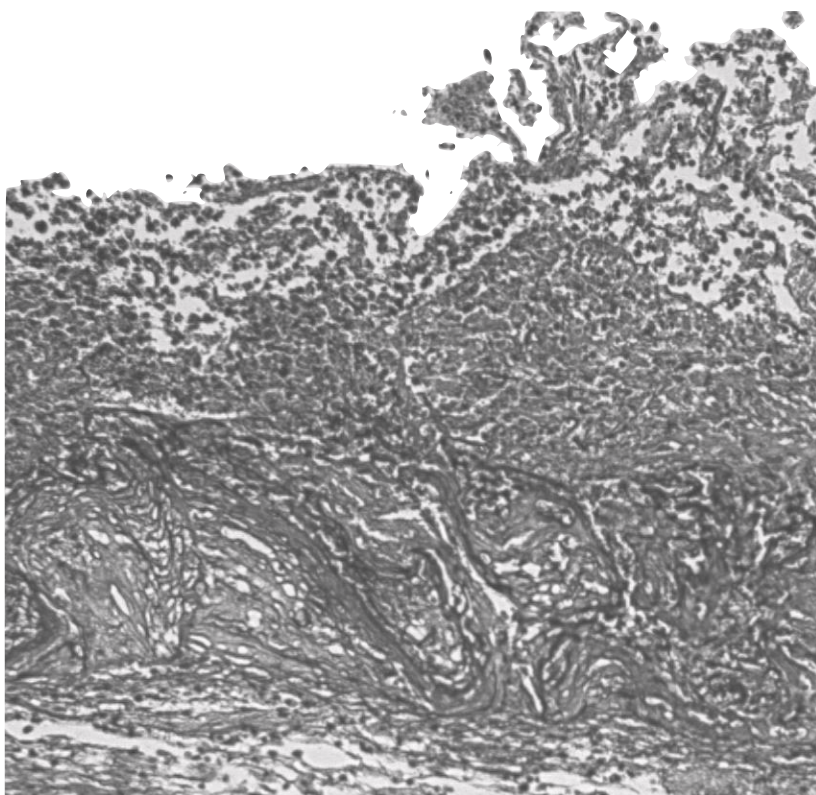
## **Antecedentes y estado actual del conocimiento**

---

cálcico sin utilizar trombina bovina, proporciona por un lado, una liberación sostenida de factores de crecimiento [Tsay RC, 2005], y por otro evita la aparición de potenciales coagulopatías [Anitua E, 2006; El-Sharkawy H, 2007].



## Justificación del estudio





Las heridas crónicas son un importante problema sanitario tanto para el paciente y sus familias, que ven gravemente limitada su calidad de vida, como para la administración interesada en controlar el elevado gasto socio sanitario derivado de su cuidado.

Partiendo de la necesidad de disminuir el impacto de este proceso y a medida que crecía el conocimiento respecto a la regeneración tisular ha aumentado exponencialmente el arsenal terapéutico específicamente diseñado para el tratamiento de estos procesos, aunque sin haberse encontrado todavía una solución óptima al problema.

Entre los tratamientos propuestos, en los últimos años se han presentado distintas sustancias implicadas en la curación de las heridas entre las que destacan los denominados de forma genérica factores de crecimiento, constituyendo las propias plaquetas una eficaz fuente autóloga de dichas moléculas.

Partiendo de estos hallazgos, en la primera década del presente siglo, se han desarrollado diferentes metodologías con el objeto de situar estos factores de crecimiento procedentes de las plaquetas en el lecho de las lesiones, sin embargo los estudios realizados para valorar su eficacia han sido escasos y con resultados contradictorios, probablemente debido a los distintas tecnologías de concentración plaquetaria empleadas.

En los últimos años, un grupo investigador (Anitua y cols) radicado en nuestra ciudad ha desarrollado un sistema de obtención de un preparado autólogo rico en plaquetas conocido como PRGF obtenido a partir de pequeños volúmenes de sangre del propio paciente.

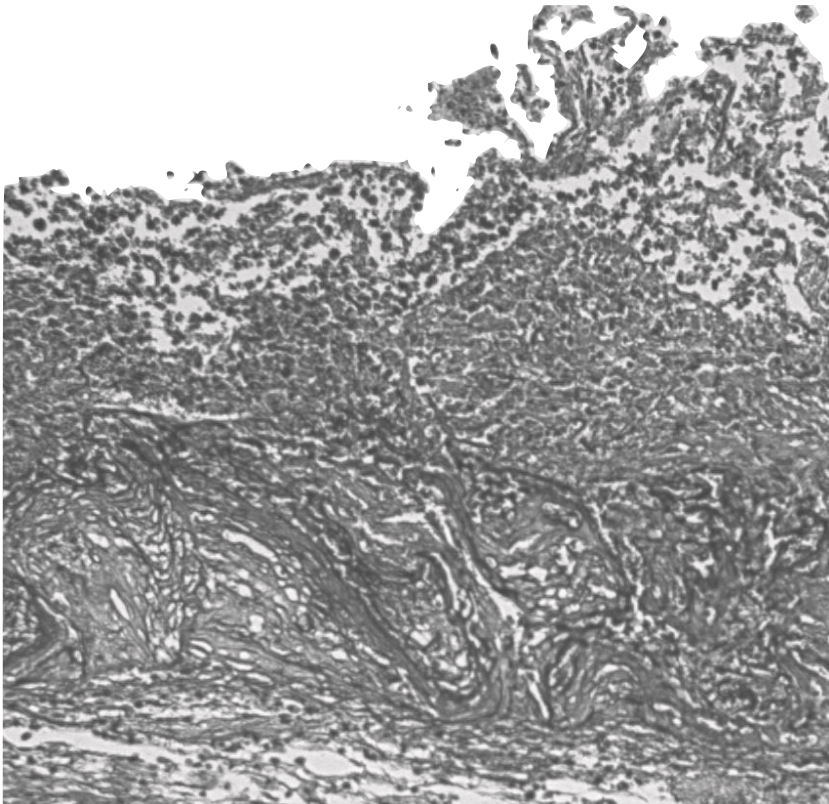
Tanto la cercanía geográfica con dicho grupo investigador (no puede olvidarse que este estudio los investigadores de este proyecto trabajan y residen en Vitoria-Gasteiz) así como nuestro interés específico en la valoración de la aplicación de la tecnología PRGF en el tratamiento específico de las úlceras cutáneas, nos llevó a iniciar una línea de investigación que nos permitiera obtener con el mayor rigor científico posible y aplicando la metodología adecuada, los primeros datos relativos a la eficacia y seguridad del PRGF en esta indicación concreta.

En el momento en el que se inició esta tesis doctoral, no se conocía el grado de eficacia y seguridad de su aplicación en diversas situaciones patológicas entre las que estaba la cicatrización de heridas cutáneas.

De este interés surgieron los cuatro estudios incluidos en la presente tesis doctoral en los que se procedió a caracterizar el producto, incidiendo en la capacidad bacteriostática del mismo, para después valorar su eficacia en la cicatrización de heridas cutáneas en general, centrándonos por último en el tratamiento de las úlceras de origen venoso y en la curación de las heridas postquirúrgicas del sinus pilonidal.

Los tres primeros estudios se encuentran ya publicados. El cuarto estudio ha sido remitido para su publicación a la revista *Annals of Surgery* y se encuentra actualmente en proceso de revisión.

## Objetivos del estudio





## **Objetivo GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo es evaluar mediante la metodología apropiada la eficacia y seguridad del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en el tratamiento de heridas crónicas cutáneas así como caracterizar los mecanismos biológicos que subyacen en su eficacia y seguridad.

## **Objetivos específicos**

Como objetivos específicos se consideraron:

1. Explorar la eficacia y seguridad del PRGF en el tratamiento de heridas cutáneas crónicas mediante la realización de un primer ensayo clínico aleatorizado controlado con tratamiento convencional. A este objetivo se responde en el Artículo 1.
2. Realizar una caracterización cuantitativa del PRGF mediante el recuento de plaquetas y factores de crecimiento procedentes de las plaquetas (PDGF, TGF- $\beta$ , IGF, VEGF, EGF) implicados en los procesos de regeneración cutánea. A este objetivo se responde en el Artículo 1.
3. Investigar el potencial efecto antibacteriano frente a las más frecuentes cepas de estafilococos (estafilococo aureus, estafilococo epidermis) incluyendo cepas meticilin sensibles y meticilin resistentes, evaluando el efecto antimicrobiano de la incorporación de leucocitos en las formulaciones estudiadas. A este objetivo se responde en el Artículo 2.

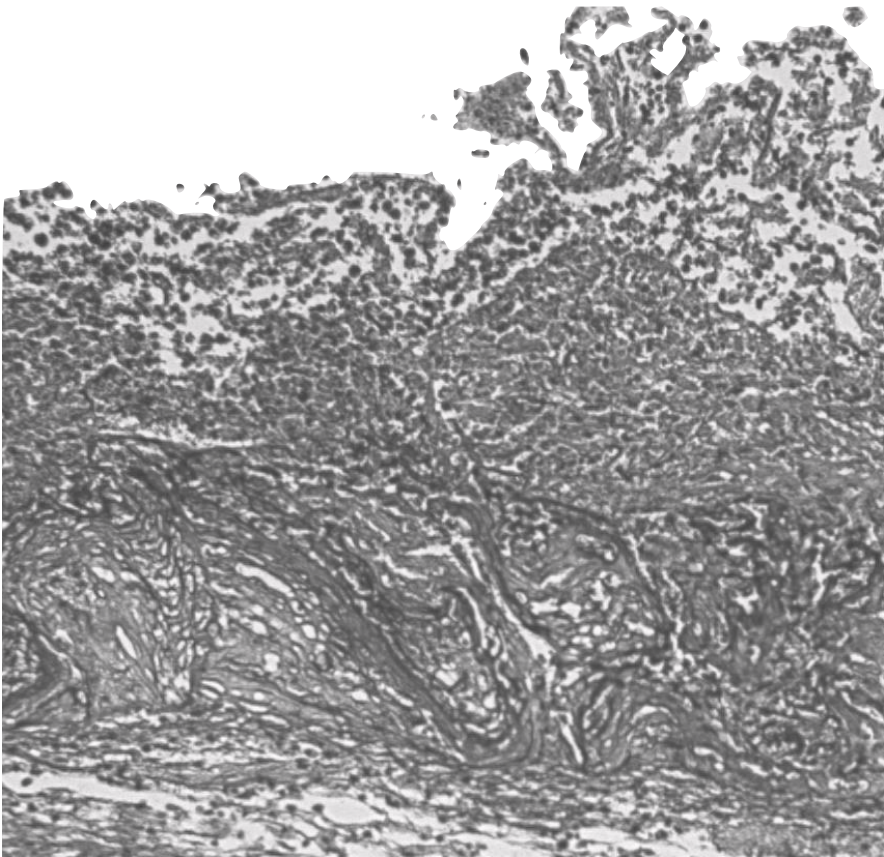
## Objetivos del estudio

---

4. Estudiar la eficacia del PRGF y seguridad en el tratamiento de las úlceras secundarias a insuficiencia venosa mediante un segundo ensayo clínico randomizado, controlado con tratamiento convencional. A este objetivo se responde en el Artículo 3.
  
5. Conocer la eficacia y seguridad de la utilización intraoperatoria de PRGF en la indicación de heridas quirúrgicas de difícil cicatrización, concretamente en la excisión quirúrgica del sinus pilonidal mediante un tercer ensayo clínico randomizado controlado con el tratamiento quirúrgico convencional (excisión y cierre en segunda intención). A este objetivo se responde en el Artículo 4.



## Fase experimental





## ***Artículo 1***

# **Effectiveness of Autologous Preparation Rich in Growth Factors for the Treatment of Chronic Cutaneous Ulcers**

### **Referencia:**

Anitua E, **Aguirre JJ**, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, Andia I. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008;84(2):415-21. PubMed PMID: 17595032.



---

## Effectiveness of Autologous Preparation Rich in Growth Factors for the Treatment of Chronic Cutaneous Ulcers

---

Eduardo Anitua,<sup>1</sup> José J. Aguirre,<sup>1</sup> Jaime Algorta,<sup>2</sup> Eduardo Ayerdi,<sup>3</sup> Ana I. Cabezas,<sup>4</sup> Gorka Orive,<sup>1</sup> Isabel Andia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Institute, Vitoria, Spain

<sup>2</sup> Fundación LEIA, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain

<sup>3</sup> Service of Traumatology, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain

<sup>4</sup> Service of Vascular Surgery, Hospital Txagorritxu, Vitoria, Spain

Received 2 November 2006; revised 5 March 2007; accepted 3 May 2007  
Published online 26 June 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.b.30886

**Abstract:** Autologous Preparation Rich in Growth Factors (PRGF), a small volume of plasma enriched in platelets, is a novel therapeutic strategy for the acceleration of the wound healing of a wide range of tissues because of the continuous release of multiple growth factors, including PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, IGF-I, HGF, VEGF-A, and EGF. In this article, we have characterized the PRGF preparation and designed a randomized open-label controlled pilot trial to evaluate the effectiveness of PRGF in the treatment of chronic cutaneous ulcers. Results showed that at 8 weeks, the mean percentage of surface healed in the PRGF group was 72.94%  $\pm$  22.25% whereas it was 21.48%  $\pm$  33.56% in the control group ( $p < 0.05$ ). These results, with the limitations of a pilot study, suggest that topical application of PRGF is more effective than standard therapy in helping a chronic ulcer to heal. © 2007 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 84B: 415–421, 2008

**Keywords:** chronic cutaneous ulcers; platelet; growth factors; PRGF; randomized trial

### INTRODUCTION

Cutaneous ulceration is a common clinical problem rising with the increasing median age of the population. The European Union allocates 2% of the yearly health budget to wound care<sup>1</sup> and it is estimated that in the United States the costs related to the care of patients with pressure ulcers is over \$1.3 billion per year.<sup>2</sup> Absence of healing is not uncommon when predisposing factors, such as rheumatism, diabetes, peripheral vascular

disease, or previous scars are present. In fact some comorbid conditions could be related to a deficiency of growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF), epithelial growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ulcer site, resulting in the impairment of the healing process<sup>3</sup>. Additionally, matrix metalloproteinases (MMP's) have also been implicated with excessive extracellular matrix degradation in chronic venous ulcers with

the resultant failure of completion of the healing process.<sup>4,5</sup>

The dynamic and efficient process of wound healing involves a complex dynamic series of events, including hemostasia, inflammation, granulation tissue formation, epithelialization, neovascularisation, collagen synthesis, and wound contraction. Blood platelets have a major role in initiation of cutaneous wound healing. They adhere, aggregate, and release numerous growth factors, adhesive molecules, and lipids that regulate the migration, proliferation, and functions of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells.

Some of the stored growth factors essential for wound repair include PDGF, transformed growth factor (TGF- $\beta$ ), VEGF, basic fibroblast growth factor, EGF, type-I insulin-like growth factor (IGF-I), and hepatocyte growth factor

(HGF).<sup>6-10</sup> In fact, the potential therapeutic effects of some of these growth factors in promoting wound healing has been reported.<sup>11,12</sup> The key roles of growth factors in wound healing has stimulated significant research efforts aiming to test different platelet-derived products as therapeutic treatments to improve wound healing and to accelerate the closure of chronic wounds. Technology has evolved since the first applications of this concept. Initially a liquid product containing autologous platelet secreted molecules was applied in collagen gels. Thereafter, various types of platelet rich products known as platelet rich plasma (PRP), have been essayed in several pilot studies, case series, and clinical trial.<sup>13-15</sup> However, although most of the studies have reported significant improvements in the recovery of chronic ulcers, some did not observe any positive influence<sup>16</sup>. This is probably a

consequence of the insufficient standardization and definition for the different platelet-derived products currently being tested that differ from a qualitative and quantitative point of view.

Preparation rich in growth factors (PRGF) consists of a limited volume of plasma enriched in platelets that is rapidly obtained from the patient and easily prepared. Some of the specific characteristics of this optimized and safe formulation include the absence of leukocytes and its activation by means of calcium chloride instead of thrombin that enables a more physiological release of the growth factors implicated in wound healing.<sup>17</sup> Using the same protocol, it is possible to obtain a highly elastic, biocompatible, and homeostatic fibrin, which is an excellent biomaterial to regenerate soft tissues. Autologous PRGF has been used in the treatment of multiple musculoskeletal

disorders and in the regeneration and healing of a wide range of tissues.<sup>18-21</sup> The goal of this preliminary study is to test whether PRGF applications could be extended to the treatment of chronic ulcers. To address this issue, a full quantitative characterization of PRGF was carried out and a randomized open-label controlled pilot trial was designed to assess the effectiveness and safety of PRGF for the treatment of chronic cutaneous ulcers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **PRGF Treatment Characterization**

Before undertaking the application of PRGF in chronic ulcers, a full characterization of the PRGF was carried out to assess the variability between subjects. For this purpose, we determined platelet count and quantified the concentrations of some relevant factors that actively participate during the

healing process. Briefly, 10 mL of blood were drawn from 25 informed healthy volunteer; platelets were counted in peripheral blood and in the PRGF. A platelet-rich fibrin matrix was formed by adding calcium chloride at a final concentration of 22.8 mM and clots were allowed to retract for 1 h at 37°C.<sup>17</sup> The released supernatants were assayed for PDGF-AB, TGF- $\beta$  1, IGF-I, VEGF-A, HGF, and EGF, using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (Quantikine colorimetric ELISA kits, R&D, Minneapolis, MN).

### **Patients**

Between September 2003 and July 2004, a randomized, open-label, standard care-controlled pilot clinical trial was conducted to estimate the effectiveness and safety of topical application of PRGF to accelerate wound healing in patients with chronic cutaneous ulcers. The study was

conducted in accordance with the principles of Declaration of Helsinki 1996 version and Good Clinical Practice standards. The study protocol, informed-consent form, and the other study related documents were reviewed and approved by Human Research Ethics Committee of Hospital Txagorritxu before initiation of the study. All patients gave written informed consent.

A minimum number of 14 patients completing the study were established to collect preliminary information on the effectiveness of PRGF for wound healing as a background experience to be explored in future studies. Patients of both sexes aged 18 years with at least one nonhealing ulcer (Wagner grade II or III) of less than 12 cm in diameter were candidates for inclusion in the study provided that the ulcers were chronic (i.e., had been present for > 4 weeks) and patients were able to attend the



clinical investigation unit for wound care during a 7-day screening period and then once a week for 8 consecutive weeks, and signed informed consent.

Exclusion criteria were the following: arterial origin of the cutaneous ulcer; presence of systemic infection and/or clinical manifestations compatible with active local infection; history of insulin-dependent diabetes mellitus, active vasculitis, systemic lupus erythematosus, cryoglobulinemia, severe hematological abnormality, epilepsy, or solid tumor; current use of anticoagulants and/or treatment with immuno-suppressant drugs; serum haemoglobin concentration  $< 11$  g/dL or hematocrit  $< 34\%$ ; and any condition that may interfere the patient's participation in the study (e.g., total immobility, inadequate nutritional status). Women who were pregnant, nursing, or childbearing potential not using an acceptable form of birth

control were excluded.

At baseline, a general medical history was obtained and physical examination performed. When several ulcers were present, the largest ulcer was designated as the target one.

For each patient the following data were recorded: demographics (age, gender); origin of the lesion (venous ulcer, pressure ulcer, surgery, trauma); localization; ulcer duration; ulcer surface; presence or absence of pain; patient's general condition (categorized as excellent, good, intermediate, poor); and patient's mobility (categorized as no limitations, slightly limited, very limited). All this information is summarized in Table I.

### **Study Procedures**

Patients were randomly assigned according to a computer generated randomization table to wound care with

**TABLE I. Baseline Data of the Intent-to-Treat Data Set**

Data	PRGF Group (n = 8)	Standard Care Group (n = 7)
Men/women	4/4	4/3
Age, years, mean (SD)	45 (20)	61 (16)
General status, no. (%)		
Excellent/good	7 (87.5)	6 (85.7)
Intermediate	1 (12.5)	1 (14.3)
Poor	0	0
Functional mobility, no. (%)		
Full	6 (75)	5 (71.4)
Limited	2 (25)	2 (28.6)
Ulcer origin, no. (%)		
Venous	5 (62.5)	5 (71.4)
Pressure	2 (25)	2 (28.6)
Other	1 (12.5)	0
Localization, no. (%)		
Legs	6 (75)	5 (71.4)
Pelvic region	2 (25)	2 (28.6)
Duration of ulcer, weeks, mean (SD)	68 (61)	110 (164)
Ulcer area, cm <sup>2</sup> , mean (SD)	5.5 (4.8)	8.9 (8.6)

PRGF (experimental group) or standard wound care (control group). The study protocol included a 7-day washout phase, a baseline assessment, and a treatment period of 8 weeks.

*Baseline Assessment.* In both

groups, wounds were cleansed with normal saline and moist saline gauze dressings were used. Cleansing with normal saline solution was performed gently using gauzes and/or sponges with minimum mechanical force to avoid friction or rubbing against the

ulcer bed. When infection of the ulcer bed was suspected, the dressing was removed and the patient underwent ulcer debridement, wound cleansing with physiological saline, and systemic antibiotic therapy.

*PRGF Ulcer Application Procedure.* Preparation and application of the PRGF was performed by qualified technicians who had been previously trained by personnel of the Biotechnology Institute where the PRGF procedure was developed. 18–27 mL of venous blood were withdrawn by venous puncture from an antecubital vein a few minutes before wound care. Blood was collected on sterile tubes (4.5 mL) containing 3.8% (w/v) trisodium citrate, then centrifuged at 460 g for 8 min (PRGF System1 B.T.I. Biotechnology Institute, Vitoria-Gasteiz, Spain). The 1-mL fractions located immediately above the erythrocytes were collected from each tube and transferred to sterile tubes.

Fifty micrometers of CaCl<sub>2</sub> at 10% (w/v) were added per 1-mL fraction of platelet-enriched plasma and small volumes (100–200  $\mu$ L) of the activated plasma were sequentially injected into the margins of the ulcer. Additionally the remaining plasma was allowed to clot *ex vivo* and the newly developed fibrin matrix was placed on the bed of the ulcer. Then the area was covered with a moist saline gauze dressing. In all cases, the time elapsed between vein puncture and treatment ulcer was less than 2 h.

*Standard Care.* Patients underwent ulcer debridement and wound care with physiological saline (sodium chloride 0.9%) warmed to room temperature as cleansing agent and sterile gauzes as secondary dressing.

Each week, during the 8-week study period, ulcer evaluation was performed, patients underwent treatment procedure

**TABLE II. Correlations (Pearson Coefficients) Between Age, Growth Factors, and Platelets Measured in the PRGF Prepared from the Peripheral Blood of 25 Healthy Volunteers**

	Platelet Count in PRGF	TGF- $\beta$ 1	PDGF	IGF-I
Age	-0.0448	-0.2225	-0.0824	-0.5477*
PDGF	0.6751**	0.8731**		-0.2800
TGF- $\beta$ 1	0.8231**		0.8731**	-0.3483
EGF	0.6084*	0.4065***	0.2184	-0.2249
VEGF	0.5713*	0.4645*	0.4299***	-0.5887*
HGF	0.2170	0.0746	0.0163	-0.1436

\* $p < 0.01$ ,

\*\* $p < 0.001$ ,

\*\*\* $p < 0.05$ .

(PRGF or standard care) and adverse effects reported spontaneously by patients or after questioning in a general way were recorded. Pictures of the ulcers were obtained with a digital camera. Patients attended the research unit of the hospital until either complete healing (full epithelization) or 8 weeks of treatment.

**Efficacy Variable**

The primary endpoint of the study was the percentage of surface area healed. This variable was selected

according to recommendations of the National Group for the Study and Assessment of Pressure Ulcers and Chronic Wounds (<http://www.gneaupp.org>) based on the National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP) (<http://www.npuap.org>).<sup>22</sup> The Mouseyes software program (version 2.1) was used to calculate wound areas derived from digital camera image files.

23

The percentage of surface area healed was estimated as "initial ulcer surface-final ulcer

surface/initial ulcer surface X100 ”.

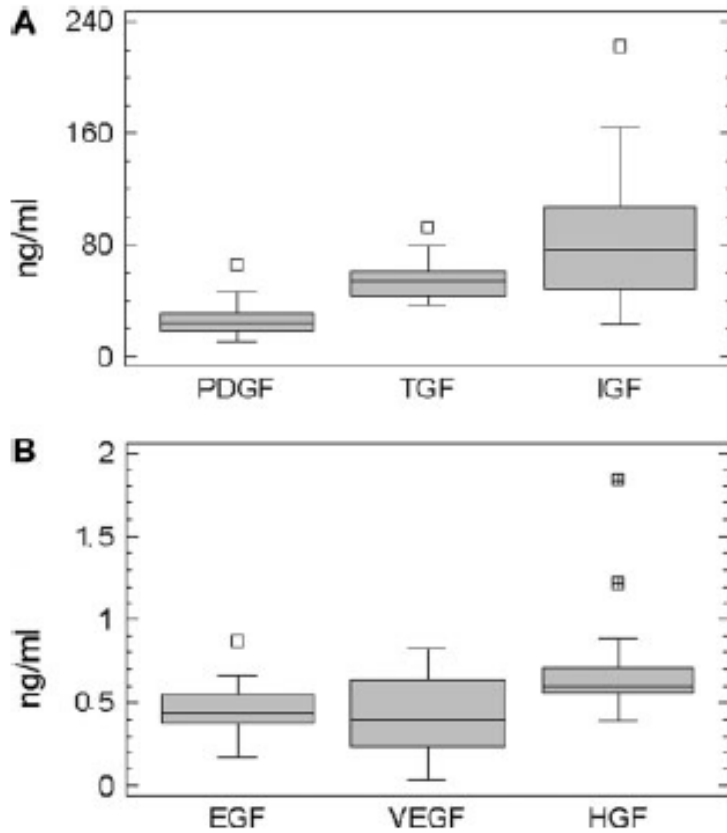
### Statistical Analysis

Platelet counts and growth factor concentrations are expressed as mean  $\pm$  SD. Correlations were sought using Pearson correlation coefficient (r). Patients' data were analyzed by intent-to-treat. Between and within group comparisons of efficacy variables were carried out using the Mann–Whitney U - test and the Wilcoxon signed-rank test for paired samples, respectively. To determine the effect of patient's related confounding variables (age, sex, baseline general status, functional mobility) or ulcer-related variables (duration of ulcer [ $< 4$  weeks vs. 4 weeks], type of ulcer [venous vs. non-venous], localization, ulcer area [ $< 4$  cm<sup>2</sup> vs 4 cm<sup>2</sup> ], and classification [Braden scale score]) on outcome, a stratified analysis for each variable using the Mann–Whitney U-test and

the Kruskal–Wallis tests according to the number of categories of the explanatory variable was performed. Categorical data were compared with the chi-square ( $X^2$ ) test. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, version 12.0) was used for the analysis of data. A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant.

### RESULTS

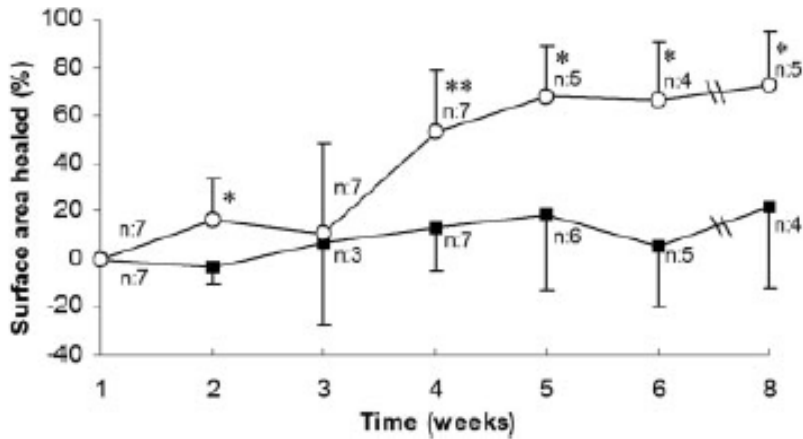
**PRGF Characterization** To provide broad information of the product obtained using the earlier described procedure, a full characterization of the main growth factors released from activated PRGF was carried out in 25 subjects matched by age with the studied group,  $51.6 \pm 17$  years, (range: 20–80). The PRGF elaborated as described earlier resulted in a significant enrichment in platelet number, 2.67 6 0.6-fold increase comparing with peripheral blood. On the



**Figure 1.** Growth factor concentrations determined in the PRGF from 25 healthy donors. (A) the most concentrated growth factors (ng/mL), including TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB, and IGF-I and (B) less concentrated factors (ng/mL), including VEGF, HGF, and EGF. Boxes show the range between the 25th and 75th percentiles with a horizontal line at the median value.

contrary, leukocyte content was below the detection limit of the coulter, confirming the absence of leukocytes in the PRGF, which improves the homogeneity of the product and reduces donor-to-donor variability.

Platelets counts and growth factor content were examined for a general description of this product. The content of growth factors released from the activated PRGF was also measured for each donor. This data is particularly important



**Figure 2.** Percentage of surface area healed in the PRGF group (empty circles) versus standard care group (full squares). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

since these growth factors are directly implicated in the wound healing process. Results showed that activation of PRGF with calcium chloride induced the release of different growth factors from platelet alpha-granules [Figure 1(A,B)]. Interestingly, it was found a direct correlation between platelet number and some of the released growth factors, such as PDGF, TGF- $\beta$  1, VEGF, and EGF (Table II). This strong relationship indicates that platelets are the main source of these growth factors.

On the other hand, no correlation was observed for HGF and IGF-I. Another focus of interest is to study the correlation between the age of the patients and the growth factor content. As shown in Table II, IGF-I is inversely correlated with the age ( $r = 0.5477$ ,  $p = 0.0046$ ), that is, IGF-I levels decrease as patients get older.

**Clinical Outcome of PRGF and Control Groups** In this randomized open-label controlled pilot trial, fourteen patients (7 men, 7 women) with



**Figure 3.** Evolution of a typical skin ulcer treated with PRGF: debrided ulcer before treatment (A), after 1 (B), 4 (C), and 8 (D) weeks, respectively. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

a mean (standard deviation, SD) age of 53 (20) years (range: 23–76 years) were included in the study, 7 patients were assigned to the PRGF group, and 7 to the standard care group. One patient from the PRGF group was excluded from the analysis because a new cutaneous lesion causing invasion of the index ulcer developed in the course of a respiratory infection at week 2. In the PRGF group, 1 patient discontinued the study at week 4 because of atopic dermatitis and use of topical medication incompatible with the clinical trial, and another patient was

withdrawn at week 5 because of chronic venous insufficiency surgery (an elective operation that was already foreseen at the study entry). In the standard care group, 3 patients discontinued the study: 1 patient had a systemic infection that required inpatient care at week 5, 1 patient discontinued after week 4 because he considered that hydrocolloid dressings used prior to the study were more effective than the standard care, and 1 patient was lost to follow-up because of a change in the place of residence. Therefore, 5 patients in the PRGF group



and 4 in the standard care group completed the study.

A total of 14 ulcers were assessed (64% venous leg ulcers, 29% pressure ulcers, and 7% other). Both groups were comparable at entry. Percentage of healing surface, calculated from ulcer area variations during the study period are shown in Figure 2. Results show that the percentage of surface area healed in the PRGF group was significantly higher than in the standard care group during all the evaluation points of the study. In fact, the mean percentage of surface healed at 8 weeks was 72.94 (22.25)% in the PRGF group and 21.48 (33.56)% in the standard care group ( $p < 0.05$ ). Figure 3 shows a representative case of an ulcer treated with PRGF. At the end of the study, complete healing was observed in only one ulcer from a patient in the PRGF group. In the stratified analyses the patient's variables or ulcer related variables had

no significant effect on outcome in any of the study groups.

A total of four adverse events (ulcer bed infection 3, anemia 1) possibly related to the study treatment occurred in 3 patients. Super-infection of the ulcer bed developed in 1 patient from the PRGF group and in 2 patients from the standard care group, in 1 of which in combination with laboratory abnormalities. This patient required admission to the hospital and was treated with antimicrobials and oral protein–energy supplements. In all cases, however, ulcer bed infection resolved in about 8 days with oral antibiotic treatment. Differences between the treatment groups in relation to adverse events were not found ( $p = 0.476$ ).

## DISCUSSION

In the present article, we have evaluated the effectiveness of PRGF in the treatment of

chronic ulcers, which suppose a major cost for the public health and substantially impair the patients' quality of life. The hypothesis for this study is a consequence of the increasing interest in the use of platelet derived growth factors in cutaneous wound healing,<sup>8</sup> particularly in the management of pressure ulcers, chronic venous leg ulcers,<sup>24</sup> and diabetic neuropathic foot ulcers.<sup>25</sup>

In the last few decades, several crucial roles of growth factors and platelets have been identified in tissue repair. For example, PDGF has been suggested to have two major but distinct roles in wound healing, an early role to stimulate fibroblast proliferation and a later function to induce the myofibroblast phenotype.<sup>26</sup> VEGF due to its angiogenic effects play a key role in wound healing. In fact, application of neutralizing VEGF-A antibodies caused a significant reduction of wound angiogenesis, fluid

accumulation, and granulation tissue formation in a pig wound model. Additionally, several studies have reported that abnormal expression of IGFs and their receptors lead to impaired wound healing.<sup>27,28</sup>

One major limitation, however, to the therapeutic use of growth factors to assist in tissue repair and in the management of chronic ulcers is to find efficacious alternatives for efficient growth factor delivery. Platelet rich preparations might overcome this limitation by combining the potential benefits of platelets and 3D fibrin matrices hence creating a biotechnological product for the continuous release of growth factors.<sup>15</sup> Several studies using different platelet-rich products have reported significant improvements in the recovery of chronic ulcers. For instance, Martí-Mestre et al. reported healing of chronic vascular ulcers using a platelet rich product in 12 of a series of 14

patients in a mean of 2.93 months (range: 0.5–7 months).<sup>29</sup> In another report, Mazzucco et al. observed that treatment of dehiscent sternal wounds with platelet gel reduced the complete healing rate (3.5 vs. 6 weeks) and hospital stay in 21 days when comparing with conventional treatment.<sup>30</sup> However, some other studies testing platelet rich products have no reported beneficial effects in the treatment ulcers. For example, Stacey et al. compared 42 patients receiving a platelet lysate preparation with 44 patients having conventional treatment.

Results showed that their platelet lysate product had no influence on the healing of chronic ulcers.<sup>16</sup> These discrepancies may lead to a general controversy about the potential benefits of platelet-rich products. Therefore, it is necessary to perform a full characterization of the main properties of each platelet-rich preparation.

To address this issue and thus describe the important original features identifying PRGF from other PRP products, we have made a full characterization of the PRGF obtained from healthy subjects. As shown, PRGF contains a moderate elevated platelet concentration (2–3-fold increase) that has been reported to induce an optimal biological benefit.<sup>31</sup> Of note, PRGF does not contain leukocytes, improving the homogeneity of the product and reducing donor-to-donor variability.

This is important since neutrophils are an important source of MMP-8 and -9 and secrete other proteases, such as elastases<sup>4</sup> that are destructive for growth factors and release reactive oxygen species deleterious for cell survival. Furthermore, PRGF is activated by calcium chloride enabling a more physiological and sustained release of a wide range of growth factors, including PDGF-AB, TGF- $\beta$  1,

VEGF-A, EGF, HGF, and IGF-I. The quantification of the growth factors released from activated PRGF, revealed a strong direct correlation among PDGF-AB, TGF- $\beta$  1, VEGF-A, and EGF and platelet number. This is a consequence of the major presence of these growth factors in platelets' alpha-granules.

Furthermore, an interesting constant proportion between PDGF-AB and TGF- $\beta$  1 is released from PRGF in the absence of leukocytes.

Another important consideration of the PRGF elaboration procedure is that using the same cost-efficacy protocol, we obtain a highly elastic and haemostatic fibrin from the same patient's blood. This autologous fibrin in an excellent biomaterial to regenerate surrounding soft tissues. Even though studies made in fibrinogen knockout mice have revealed that fibrinogen is not an essential

component for healing,<sup>32</sup> it provides an excellent vehicle for local growth factor delivery, functioning as a provisional matrix that would support the ingrowth of neovasculature and the migration of cells into the dead space.

After the characterization of the product, we evaluated the effectiveness of PRGF in the treatment of chronic ulcers.

Results of this pilot randomized, controlled trial indicates that wound care using PRGF is effective in the management of chronic cutaneous ulcers compared with standard care with normal saline. In fact, statistically significant differences were found between both groups from the 2nd week post-treatment until the end of the study (8th week). In addition, PRGF resulted to be a safe treatment. Although one of the four cases of infection of the ulcer bed occurred in the PRGF group, it was more related to the

evolution of the lesion than to the PRGF treatment itself. The remaining adverse events were observed in the control group but differences between the study groups were not significant. Given the heterogeneity of ulcers included in the study, it may be argued that response to treatment may be influenced by differences in baseline characteristics of cutaneous lesions. However, the stratified analysis considering both patient- and ulcer-related variables did not reveal significant differences.

In summary, results from this pilot randomized controlled trial, although obtained in a small group of patients, strongly support safety and effectiveness of PRGF formulation as a therapeutic treatment for accelerating the healing process of different chronic ulcers in a reduce period of time. Future clinical trials with larger samples and larger end-points will be necessary to unequivocally

establish the full potential of PRGF.

The authors are grateful to Silvia Francisco for excellent technical support and to Marta Pulido, MD, for editing the manuscript and editorial assistance.

## REFERENCES

1. Ruckley CV. Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers. *Angiology* 1997;48:67–69.
2. Diegelman RF, Evans MC. Wound healing: An overview of acute fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004;9:283–289.
3. Carter CA, Jolly DG, Worden CE Sr, Hendren DG, Kane CJM. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol* 2003; 74:244–255.
4. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelman RF, Cohen IK. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996;107:743–748.
5. Mwaura B, Mehendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, Adham M, Connolly CE, Sultan S. The impact of differential expression of extracellular

## Artículo 1

---

- matrix metalloproteinase inducer, matrix metallo-proteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *Eur J Endovasc Surg* 2006;31:306–310.
6. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4–15.
7. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993;166:74–81.
8. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993;165:728–737.
9. Fu X, Li X, Cheng B, Chen W, Sheng Z. Engineered growth factors and cutaneous wound healing: Success and possible questions in the past 10 years. *Wound Rep Regen* 2005;13: 122–130.
10. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Avd Skin Wound Care* 2004;17:24–35.
11. Knighton DR, Doucette M, Fiegel VD, Ciresi K, Butler E, Austin L. The use of platelet derived wound healing formula in human clinical trials. *Prog Clin Biol Res* 1988;266:319–329.
12. Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH. A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic non-healing wounds: A preliminary report. *J Vasc Surg* 1991;14:526–532.
13. Ganio C, Tenewitz FE, Wilson RC, Moyles BG. The treatment of chronic nonhealing wounds using autologous platelet derived growth factors. *J Foot Ankle Surg* 1993;32:263–268.
14. Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transf Apheresis Sci* 2004;30: 145–151.
15. Saldalamacchia G, Lapice E, Cuomo V, De Feo E, D'Agostino E, Rivellese AA, Vaccaro O. A controlled study of the use of autologous platelet gel for the treatment of diabetic ulcers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004;14:395–396.
16. Stacey MC, Mata SD, Trengove NJ, Mather CA. Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer r healing. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:296–301.
17. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006;5:227–234
18. Anitua E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of the use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Impl* 1999;14:529–535.

## Artículo 1

---

19. Anitua E, Andia I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, Nurden P, Nurden AT. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005;23:281–286.
20. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zaldueño M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. Autologous fibrin matrices: A potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mat Res* 2006;77:285–293.
21. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1648–1652.
22. Stotts NA, Rodeheaver GT, Thomas DR, Frantz RA, Bartolucci AA, Sussman C, Ferrell BA, Cuddigan J, Maklebust J. An instrument to measure healing in pressure ulcers: Development and validation of the pressure ulcer scale for healing (PUSH). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:M795–M799.
23. Taylor RJ. Mouseeyes revisited: Upgrading a computer program that aids wound measurement. *J Wound Care* 2002;11: 213–216.
24. Araujo T de, Valencia I, Kirsner RS. Managing the patient with venous ulcers. *Ann Intern Med* 2003;138:326–334.
25. Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad O, Malay S, Berlin JA. Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factors for treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Rep Regen* 2005;13:531–536.
26. Clark RA. Regulation of fibroplasias in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993;306:42–48.
27. Bitar MS. Insulin and glucocorticoid-dependent suppression of the IGF-I system in diabetic wounds. *Surgery* 2000;127: 687–695.
28. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003;83:835–870.
29. Martí-Mestre FX, Acosta-Gómez M, Bonell-Pascual A, Linares-Ruiz P, Romera C, Yñiguez-Navas O. Resultados preliminares de la aplicación de factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras vasculares. *Angiología* 2005;57:335–343.
30. Mazzucco L, Medici D, Serna M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattana E, Levis A, Betta PG, Borzini P. The use of autologous platelet gel to treat difficult to heal wounds: A pilot study. *Transfusion* 2004;44:1013–1018.
31. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on periimplant bone regeneration. *Bone* 2004;34:665–671.
32. Drew AF, Liu JM, Davidson JM, Daugherty CC, Degen JL. Wound healing defects in mice lacking fibrinogen. *Blood* 2001;97:3691–3698.





## **Artículo 2**

### **Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains.**

#### **Referencia:**

Anitua E, Alonso R, Girbau C, **Aguirre JJ**, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains. Clin Exp Dermatol. 2012;37(6):652-7.



## Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF<sup>®</sup>-Endoret<sup>®</sup>) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains

E. Anitua, R. Alonso,\* C. Girbau,\* J. J. Aguirre, F. Muruzabal and G. Orive

Biotechnology Institute (BTI ImasD), Vitoria, Spain; and \*Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of The Basque Country, Vitoria, Spain

doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04303.x

### Summary

**Background.** Formulations containing plasma rich in growth factors (PRGF) are opening new avenues in the field of regenerative medicine.

**Aim.** To evaluate the potential antimicrobial effects of a product (plasma rich in growth factors; PRGF<sup>®</sup>-Endoret<sup>®</sup>) against both methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The potential effect of incorporating the patient's leucocytes into the PRGF formulation (F3+leu) was also studied.

**Methods.** Blood samples were obtained from five healthy volunteers and used to prepare each type of PRGF (F1, F3 and F3+leu). Various biological assays were performed to compare the characteristics of the different formulations, including measurement of the concentration of platelets and leucocytes, and assays of coagulation. The microbiological activity of PRGF-Endoret against both staphylococcal strains was performed by counting the number of the surviving bacterial colonies after incubation at 0, 4 and 8 h with the different formulations.

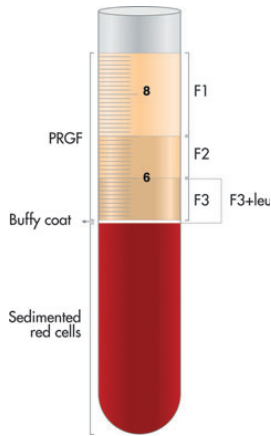
**Results.** The three PRGF-Endoret formulations evaluated were enriched in platelets by 1.10, 2.57 and 1.89 times, respectively, and the leucocyte concentration in the F3+leu sample was increased by 3.9 times. We found that all formulations had a strong bacteriostatic effect, especially in the first 4 h after application. All formulations had an antibacterial effect at 4 h for three of the four strains, with the exception of methicillin-sensitive *S. epidermidis*. No differences in the bacterial inhibitory effect were found between the formulations.

**Conclusions.** This is the first time different formulations of this product have been evaluated, and the results suggest that PRGF-Endoret could be used in the fight against postoperative and wound infections.

### Introduction

The field of tissue repair and regeneration is advancing rapidly towards the development of personalized treatments and less invasive procedures. Over the past few years, there has been renewed interest in using the patient's own growth factors and

biomaterials<sup>1</sup>. In particular, the use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret; PRGF in Europe, Endoret in the USA) technology is opening new avenues in regenerative medicine<sup>2</sup>. PRGF-Endoret technology allows production of various formulations of enriched platelets (in clinic, these would be the patient's



**Figure 1** The different plasma rich in growth factors (PRGF) fractions. The plasma volume was drawn off in several consecutive fractions into a 9 mL blood tube and separated by centrifugation. The first fraction (F1) made up about 2 mL located at the top of the tube, F2 formed the next 1 mL, and F3 the bottom 1 mL of plasma located just above the sedimented red cells, avoiding the buffy coat; F3+leu included the buffy-coat fraction.

own), but without leucocytes, which, after activation with calcium chloride allows the in situ formation of a biodegradable fibrin scaffold and the release of a pool of biologically active proteins that influence and promote several biological processes, including cell recruitment, growth and differentiation<sup>3,4</sup>. Based on this new technology, significant clinical advances have been made in terms of wound healing and tissue

regeneration<sup>5-7</sup>. In recent studies, PRGF-Endoret was used both topically and as subcutaneous injection for treatment of various ulcer types, including a severe neuropathic ulcer, producing an acceleration in wound healing<sup>8,9</sup>. However, one major problem associated with all types of wound healing-processes is the potential risk of microbial contamination. Although most infections are of a polymicrobial nature, a very large proportion of all wound infections are caused by staphylococci<sup>10</sup>. Developing approaches and strategies that may help to control or prevent the problem of wound infections would have considerable clinical, social and economical effects.

To address this issue, we investigated the potential antibacterial effect of PRGF against the two most important strains of staphylococcus: *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*,

**Table 1:** Composition of whole blood and the plasma fractions

Groups	Platelets, 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Total number of platelets*	Platelet volume, mm <sup>3</sup>	Platelet enrichment	Leucocytes, 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>
Whole blood	254 ± 44	–	7.36 ± 0.55	1.00 ± 0.00	5.40 ± 0.62
PRGF					
F1	280 ± 58	1546.4 ± 286.66	7.04 ± 0.39	1.10 ± 0.12	0.14 ± 0.09
F3	636 ± 97	1714.8 ± 329.59	8.10 ± 0.86	2.57 ± 0.64	0.22 ± 0.13
F3+leu	467 ± 62	1674.4 ± 168.16	8.88 ± 1.00	1.89 ± 0.48	21.42 ± 8.02

\*In the total volume of each plasma fraction.

using both methicillin-sensitive (MSSA and MSSE, respectively) and methicillin-resistant strains of each (MRSA and MRSE). The potential effect of incorporating patient’s leucocytes into the PRGF-Endoret formulation was also studied.

## Methods

The study was approved by the Basque County Ethics Committee, and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All participants provided informed consent.

Blood collection and production of plasma rich in growth factors  
Five healthy volunteers (two women, three men; mean ± SD age 34 ± 2 years, range 31–36)

participated in the study. Venous blood (65 mL) was collected from each volunteer. The blood was separated in a centrifuge (BTI System IV, Vitoria, Spain) at 580 g for 8 min at room temperature, and the plasma was drawn off in three consecutive fractions (Fig. 1): fraction (F)1, F2 and F3. Using our method, the resulting plasma fractions do not contain leucocytes, thus, in order to compare the F3 fraction with other platelet-rich plasma (PRP) formulations that do contain leucocytes, half of the collection tubes were filled with the F3 fraction plus the buffy coat (F3+leu). The F2 fraction was discarded.

The concentration of platelets and leucocytes from whole

blood and each fraction of PRP (F1, F3, and F3+leu) was measure using a coulter device (ABX Micros 60; Horiba ABX, Madrid, Spain).

#### *Coagulation assay*

The coagulation assay was performed in triplicate using 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) as follows.

First, 200 IL from each PRGF fraction obtained from each volunteer were added per well. The assay was also performed with each plasma fractions diluted 1 : 2 in Mueller–Hinton broth to check the coagulation kinetics of the various samples in these conditions (mimicking the microbiological assays). The reaction time was measured from the time of calcium chloride (10% wt / vol; 10 IL) addition into each well. All tests were carried out at room temperature. Samples were read at 450 nm wavelength at 1-minute intervals using an automatic microplate reader (iEMS

Reader MF; Thermo Labsystem, Helsinki, Finland) until clot formation was complete (maximum of 70 min). Control wells without activator were monitored throughout the test, and no clot formation was seen (data not shown).

#### *Patient-derived bacterial strains.*

All strains of bacteria were isolated from clinical samples (kindly provided by A. Canut, Hospital de Santiago, Vitoria, Spain), streaked onto Mueller–Hinton agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK), and incubated at 37 C for 18 h.

#### *Time to kill studies*

The starting bacterial inoculum ranged between  $5 \cdot 10^5$  and  $1 \cdot 10^6$  colony-forming units (cfu) / mL. The dilutions required to obtain the correct inoculum were determined by prior viability studies using each strain.

Immediately after platelet activation, 250 IL from each fraction (F1, F3 and F3+leu) and the same volume of 0.9% saline (growth control) were added to tubes containing 250 IL of Mueller–Hinton broth inoculated with the relevant staphylococcal strain. Tubes were incubated at 37 C with shaking (200 rpm). At 0, 4 and 8 h, a 50 IL aliquot was removed from each tube and serially diluted 10 times in 0.9% saline, then 10 IL samples of each dilution were plated in triplicate onto Mueller–Hinton agar plates. After incubation for 24 h at 37 C, the surviving bacterial colonies were counted (cfu / mL).

#### *Statistical analysis*

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. After checking the normal distribution and homogeneity from groups, repeated measures ANOVA was used to assess the differences between the variables.

Significant differences between the plasma fractions were further investigated using the Scheffe test, with level of significance set at  $\alpha = 0.05$ . Statistical analyses were performed using SPSS software (version 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### **Results**

Plasma rich in growth factors  
The platelet concentration of F3+leu was less than that of the F3 fraction because of the dilution of platelets by collection of the buffy coat (Table 1). However, no significant differences were seen in the total number of platelets between F3 and F3+leu. In the F3+leu samples, the leucocyte concentration was 3.9 times the baseline value in whole blood.

#### *Coagulation assay*

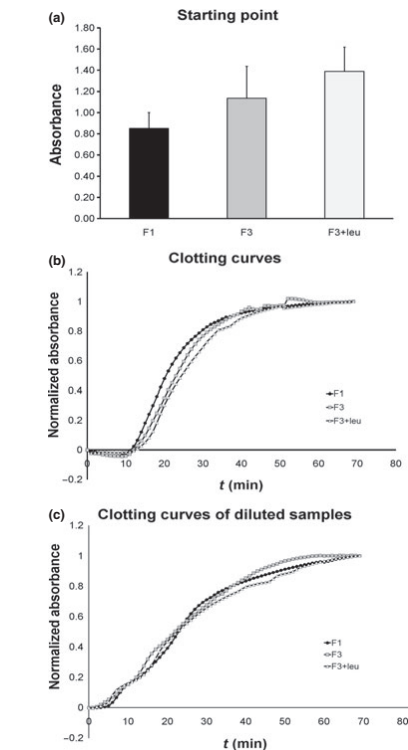
At the start of clot formation, the absorbance of each of the fractions was different (Fig. 2a), probably due to the

differences in the platelet and leucocyte concentrations. Therefore, the coagulation curves were normalized between 0 (minimum absorbance value) and 1 (maximum absorbance value) to compare the different fractions. The normalized clotting curves did not show any significant difference in clotting time or kinetics between the different fractions (Fig. 2b). In addition, although the diluted samples showed changes in the coagulation dynamics (Fig. 2c) compared with the undiluted samples, there were no significant differences in the clotting curves between the groups.

*Antimicrobial activity of plasma rich in growth factors*

All four fractions produced a decrease in bacterial numbers, with the maximum decrease seen after 4 h of incubation;

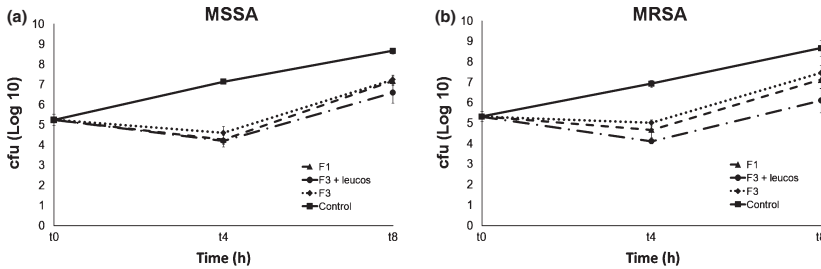
however, because none of the strains was killed off completely, the number of



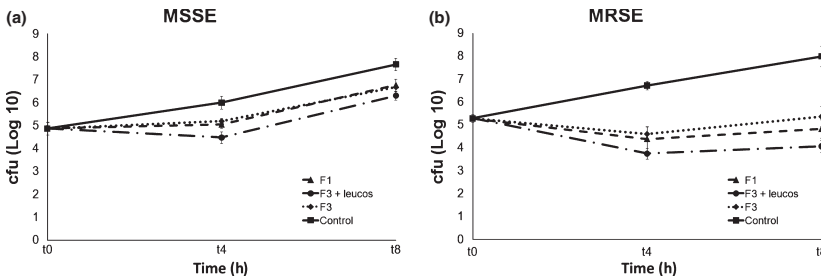
**Figure 2** Coagulation assay. (a) Initial absorbances obtained from the three plasma rich in growth factors (PRGF) fractions. (b,c) Clotting time and kinetics for (b) the undiluted samples and (c) the diluted samples.

bacteria increased again after this time point. Antibacterial activity was interpreted as bactericidal when a reduction of 3 log<sub>10</sub> cfu / mL (99.9% kill) occurred, compared with the initial inoculum at time 0, and bacteriostatic if the inoculum was reduced between 0 and 3 log<sub>10</sub> cfu/mL.





**Figure 3** Antimicrobial activity of three plasma rich in growth factors (PRGF) fractions against (a) methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and (b) methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains compared with the initial inoculum at time 0. The fraction was considered bacteriostatic if the inoculum was reduced between 0 and 3  $\log_{10}$  cfu/mL.



**Figure 4** Antimicrobial activity of three plasma rich in growth factors (PRGF) *epidermidis* (MSSE) and (b) methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE) strains. The fraction was considered bacteriostatic if the inoculum was reduced between 0 and 3  $\log_{10}$  cfu/mL.

In the case of MSSA, all four fractions were bacteriostatic after 4 h of incubation (Fig. 3a), with no significant difference found between the fractions. For MRSA, four fractions were also bacteriostatic after 4 h of incubation. For this strain, the antimicrobial activity of F3+leu was significantly superior to that of F3 ( $P < 0.05$ ), but not to

that of F1 (Fig. 3b). After 8 h, the population of both staphylococcal strains treated with the various plasma fractions tended to recover and grow back.

By contrast, MSSE was less susceptible than MRSE to the antimicrobial activity of the platelet fractions (Fig. 4). The

bacterial population was reduced only by the F3+leu fraction ( $0.4 \log_{10}$ ), whereas F1 and F3 did not inhibit the growth of MSSE (Fig. 4a). For MRSE, all four fractions were found to be bacteriostatic after 4 h of incubation (Fig. 4b), with no significant difference between them.

### Discussion

Clinical studies have shown that PRGF-Endoret formulations are safe and effective for healing and regeneration of a wide range of tissues<sup>11,12</sup>. Despite the regenerative potential of PRGF-Endoret being fully established, we could not find any reports on the antimicrobial effects of PRGF-Endoret in the available literature. Hence, to our knowledge, this is the first study showing antibacterial activity of a 100% autologous PRP product without leucocytes and activated exclusively with calcium.

The full antibacterial mecha-

nism of PRP is not fully understood. Mammalian platelets seem to play a critical role in the innate host defence against the induction and progression of endovascular infections<sup>13</sup>. This host defence property is related to the capacity of platelets to release a group of cationic antimicrobial peptides, collectively known as platelet microbicidal proteins, at the site of endovascular damage or infection<sup>14</sup>. Our laboratory is currently undertaking investigations into the presence of PMPs in the PRGF-Endoret formulations.

Several studies have also underlined the role of human platelets as a source of antimicrobial peptides such as RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed, and secreted), connective tissue-activating peptide III, platelet factor-4, platelet basic protein, thymosin b-4, and fibrinopeptides A and B<sup>15</sup>. Previous studies have

reported antimicrobial activities for both human platelets and other types of PRP. For example, Bielecki et al<sup>16</sup> found that PRP gel inhibited the growth of *S. aureus* and *Escherichia coli*, but it was not active against *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* or *Pseudomonas aeruginosa*.

The results obtained in our study are similar to those reported by Moojen et al<sup>17</sup>. for both *S. aureus* strains when using a leucocyte-containing PRP product. We found that the extracted fractions had a strong bacteriostatic effect, especially in the first 4 h after application.

In fact, all formulations had a bacteriostatic effect at 4 h for MSSA, MRSA, and MRSE, but not for MSSE. These results are particularly interesting given that the methicillin-resistant strains (MRSA and MRSE) are extremely widespread and are not

responsive to many of the current antibiotics<sup>18</sup>. In particular, *S. aureus* is a major cause of hospital-acquired infection of surgical wounds and infections related to indwelling medical devices,<sup>19</sup> and it is also often present in chronic ulcers<sup>20</sup>.

In our study, < 10% of the initial bacterial inoculum was left after 4 h of incubation in the presence of either the F1, F3, or F3+leu fractions for three of the strains; however, the effect on MSSE was low. This might reflect the fact that not all the staphylococcal strains present the same susceptibility to inhibition by platelet microbicidal proteins (PMPs). It has been proposed that the antibacterial activity of PMPs is directly related to the intrinsic PMP susceptibility phenotype of the infecting strain<sup>21</sup>. The mechanism of the low-level PMP resistance of *S. aureus* in vitro is not completely clear; it may be influenced by an increase in membrane fluidity,

reduction in transmembrane potential, or mutations in genes that encode proteins involved in the generation of the proton motive force.<sup>22</sup> It is possible that MSSE harbours a resistance mechanism that could explain the low bacteriostatic effect of the platelet fractions. These possible resistance mechanisms of MSSE to the PRGF Endoret formulations will be analyzed in future studies.

We found that the coagulation kinetics were similar for all three fractions. No correlation was seen between the antimicrobial effects and the compositions of the different fractions, particularly the presence of leucocytes (F3+leu vs. F3 and F1) or the different platelet concentrations (F3 vs. F1). Only for MRSA was there any difference between the fractions at 4 h, with F3+leu being significantly superior to F3 but not to F1.

The inclusion of leucocytes

within PRP is a matter of intense debate. Some authors have suggested that inclusion of leucocytes in the fibrin mesh may help to improve the stability of the scaffold while increasing the antimicrobial potential of the formulation<sup>23</sup>. However, our results clearly shown that an additional leucocyte dose does not significantly improve the antimicrobial properties of PRGF-Endoret. It is also possible that the additional leucocyte content might increase the inflammatory response at the site because of the metalloproteases secreted by leucocytes, and the pro-inflammatory proteases and acid hydrolases contained in white blood cells<sup>24</sup>.

## Conclusions

Based on our results, we conclude that the antimicrobial activity of PRGF-Endoret against the four staphylococcal strains reaches its maximum during the first few hours after

application. Therefore, its use should be focused on infection prophylaxis rather than treatment. As surgical debridement is the first and most important measure for the treatment of infected ulcers, the additional use of PRGF-Endoret fractions might reduce the number of remaining bacteria sufficiently to prevent re-infection and to accelerate ulcer healing. As these fractions can be easily prepared during surgery and have a strong bactericidal activity, they might be potentially useful substances in the fight against postoperative infections.

### References

- 1 Tessmar JK, Göpferich AM. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 274–91.
- 2 Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 741–52.
- 3 Anitua E, Sánchez M, Zaldueño MM et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif* 2009; 42: 162–70.
- 4 Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 37–41.
- 5 Torres J, Tamimi F, Martínez PP et al. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 677–87.
- 6 Anitua E. Plasma rich in growth factors; preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; 14: 529–35.
- 7 Sánchez M, Anitua E, Azofra J et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007; 35: 245–51.
- 8 Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; 84: 415–21.
- 9 Orcajo B, Muruzabal F, Isasmendi MC et al. The use of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) in the treatment of a severe mal perforant ulcer in the foot of a person with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 9: e65–7.
- 10 Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 244–69.
- 11 Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med*

## Artículo 2

---

2006; 34: 1774–8.

12 Sanchez M, Anitua E, Cugat R et al. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors. *J Orthop Trauma* 2009; 23: 52–9.

13 Kupferwasser LI, Yeaman MR, Shapiro SM et al. In vitro susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: microbiological, histopathologic, and echocardiographic analyses. *Circulation* 2002; 105: 746–52.

14 Yeaman MR. The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 951–68.

15 Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70: 6524–33.

16 Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J et al. Bacteriostatic effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89: 417–20.

17 Moojen DJ, Everts PA, Schure RM et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res* 2008; 26: 404–10.

18 Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006; 27: 2331–9.

19 Zalavras CG, Patzakis MJ, Holton P. Local antibiotic therapy in the treatment of

open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 427: 86–93.

20 Lim T, Mwiapatayi B, Murray R et al. Microbiological profile of chronic ulcers of the lower limb: a prospective observational cohort study. *ANZ J Surg* 2006; 76: 688–92.

21 Bayer AS, Cheng D, Yeaman MR et al. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein among clinical bacteremic isolates of *Staphylococcus aureus* correlates with an endovascular infectious source. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3169–72.

22 Bayer AS, Kupferwasser LI, Brown MH et al. Low-level resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 in vitro associated with *qacA* gene carriage is independent of multidrug efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2448–54.

23 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: 158–67.

24 Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ et al. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 2007; 25: 230–40.

### ***Artículo 3***

## **Efficacy and safety of plasma rich in growth factors in the treatment of venous ulcers: a randomized clinical trial controlled with conventional treatment**

### **Referencia:**

**Aguirre J.J.**, Anitua E., Francisco S., Cabezas A.I., Orive G., Algorta J. Efficacy and safety of plasma rich in growth factors in the treatment of venous ulcers: a randomized clinical trial controlled with conventional treatment. *Clinical Dermatology* 2015; 3 (1): 13-20.





# Efficacy and safety of plasma rich in growth factors in the treatment of venous ulcers: a randomized clinical trial controlled with conventional treatment

José Javier Aguirre<sup>1,3</sup>  
Eduardo Anitua<sup>3</sup>  
Silvia Francisco<sup>1</sup>  
Ana Isabel Cabezas<sup>2</sup>  
Gorka Orive<sup>3,4,5</sup>  
Jaime Algorta<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Clinical Trials Unit, University Hospital of Alava (HUA), Vitoria, Spain

<sup>2</sup> Department of Vascular Surgery, University Hospital of Alava (HUA), Vitoria, Spain

<sup>3</sup> Eduardo Anitua Foundation, Vitoria, Spain; BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain

<sup>4</sup> NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country, School of Pharmacy, Vitoria, Spain

<sup>5</sup> Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER- BBN), Vitoria, Spain

<sup>6</sup> University of the Basque Country, Vitoria, Spain

## Summary

**Results.** At 8 weeks, the mean percentage of healed surface in the PRGF group was  $81.8 \pm 9.3\%$  versus  $23.9 \pm 0.8\%$  in the control group ( $p < 0.001$ ); 5 ulcers in the experimental group healed completely; patients percentage with more than 40% healing in the PRGF group was 100% versus 0% in the control group ( $p < 0.001$ ). Estimated healing time was  $9.6 \pm 1.2$  weeks in the PRGF group and  $23.7 \pm 1.2$  weeks in the control group ( $p < 0.001$ ). **Conclusions.** The PRGF can be an effective and safe treatment for leg ulcers.

**KEY WORD** plasma rich in growth factors; skin ulcers; tissue regeneration; wound healing.

**Background.** Skin ulcers are a significant health problem nowadays due to their high prevalence and their repercussions in the state of health of those who suffer them, the use of autologous platelet rich plasma may be effective for this pathology, due to the capability of the platelets to store and secrete signaling proteins essential for the correct development of the healing process. **Objective.** To evaluate the efficacy and safety of plasma rich in growth factors (PRGF) in the treatment of venous ulcers.

**Methods.** We randomly assigned 23 patients to receive PRGF infiltrations or conventional treatment for 8 weeks. The primary outcome was the comparison of the recovered surface between treatment groups. Secondary outcomes were the number of healed ulcers at the end of the follow-up period, patients percentage with more than 40% healing and the estimated time until complete wound healing. Safety assessment, nature, onset, duration, severity, and outcome of all adverse events were assessed at each visit.

## INTRODUCTION

Skin ulcers are a significant

health problem nowadays due to their high prevalence (1) and their repercussions in the state of health of those who suffer them. The consequences of skin ulcers also are associated with a decreased quality of life for patients and care-givers, thus and to a high consumption of resources for the health system (2).

Chronic ulcers are typically wounds which do not follow a normal repair process, therefore causing them to bring to a standstill in some of the healing stages and so not reaching to restore the anatomical and functional integrity of the injured tissue. This imbalance seems to be in connection with the increase of some pro-inflammatory cytokines, the decrease of other growth factors by the action of proteases, a decrease in cell mitogenic activity and an alteration in the collagen and extracellular matrix deposit.

These changes disturb cell proliferation and protein synthesis leading to an increased cell apoptosis (3).

Plasma rich in growth factors (PRGF) is an autologous biological therapy obtained from patient's blood by which it is possible to obtain different formulations with therapeutic potential. The biological basis of this therapy involves on the one hand the release of a pool of biologically active proteins (especially growth factors), and on the other hand to provide fibronectin and adhesive proteins like fibrin and vitronectin, thus acting as sealing molecules capable of forming a dynamic scaffold which facilitates epithelial migration in the lesion (4). The present study is to our knowledge the first one focusing on evaluating the efficacy and safety of PRGF in the treatment of skin ulcers secondary to chronic venous insufficiency.

## **METHODS**

This was a randomized in parallel groups, controlled with a conventional treatment clinical trial to evaluate the efficacy and safety of PRGF in the treatment of venous ulcers.

### **Ethical Considerations**

Before any study procedure, the trial was approved by the Human Research Ethics Committee of Alava University Hospital (Vitoria, Spain). The trial was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki and the principles of the Good Clinical Practice, and therefore, prior to the enrollment all subjects gave written informed consent.

### **Patient Selection**

A total of 23 patients were included (9 men and 14 women), aged between 50 and 88 years ( $72\pm 9$  years). The patients were recruited at the Department of Vas-

cular Surgery of Alava University Hospital, Vitoria, Spain.

Eligible patients were adult subjects of both sexes with presence of at least one venous ulcer, with VCSS(5) grade II-III and of a diameter not exceeding 12 cm, which could be evaluated during the treatment period. Patients who met any of the following criteria were excluded: ankle-brachial index  $< 0.9$  using a Doppler sensor (5 and 10 MHz) and a manual sphygmomanometer for taking blood pressure, presence of active infection verified by culture and antibiogram, history of having suffered active autoimmune disorders, severe blood disease, epilepsy, or tumors, be undergoing immunosuppressive therapy and/or anticoagulant, hemoglobin values less than 11 g/dL or hematocrit below 34% and in general, any inability to participate in the study.

At baseline, for each patient the following data were

### Artículo 3

Table 1- Patients Baseline Characteristics.

	PRGF	Conventional	Sig (p)
<b>Patients</b>	12	11	
<b>Gender ... n (%)</b>			
<b>Males</b>	5 (41.7%)	4 (36.4%)	1.000*
<b>Females</b>	7 (63.6%)	7 (66.3%)	
<b>Age ... mean (SD)</b>	68.7 (8.9)	74.3 (9.3)	0.379 <sup>‡</sup>
<b>Health Condition ...n (%)</b>			
<b>Poor/Regular</b>	7 (58.3%)	7 (63.6%)	1.000*
<b>Good</b>	5 (41.7%)	4 (36.4%)	
<b>Mobility ... n (%)</b>			
<b>Poor / Limited</b>	7 (58.3%)	9 (81.8%)	0.371*
<b>Complete</b>	5 (41.7%)	2 (18.2%)	
<b>Blood Tests... mean (SD)</b>			
<b>Erythrocytes ...x10<sup>6</sup></b>	4.7 (0.5)	4.7 (0.3)	0.786 <sup>‡</sup>
<b>Haematocrite</b>	41.7 (5.5)	41.0 (5.0)	0.487 <sup>‡</sup>
<b>Leucocytes... x10<sup>3</sup></b>	8.2 (3.5)	8.3 (1.9)	0.449 <sup>‡</sup>
<b>ESR... x 10<sup>3</sup></b>	21.4 (11.2)	40.8 (39.6)	0.695 <sup>‡</sup>
<b>Platelets... x 10<sup>3</sup></b>	281.2 (113.6)	271.4 (118.8)	0.928 <sup>‡</sup>
<b>Glucose mg/dL</b>	96.7 (9.5)	99.7 (11.0)	0.695 <sup>‡</sup>

\*Ji square

† Mann Whitney

‡ T-Student

Table 2 - Baseline characteristics of the ulcers.

	PRGF	Conventional	Sig
<b>Ulcers</b>	12	11	
<b>Initial Area (cm<sup>2</sup>) ... mean (SD)</b>	9.6 (13.8)	4.7 (3.1)	0.379 <sup>†</sup>
<b>Time of evolution of lesions (weeks)... mean (SD)</b>	17.7 (9.1)	7.3 (4.4)	0.004 <sup>†</sup>
<b>Pain ... mean (SD)</b>	2.2 (2.9)	2.4 (2.9)	0.870
<b>Granulation tissue ... n (%)</b>	2 (16.6)	1 (9.1)	0.936
<b>Perilesional skin ... n (%)</b>			
<b>Cellulitis</b>	3 (25.0)	2 (18.2)	0.912
<b>Eczema</b>	7 (58.3)	4 (36.3)	0.524
<b>Exude ... n (%)</b>			
<b>Not present</b>	9 (75.0)	11 (100.0)	0.247
<b>Low</b>	3 (25.0)	0 (0.0)	0.247

\*Mann Whitney

recorded: age, gender, patient's health condition, patient's mobility, pain, perilesional skin condition, and basal blood test (erythrocytes, hematocrit, leukocytes, ESR, platelets and glucose). For each ulcer the data collected were the initial area and the wound age (Tables 1, 2)

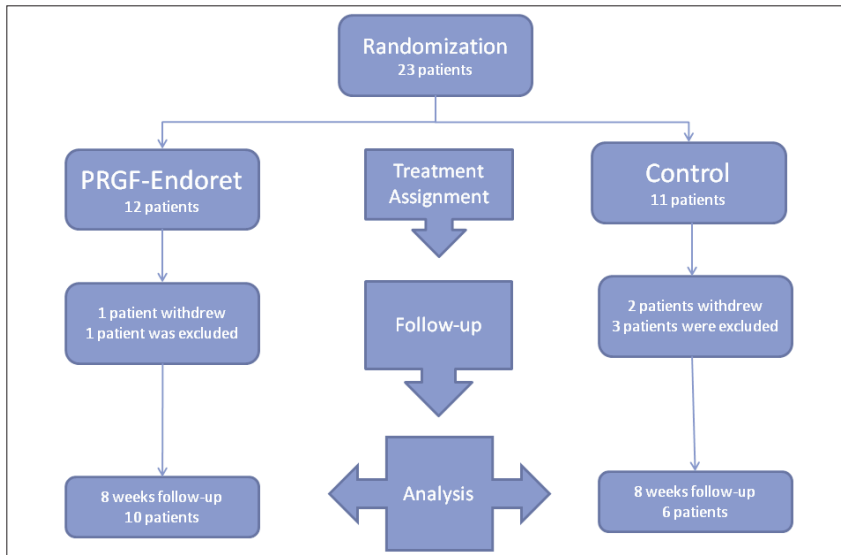


Figure 1 - Flowchart for the study patients.

### Interventions

The study protocol included a washout phase for 7 days from the previous therapy in course. During this period, all wounds were subjected to treatment by surgical debridement and cleaning with physiological saline and moist saline gauze dressings were used. Following the cures, all wounds were covered with silicone dressings (Mepitel Mölnlycke Health Care AB), completing the treatment by applying a strong elastic compression bandage. Baseline

assessment, randomization to treatment schedule and follow-up during 8 weeks. The cures were repeated not exceeding 7-day intervals. Assessment variables were recorded on a weekly basis. All subjects included in the study were scheduled for a first visit and then were randomly assigned to receive one of the treatments. In both groups, after surgical debridement of the ulcers, wounds were cleaned with physiological saline (sodium chloride 0.9%). Those patients assigned to the experimental group received additional treatment by

applying PRGF.

Each week, during the follow-up period, ulcer evaluation was performed, patients underwent treatment procedure (PRGF or control care) and adverse effects were reported spontaneously by patients or after questioning in a general way. Patients attended the research unit of the hospital until either complete healing (full epithelization) or 8 weeks of treatment. After 8 weeks follow-up, patients who did not achieve complete healing were again referred to the vascular surgery practice to continue treatment.

The experimental treatment consisted on the following procedure: at each treatment visit and once the wound had been cleaned and debrided, 30 to 90 mL of venous blood were extracted from the patient immediately before the preparation and application. The total volume of blood extracted varied depending on the size of the ulcer. In all

cases, extraction was performed using a venofix system with adapter and venojet 5 mL tubes that contained sodium citrate at 3.8% as anticoagulant (0.5 mL). The blood was centrifuged at 460 g for 8 minutes at room temperature in a centrifuge model PRGF system II (BTI Biotechnology Institute SL). After centrifugation, the most superficial fraction for each tube was obtained and moved to a previously labeled sterile tube. The corresponding fraction to the remaining 0.5 mL of plasma (more rich in platelets and placed just above the buffy coat), was subsequently pipetted, being careful not to collect the leukocytes nor the erythrocytes. This fraction was also collected in a sterile tube correctly labeled. Subsequently, 50  $\mu$ L of 10% calcium chloride per mL of plasma was added in order to activate the platelets and to promote the release of various biochemical mediators included in them. Once

calcium chloride was added, the platelet-richest fraction was injected in the edges and surface of the wound. With the remaining fractions and after 15 to 20 minutes, a fibrin clot was formed and was subsequently placed on the ulcer's bed, which was then covered with a silicone dressing.

#### **Assessment**

Evaluations were performed at week 8 (final visit). The main outcome measure was the comparison between treatment groups of the percentage of recovered surface compared to the basal visit. The percentage of surface area healed was estimated as "100\*initial ulcer surface - final ulcer surface/initial ulcer surface". All wounds were photographed and we proceeded to measure the area of ulcers, for which we used a planimetric software (Mouseyes v2.1). Secondary outcomes were the number of healed ulcers at the end of the

follow-up period, and the estimated time until wound healing was completed. In those cases where complete healing was not achieved during the follow-up period, healing time was again estimated by applying a simple regression model based on the values of the area adjusted by age at each follow-up visit.

For the safety assessment, the nature, onset, duration, severity, and outcome of all adverse events, as well as any association of an adverse event related to the treatment were assessed and documented at each visit. In order to evaluate the safety profile of the treatments, all complications and/or adverse events were recorded with an accountability scale.

#### **Randomization and allocation concealment**

For treatment allocation, a

randomization was carried out using a specific computer program, obtaining a list of random numbers. At the time of inclusion in the study, each patient was identified by a consecutive number. Each patient number corresponded to one of the treatments attending to the randomization list.

#### **Sample size calculation**

The number of subjects included in the study was calculated from the results published by Anitua in 2008 (15). The sample size was calculated with the objective of detecting a 30% difference in the recovered surface, taking into consideration a standard deviation of 22,4, an alpha error of 0,05 and a power of 80%. Following this, a total of 24 patients (12 of them per treatment group) was calculated to be included in the study.

#### **Statistics**

A descriptive analysis of the sample was first conducted, taking into consideration the clinical and demographic factors of the patients included in the study. The area of the injury was adjusted after performing a variance analysis which included the time of evolution of lesions as a covariate. The analysis of the efficacy outcomes has been made by protocol.

The differences between treatments at each follow-up visit regarding the quantitative variables were determined by applying the Mann-Whitney test. Nominal data were analysed using the  $X^2$  test or Fisher's exact test. A p-value of 0.05 or less was considered statistically significant. The IBM SPSS statistics, version 15.0 was used for the analysis of data.

#### **RESULTS**

A total of 23 ulcers from 23 patients were included in the study, 16 of which completed



### Artículo 3

the follow-up period (Figure 1). Three patients, one in the experimental group and two in the control group, voluntarily left the study six and seven weeks after beginning the treatment because they did not meet their healing expectations. One patient assigned to the PRGF group was withdrawn from the study after seven weeks follow-up. This was due to the fact that despite the treatment applied, the wound increased in size from week to week, and so it was decided to apply a different treatment to those ones previously established in the protocol. Two patients in the control group presented

wound infection three and six weeks after the follow-up period, thus requiring systemic antibiotic therapy and dressings not included in the protocol, and therefore they were withdrawn from the study. A third patient in the control group suffered from important skin eczema of probably allergic origin after three weeks, thus forcing to modify the treatment protocol for that injury. No infections were observed in the PRGF group.

Regarding patient's baseline characteristics and the studied lesions, both groups were comparable except for the time of evolution analyzed, being significantly

Table 3 - Efficacy Assessment at 8 weeks follow-up.

	PRGF	Conventional	IC 95%	Sig (p)
<b>Area* ... mean (SD)</b>				
<b>N° of ulcers at 8 weeks follow-up</b>	10	6		
<b>% of surface area healed</b>	81.8 (9.3)	23.9 (0.8)	57.9 (51.2 - 64.5)	<0.001 <sup>†</sup>
<b>Ulcers with improvement &gt;=40%...n(%)</b>	10.0 (100.0%)	0 (0.0%)	100% (86.7% - 100%)	<0.001 <sup>†</sup>
<b>Healed ulcers at 8 weeks* ... n %</b>	5 (50%)	0 (0.0%)	50 % (5.7% - 94.3%)	0.125 <sup>‡</sup>
<b>Estimated healing time (weeks) ...mean (SD)</b>	9.6 (1.2)	23.7 (1.2)	14.1 (12.7 - 15.4)	<0.001 <sup>†</sup>
<b>Pain ... mean (SD)</b>	0.4 (1.3)	0.4 (0.8)	0.00 (- 1.27 - 1.27)	297

\* Analysis adjusted by the time of evolution of lesions

<sup>†</sup> Mann Whitney

<sup>‡</sup>Ji square

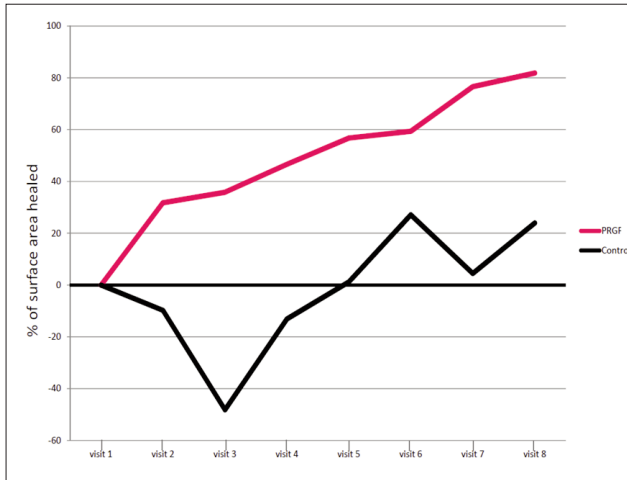


Figure 2 - Evolution of the primary endpoint (percentage of surface area healed) in each treatment visit.

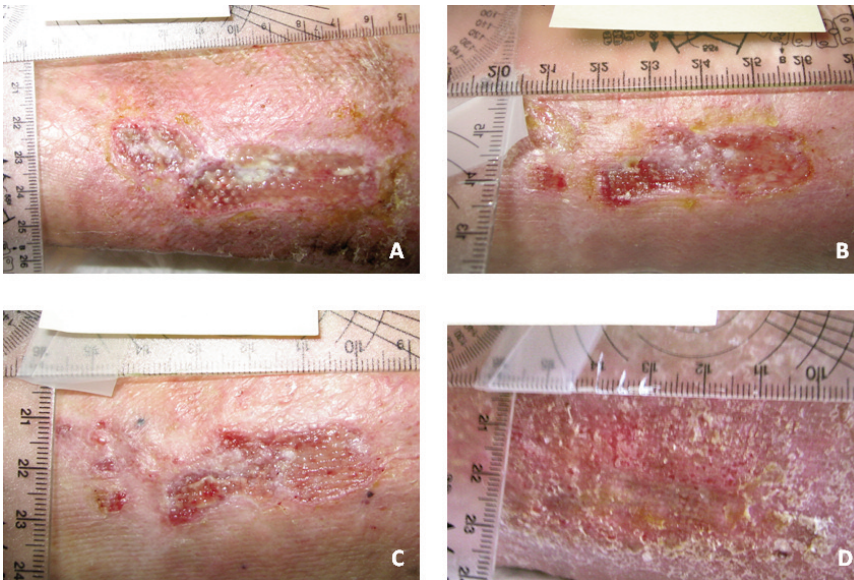


Figure 3 - Evolution of a wound treated with PRGF-Endoret: A) Basal visit, B) Four weeks treatment, C) Six weeks treatment, D) Eight weeks treatment.

older those ones included in the experimental group. When analyzing the number of dropouts and withdrawals in each group of treatment, we observed that the percentage

of patients that retired or were withdrawn in the control group was significantly higher ( $p = 0.004$ ) than those withdrawals registered in the group treated with PRGF-

Endoret.

Results of primary and secondary outcome measures at 8 weeks for the entire study population are summarized in However, no significant differences were found between treatments in the number of ulcers completely healed. Regarding the other secondary endpoint (estimated healing time), results were significantly different between the treatment groups, being the rate of response to PRGF 14 weeks lower (95% CI 13-15;  $p < 0.001$ ) than the rate of response found in the control group.

A total of 3 adverse events in 3 patients (two ulcer d infections and eczema) had been registered during the course of the clinical trial. They were all registered in patients assigned to conventional treatment, and in no case exceeded 20 days. The symptoms of infection were considered mild and possibly related with the clinical trial.

The eczema was labeled as moderated and possibly related to the treatment.

## DISCUSSION

A skin ulcer is a loss of substance that affects the different layers of the skin as well as even deeper levels, with different sizes, shapes and depths. Ulcer repair involves a dynamic process, which includes the presence of bloodstream cellular elements, inflammation soluble mediators, cell growth factors, extracellular matrix proteins and specific skin cells.

In the first decade of this century, several studies have shown initial evidences of the potential of different growth factors in the treatment of skin ulcers (5-7), nevertheless in recent years, there have been calls to attention to the safety of topical application of recombinant isolated growth factors (8, 9).

In response to this evidence, some authors proposed that in order to achieve optimal tissue repair it would be necessary to target the different signaling pathways towards a good communication between the various actors involved in the healing process, and therefore being able to meet the injured tissue multiple needs (10).

Plasma rich in growth factors (PRGF) is a platelet-rich plasma prepared in a single-stage centrifugation from small volumes of blood from the patient, in this way we obtain a platelet concentration 2 to 3 times higher than that one in the peripheral blood, which has been linked an optimal biological benefit (11). This platelet rich plasma, once activated, will provide us with cytokines and growth factors in the ulcer bed, with a network fibrin that will provide us a

dynamic three-dimensional scaffold that facilitates complex cellular interactions (12-14).

The results obtained in this study showed superiority of the PRGF *versus* the control treatment for most of the variables analyzed: percentage of recovered surface compared to the baseline visit and the estimated healing time during the experimental period. In assessing the evolution of the lesion area at the end of the experimental period, we observed that the percentage of recovered surface compared to baseline in the experimental group was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that obtained in the control group. This closely agrees with the study published by Anitua et al. in 2008 (15), in which 73% of recovered surface was observed in the group treated with PRGF versus 21% in the control group. It should be noted that this study was

conducted using the same methodology and technique that in this clinical trial.

These results are consistent with other studies included in the literature, such as those published by Mazzucco et al. in 2004 (16), in which the patients treated with platelet gel required a significantly lower time ( $p < 0,0001$ ) to be surgically treated than those ones treated with the conventional treatment (15 *versus* 35,5 weeks). Cervelli et al. (17) published in 2009 a study in which they presented their experience with platelet rich plasma combined with autologous fat as an adjunct to reconstructive surgery in the treatment of chronic ulcers in lower extremities. It was observed that sixteen of the twenty injuries subjected to the experimental treatment were completely re-epithelialised after ten weeks, while those in the control group achieved complete

closure in only 2 of 10 patients. However, and despite the results of the different studies exposed so far, not all the studied included in the literature have shown a superiority of the application of platelet rich plasma in this clinical application (17-19). This may be due to differences in the protocols for obtaining the platelet concentrates and the compositions of each product. In fact, several different studies comparing the methods for obtaining platelets concentrates have observed uneven results regarding the characteristics of the final product (20, 21).

This fact hinders a standardization system validation as to analyze and uniquely interpret the result of different clinical studies for assessing the therapeutic efficacy of the different obtained platelet concentrates (22, 23), which practically requires that each treatment independently proves itself, its efficacy and

safety in the treatment of skin ulcers.

The small sample size, short follow-up and the fact that both groups were not comparable respect to the age of the lesions are the main limitations of our study. In fact this difference has forced an adjustment of the efficacy variables taking into account the duration of the injury.

## **CONCLUSION**

Despite the limitations of the study, we can conclude that the application of PRGF is a therapy to consider to treat skin ulcers, since has shown a significantly better results to conventional treatment. However it is necessary to confirm these results by realization of new clinical trials with longer follow-up period and a larger sample size.

## ***Conflict of interest***

The authors declare the following competing financial interest(s): E.A. is the Scientific Director of BTI Biotechnology Institute, a dental implant company, that investigates in the fields of oral implantology and PRGF-Endoret technology.

## REFERENCES

1. Rueda J, Torra JE, Martínez F, et al. Primer estudio nacional de prevalencia de úlceras de pierna en España: estudio GNAUPP-UIFC-Smith & Nephew 2002-2003. *Epidemiología de las úlceras venosas, arteriales, mixtas y de pie diabético*. Gerokomos. 2004;4:230-247.
2. Tenvall GR, Hjelmgren J. Annual costs of treatment for venous leg ulcers in Sweden and the United Kingdom. *Wound Rep Reg*. 2005;13:13-18.
3. Trengove NJ, Langton SR, Scey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Rep Reg*. 1996;4 (2):234-239.
4. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14 (4):529-35.
5. Vasquez MA, Munschauer CE. Venous Clinical Severity Score and quality-of-life assessment tools: alicatin to vein practice. *Phlebology*. 2008;23: 2-75.
6. Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad MA, et al. Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Rep Reg*. 2005;13:531-536.
7. Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care*. 1998; (5):822-827.
8. Kallianinen LK, Hirshberg J, Marchant B, et al. Role of platelet-derived growth factor as an adjuvant to surgery in the management of pressure ulcers. *Plastic Reconstr Surg*. 2000;106(6):1243-8.
9. Govindarajan B, Shah A, Cohen C, et al. Malignant transformation of human cells by constitutive expression of platelet-derived growth factor-BB. *J Biol Chem*. 2005;280(14):13936-43.
10. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/Postmarket-DrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHealthcareProfessionals/ucm072148.htm>.
11. Gianchandani EP, Brautigan DL, Papin JA. Systems analyses characterize integrated functions of biochemical networks. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31:284-91.
12. Weibrich, G, Hansen T, Kleis W, et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34:665-671.
13. Mosseson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3:1984-1904.
14. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(7-8): 741-52.

### Artículo 3

---

15. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Bio- med Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84(2):415-21.
16. Mazzucco L, Medici D, Serra M, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion.* 2004;44:1013- 1018.
17. Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. Regenerative Surgery: Use of Fat Grafting Combined with Platelet- Rich Plasma for Chronic Lower-Extremity Ulcers. *Aesth Plast Surg.* 2009;33:340-345.
18. Stacey MC, Mata SD, Trengove NJ, et al. Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20:296-301.
19. Senet P, Bon FX, Benbunan M, et al. Randomised trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. *J Vasc Surg.* 2003;38:1342-8.
20. Danielsen P, Jorgensen B, Kalsmark T, et al. Effect of Topical Autologous Platelet-Rich Fibrin versus No Intervention on Epithelialization of Donor Sites and Meshed Split-Thickness Skin Autografts: A Randomized Clinical Trial. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1431.
21. Weibrich G, et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma rich in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20:118-123.
22. Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol.* 2004;36(1):28-35.
23. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. New insights into and novel applications from platelet rich fibrin therapies. *Trends biotechnol.* 2006;5: 227- 234.



#### ***Artículo 4***

**APPLICATION OF PRGF (PLASMA RICH IN GROWTH FACTORS) TO REDUCE THE HEALING TIME AFTER PILONIDAL SINUS EXCISION. A RANDOMIZED 5-YEARS PROSPECTIVE CONTROLLED TRIAL.**



**APPLICATION OF PRGF (PLASMA RICH IN GROWTH FACTORS) TO REDUCE THE HEALING TIME AFTER PILONIDAL SINUS EXCISION. A RANDOMIZED 5-YEARS PROSPECTIVE CONTROLLED TRIAL.**

Date Submitted by the Author:	Annals of Surgery 05-12-2015
Complete List of Authors:	Bellido Luque, Juan; Quirón Sagrado Corazón Hospital, Minimally invasive Surgery Department Gonzalez Fernandez, Dolores; Fremap Hospital, Aguirre Anda, Jose Javier; BTI Biotechnology Institute, Orive, Gorka; BTI Biotechnology Institute, Bellido Luque, Araceli; Quirón Sagrado Corazón Hospital, Minimally invasive Surgery Department Gomez Menchero, Julio; Quirón Sagrado Corazón Hospital, Minimally invasive Surgery Department Morales-Conde, Salvador; University Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, 1Associate Professor of Surgery
Keywords:	Plasma Rich in Growth Factors, PRGF, Pilonidal Sinus

**Structured Abstract**

**Objective:** The aim of this study is to confirm whether the application of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) on the wound after a Pilonidal Sinus excision, reduces the drawbacks of this open surgical technique while maintaining the advantages.

**Summary Background Data:** There is not enough evidence to certify which surgical technique in Pilonidal Sinus is the most appropriated. Open techniques present larger healing time, increased postoperative pain and less quality of life. Closed techniques show higher recurrences and site infections rates than open techniques.

**Methods:** From November 2008 to February 2010, patients with Pilonidal sinus were randomized into two groups. 24 patients in PRGF group and 23 patients in Control group. Primary endpoint was healing time. Secondary endpoints were postoperative pain, bleeding, Surgical Site Infection, recurrence rates and Quality of life.

**Results:** Although the volume of initial PRGF-treated wounds was significantly higher ( $p=0,023$ ), healing time was shorter than the Control Group ( $p<0,001$ ). Lower pain intensity on postoperative days 1 and 7 in up with significant differences was observed, matching the differences within the first postoperative month. Regarding quality of life, there were significant differences in favour of PRGF group, thereby improving the quality of life after surgery in these patients. There was no evidence of the surgical wound infection among the groups. After a follow-up period of 60 months, only one recurrence (2,1%) in the Control Group was detected, with no significant differences.

**Conclusions:** The application of PRGF reduces significantly the healing time, improving pain intensity and quality of life when compared to standard curing procedures.

## INTRODUCTION

Pilonidal Sinus is a chronic condition of the sacro-coccygeal region, also known as Dermoid Cyst, pilonidal cyst or sacrococcygeal fistula.

It is a relatively common illness, not serious but very uncomfortable, characterized by a localized orifice in the posterior median line of the sacral region, from which one or various tracts covered by a granulation tissue may be originated and may end in different orifices placed in the midline or tissues around this area.

Pilonidal sinus affects 70.000 patients in the USA every year, appearing in more than 0.7% of the teenager population (1). It is more frequent in males in a relation of 4:1 (2). It was described for the first time by Mayo in 1833 (3). The pathogenesis is not quite clear. The most accepted theory is that it starts due to the infection of the hair follicle in the middle line of the sacral area. The further hair loss leaves an orifice through which

new hairs may enter if the root of the hairs stays in contact with the orifice, being pushed by the movement of the buttocks. The hair into the subcutaneous tissues provoked a reaction against a foreign object causing abscess formation and also provoking the formation of secondary tracts.

There are four different types of presentation: 1. Acute Pilonidal Abscess: It appears like a fluctuant subcutaneous mass with sign of peripheral cellulite. 2. Chronic Pilonidal Sinus: Characterized by one or several orifices in the inter-gluteus fold with or without secondary orifices. 3. Complicated Pilonidal Sinus: Multiple primary and secondary orifices in a variable distance. It is also frequent to observe abscesses partially drained in the affected area. 4. Recurrent Pilonidal Sinus: Findings are variable, from fibrosis around the wound to multiple primary and secondary orifices.

The aim of the treatment is to find a cure to this disease with low morbidity and recurrence rate,

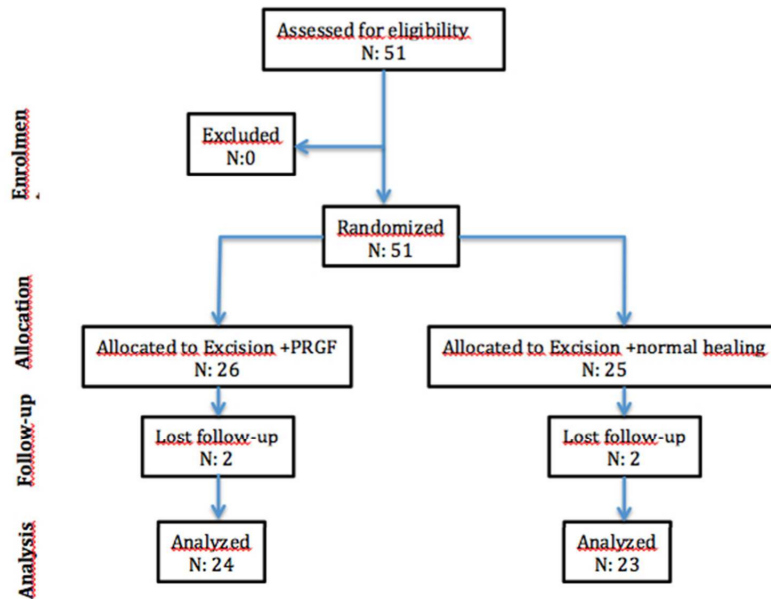


Fig 1: Participant Flow

and providing a quick recovery after the surgery.

Regarding the treatment, it is known that there is no a spontaneous healing or medical treatment. The most appropriate treatment is the one which provides a quick recovery for the patient, together with a low recurrence rate and minimal healthcare resources consumption.

Nowadays, there are different techniques, classified in Open and Closed techniques. After a

literature review (4,5), it is shown that there is no enough evidence to know which of them are the most appropriated ones.

Several studies have describe the use of biological therapies such as platelet-rich plasma (PRP) as effective and safe methods in the treatment of chronic wounds (6). There is an increasing amount of evidence supporting the potential of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret), an autologous PRP characterized by the absence of leukocytes and proinflammatory cytokines and the presence of a

## Artículo 4

**Table1:** Baseline characteristics of patients

	PRGF group	Control control	p
n	24	23	
Average age (SD)	26,7(9,8)	26,3(9,0)	0,896*
Gender			
Females(%)	5(20,8%)	3(13%)	0,701#
Males(%)	19(79,2%)	20(87%)	
Average BMI (SD)	25,6(3,4)	26,7(3,2)	0,281*

\*T Student, # Chi Cuadrado. BMI: Body Mass Index. SD: Standard Desviation

**Table 2:** Baseline characteristics of lesions

	PRGF group	Control group	p
n	24	23	
Sinus type <i>n</i> (%)			
Monofistulized	11(45,8%)	14(60,9%)	0,302#
Multifistulized	13(54,2%)	9(39,1%)	
Sintoms <i>n</i> (%)			
Pain	7(29,2%)	4(17,4%)	0,341 <sup>#</sup>
Nodulation	6(25%)	10(43,5%)	0,181 <sup>#</sup>
Supuration	11(45,8%)	11(47,8%)	0,891 <sup>#</sup>
Initial Volume <i>median</i> (ml) [ <i>range</i> ]	40,7(188)	26,6(178)	0,023 <sup>★</sup>

specific dose of platelets and growth factors. The use of this autologous biological therapy is associated with the potential to enhance tissue repair and reduce tissue inflammation.

The use of PRGF in the open excision of the Pilonidal Sinus, may improve the healing process due to the platelet growth factors provided by the PRGF, which stimulate tissue regeneration and interfere with cell division thus producing new cells and improving angiogenesis by increasing the tissues vascularisation.

For this reason, the use of PRGF aims to accelerate the regeneration of soft tissues, which may reduce the granulation and epithelisation time of the excision wound.

### **AIM**

To evaluate the efficiency of the intraoperative use of PRGF immediately after the PS limited excision, as well as in the

treatment of the wound after surgery, in order to reduce healing time and complications after excision, compared to the standard surgical treatment, the excision and the daily local cures.

### **PATIENTS AND METHODS**

The study was carried out in accordance with the current legislation regulation with regard to clinical studies and in accordance with the Declaration of Helsinki, and Good Clinical Practice Regulations. The study protocol was reviewed and approved by the local Ethics Committee of the Virgen del Rocio Hospital of Seville University and the patients have signed the written informed consent before entry into the study.

Fifty-one patients were selected in



Fig 2: A: BTI system II centrifuge. B: Plasma obtained after centrifugation.



Fig 3: Sinus pilonidal wound treated with PRGF; A: 24h, B: 21 days, C: 28 days, D:35 days after surgical excision.

the study. Patients were considered eligible if they were aged between 18 and 65 years and had not recurrent pilonidal sinus without abscess. Patients under immuno-suppressive or anticoagulation treatment were not eligible. All subjects had possibility of observation during the treatment. Details of recruitment for eligible patients are shown in Figure 1.

### Interventions

The selected patients were

randomized into two different groups. The randomization of patients was performed by the surgeon using an envelope with a number drawn inside (Pilonidal sinus surgical limited excision with PRGF application during and after the surgery or limited excision and second intention closure by regular local cures) the day before surgery. Randomization was blind for the investigator and was stratified by the surgeon.



For surgical excision of pilonidal sinus was used in all cases the same surgical technique: under spinal anaesthesia, the patient is placed prone position and both buttocks separated. Antibiotic prophylaxis with 1gr intravenous Amoxiciline-Clavulanic is applied before the surgery. Once the external orifices are found, methylene blue solution is delivered through the largest one and performing a soft massage at the same time, to achieve its diffusion through all the possible fistulous tracts. Then, a complete limited excision of the PS is carried out ensuring the absence of methylen blue solution around the margins of the wound.

Some minutes before the surgery and the anaesthesia, a vein puncture is performed those patients assigned to treatment PRGF, to obtain a blood sample of approximate 40-60ml (with a 21G needle to avoid a haemolysis). Blood is stored in TE9 tubes containing sodium citrate as an anticoagulant. The tubes are centrifuged immediately after the extraction.

To prepare the PRGF-Endoret, at

each treatment visit, 36 mL of peripheral blood was extracted from each patient by venipuncture directly into 4 extraction tubes containing 3.8% sodium citrate as anticoagulant (figure 2). The extracted blood was centrifuged at 580g for 8 minutes at room temperature in a BTI Biotechnology Institute system centrifuge. Once the blood tubes were centrifuged, we proceeded to physically separate the plasma fractions by meticulous pipetting and under strictly sterile conditions. Calcium chloride is added to activate the platelets in a proportion of 0,5ml per each ml of plasma. Intraoperative application is done through an infiltration into the edges and depth of the wound using a 21G needle. The rest of the activated PRGF is applied into the cavity so that it coagulates in situ occupying the whole tissue discontinuity.

The application after surgery was performed every 7 days. The treatment ended once the wound was completely healed (granulation and epithelisation of the wound)

The volume of the resulting

wound after the surgery was registered on the same day of the procedure (day 0). and was determined by filling the surgical wound with normal saline, then suctioning it out and determining the amount of the instilled saline. The day after the surgery (day 1), an evaluation of the sterile pad was made in order to check if the wound was bleeding or not. On the day 7 after the surgery the depth of the wound was measured and the second application was performed. The same procedure was carried out successively and every 7 days. Measuring the depth is preferable to control the wound healing, as with volume measurements there are variations depending on the degree of opening of the buttocks by the investigator. In addition, for wounds close to the anal margin, volume measurement is very difficult due to the inability to fill the wound with saline.

In the Control Group the wound volume was evaluated on the same day of the surgery. Sterile pad was controlled one day after (day 1), to check if there was bleeding or not. Local cure with physiological serum and povidone-

iodine was made every day. On the day 7 a new local cure was performed and the depth of the wound was measured, repeating this procedure every 7 days. Once the wound was completely healed, a follow up was carried out every 3 months during the first year and then once a year.

Response was assessed by researchers not involved in the application of treatment. The data report forms did not make any reference to the treatment applied.

### **Outcome Measures**

**Efficacy Assessments:** The primary efficacy outcome was wound healing time. A wound is considered to be healed when the skin is totally closed, so that the granulation and epithelization phase has been completed. The secondary efficacy outcomes included Post operative pain measured according to the Visual Analogue Scale (VAS), post operative bleeding considering a bleeding which does not stop through compression or local techniques, being necessary to perform a surgical procedure, Surgical Site Infection rate

confirmed by a culture is considered as a Surgical Site Infection, Recurrence Rate considered as the re-opening of the scar once it has been closed or as the emergence or a new fistula orifice closed to the scar, Quality of life compiling information about the possibility of seating at the WC for defecation or walking normally taking into account the period time needed to perform these activities after the surgery and Time to work or school.

**Safety Assessments:** The nature, onset, duration, severity, and outcome of all adverse events, as well as any association of an adverse event related to the study medication, were assessed and documented at each visit. To evaluate the safety profile of the treatments, all complications and/or adverse events were recorded with an accountability scale.

### **Sample size calculation**

A sample size of 52 patients, with 26 subjects per group, was estimated to provide at least 80% power to detect differences in the 15% improved healing time over the control group. We calculated

the sample size using the t bilateral T-Student test for two independent samples, taking into consideration a significance level of 5 % assuming a standard deviation of 18 and expected abandon rate of 5%. Given that the expected bounce rate is 5% would be necessary to recruit 26 experimental units in the control group and 26 in the experimental group units, totaling 52 experimental units in the study.

### **Data Analysis**

Initially, we performed a descriptive analysis of the sample, taking into account the demographic and clinical variables of patients. Quantitative variables were determined by the mean and standard deviation, and for qualitative variables a frequencies analysis was conducted.

Analysis of the efficacy outcome measure was conducted according to the intention to treat. The comparison of treatment groups in the different treatment visits was performed by applying a Student t test or Mann Whitney test for quantitative variables and a X2 analysis for categorical variables.

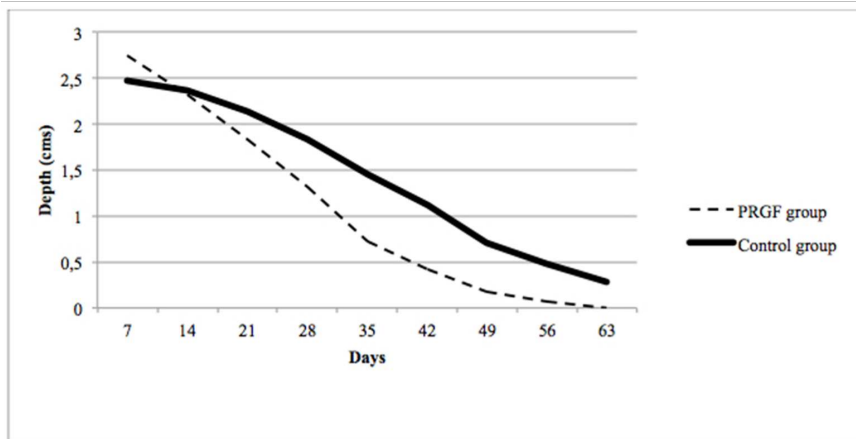


Fig 4: Average wound depth and days to healing.

For all outcomes, a nominal  $p=0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## RESULTS

A total number of 51 patients were included prospectively in this study and randomized into two different groups: 26 patients included in the PRGF Group (excision+PRGF) and 25 patients in the Control Group (excision+local cures). Two patients of each group were excluded from the initial 51 patients for difficulties during the follow up. Finally a total of 47 patients completed the post operative follow up, 24 corresponding to the PRGF Group and 23 to the Control

Group. Demographic data are shown in the **table 1**.

There was only one patient suffering from an associated pathology, Arterial Hypertension (2%). The rest of the 46 patients were not suffering from any associated diseases. Only one patient was under treatment which may interfere with the healing process (2%), a topic corticoid treatment for a skin disease. According to the characteristics of the pilonidal disease, 22 patients presented a multiple fistula (46,8%) and 25 patients presented a one fistula (53,2%). The main characteristics of the pilonidal sinus, main complaint and initial volume after the excision are

**Table 3:** Efficacy outcomes

	PRGF group	Control group	p
n	24	23	
Days Wound healing <i>Median (range)</i>	46(49)	70(84)	<0,001★
days to walk <i>Median (range)</i>	1(4)	3(6)	<0,001★
Days to sit on toilet <i>Median(range)</i>	1(1)	2(3)	<0,001★
Days to return to work or school ( <i>SD</i> )	26,04 (4,82)	42,52(6,55)	<0,001 †
Pain <i>Average (SD)</i>			
VAS day 1	2,7(1,5)	6,5(1,3)	<0,001★
VAS day 7	2,3(0,9)	5,6(2,1)	<0,001★
VAS day 30	1,0(1,0)	1,6(1,6)	0,249★
Bleeding <i>n (%)</i>	0(0%)	2(8,7%)	0,234#
Wound infection <i>n(%)</i>	0(0%)	0(0%)	1

★Mann Whitney, #Chi cuadrado, † T Student

shown in the **Table 2**. Both groups are comparable according to the basal data of the patients and the injuries, noticing that the injuries treated with PRGF were significantly larger than in the control group.

Despite the injuries treated with PRGF being significantly larger, healing times were also significantly shorter than the times recorded in the control group ( $p < 0,001$ ) (**Table 3**) (**Figures 3-4**).

Concerning post operative pain, a

significantly lower VAS was registered in the 1st and 7th day after the surgery in the PRGF group, matching the differences within the first month after the surgery.

In relation with the quality of life (days to be able to seat on the WC and to walk normally) there were significant differences in favour to the PRGF group, improving the quality of life after the surgery in these patients. Regarding time to return to work or school, there were significant differences in

favour to PRGF group (26,04 vs 42,52 days).

There was no evidence of surgical wound infection in any of the patients included in this study. Only two patients in the control group needed a surgical intervention due to a postoperative bleeding (8, 7%), and no patients from the PRGF Group. This fact may be explained due to the haemostatic properties of the PRGF contained in an extracellular matrix of fibrin thus improving the coagulation.

Although there were differences between both groups, which were favourable to the PRGF group, these differences were not significant.

After 60 months of follow-up, only one recurrence has been detected in the Control Group (2,1%) with not significant differences between the study groups.

#### **DISCUSSION**

Pilonidal sinus is a common and often difficult condition to treat. It most frequently affects men (male-to-female ratio 3:1) between the ages of 18–40 years. The presentation of the disease varies

from acute abscess formation to chronic non-healing pits. Its etiology is uncertain: broken hair, either local or from the scalp, becomes abnormally inserted in the natal cleft with a localised inflammatory, foreign body reaction resulting in the formation of a cyst and subsequent pits and/or abscess or there is a focus of follicular infection from a hair follicle lying in the midline natal cleft (8).

Ideal treatment for pilonidal sinus disease should be simple, effective and relatively pain-free allowing a quick recovery and return to normal activities. Actually, this condition is managed with surgery, and often is associated with significant morbidity and prolonged recovery times. Traditional surgical techniques are frequently complicated by wound breakdown, infection, prolonged pain and immobility. Reported recurrence rates vary widely between reported studies of midline excision with and without primary closure (either midline or off-midline closure). [ref] Open healing was associated with a 58 % lower risk of recurrence but clearly has a large impact on time spent recovering from surgery with

wound dressings and prolonged pain.

Autologous platelet-rich plasma (PRP) is a product derived from blood that is increasingly widely used in clinical practice and, among other applications. The biological effects of PRP are largely attributed to the platelet secretome and plasma signaling proteins (9) Clinical data suggest that PRPs may exploit different regenerative mechanisms under diverse disease conditions, including hemostasis, inflammation, angiogenesis and the synthesis of extracellular matrix. The success of PRP therapies depends on current tissue healing research and the translation of this knowledge into clinical developments.

Plasma Rich in Growth Factor (PRGF) is a type of plasma enriched of proteins and circulating growth factors able to aid the soft tissue regeneration. PRGF contains many different cells and cell-types highly concentrated which can be placed into the site of the injury: these cells can stimulate and accelerate the healing process by forming blood clots and

releasing growth factors into the wound (10).

The results of this study showed a significant decrease in the healing time when using PRGF compared to the wounds treated with the traditional cures, despite being the wounds treated with PRGF significantly bigger. The postoperative pain was also significantly lower in the PRGF group on the 1st and 7th day, being the differences similar within the first month after the surgery. The quality of life improved significantly when the wound was treated with PRGF compared to those treated with traditional cures. The time to return to work or school was significantly lower in PRGF group. Despite being two patients in the control group who presented bleeding of the wound and they were not from the PRGF group, the differences regarding complications were not significant between the groups, as well as the recurrence rate after 5 years of follow-up.

On the other hand, the majority of adverse events that were reported by patients were mild in severity and not related to the type of

treatment but different protocols.

These findings are in good agreement with those described in 2009 by Spyridakis et al (11). This autor found that the wound healing in the patients who received PRP was faster than the patients in the control group. The healing time in the test group was 24 days, while it was more than 30 days in the control group. Also the patients in the test group could return to work after 25 days, whereas this time was 37 days in the control group.

In 2013, Mehrabi Bahar and cols designed a randomized clinical trial including 74 patients (37 for treatment group) in which it was found that pain in the test group was significantly lower than the control group in the first and fourth weeks. Return time to work and social activities in the test group was significantly shorter than the control group (12).

Achalsov et al. (13) used PRGF in patients who underwent surgery for pilonidal abscess. A total of 248 patients were divided into two different groups. Patients in the group 1 received a traditional postsurgical treatment, and the patients corresponding to the

group 2 were treated with PRGF. The author showed that the local application of PRGF promoted the activation of the surgical wound healing, thus reducing the healing time. PRGF application would stimulate the granulation and epithelisation process, thus reducing the healing time when leaving the wound open for a second intention closure.

### CONCLUSIONS

The application of PRGF in the wound after pilonidal sinus limited excision, reduces significantly the wound healing time, improves postoperative pain, the quality of life after surgery and also the time to return to work o school, compared to the traditional procedures. There were no differences regarding complications or the recurrence rate between the groups.

### REFERENCES

1. Sondenna K, Andersen E, Vesvik I, Soreide JA. Patient characteristics and symptoms in chronic pilonidal sinus disease. *Int J Colorectal Dis.* 1995;10:39-42.
2. Rakinic J. Modern management of pilonidal disease. In: Cameron JL, editor. *Current surgical therapy.* Saint Louis (MO): Mosby; 2007. p. 299–305.



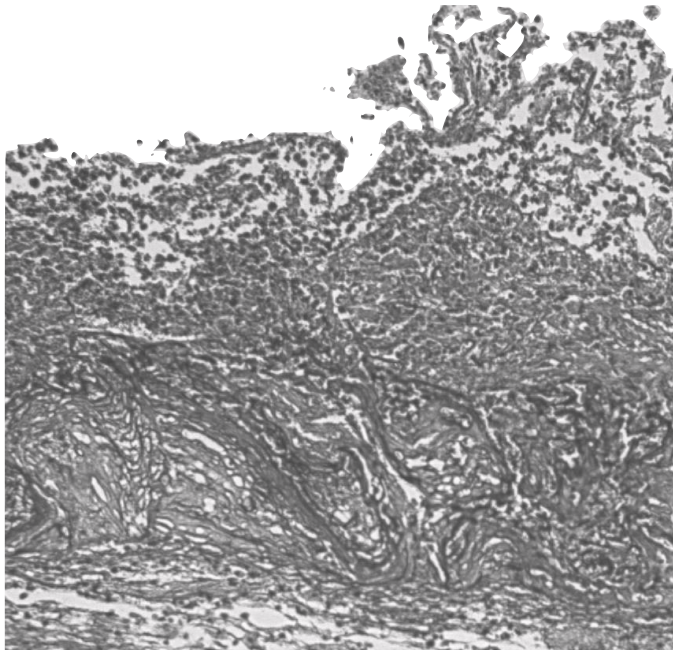
#### Artículo 4

---

3. Mayo OH. Observations on injuries and diseases of the rectum. London: Burgess and Hill;1833:45-46.
4. Buie LA. Jeep disease (pilonidal disease of mechanized warfare). *South Med J*;37:103-9.
5. Brasel KJ, Gottesman L, Vasilevsky CA. Meta-analysis comparing healing by primary closure and open healing after surgery for pilonidal sinus. *Journal of the American College of Surgeons*. 2010;211(3):431-434.
6. AL-Khamis A, McCallum I, King PM, Bruce J. Healing by primary versus secondary intention after surgical treatment for pilonidal sinus. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2010, Issue 1.
7. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:741-752.
8. Eley E, Lund JN. Fibrin glue in the treatment for pilonidal sinus: high patient satisfaction and rapid return to normal activities. *Tech Coloproctol*. 2013;17(1): 101-4.
9. Andia I, Abate M: Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen Med* 2013, 8(5): 645-58.
10. Giannini S, Cielo A, Bonanome L, Rastelli C, Derla C, Corpaci F, Falisi G. Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2015; 19: 927-930.
11. Spyridakis M, Christodoulidis G, Chatzitheofilou C, Symeonidis D, Tepetes K. The role of the platelet-rich plasma in accelerating the wound-healing process and recovery in patients being operated for pilonidal sinus disease: preliminary results. *World J Surg*. 2009;33(8):1764-9.
12. Mehrabi Bahar M, Ali Akbarian M, Azadmam A. Investigating the Effect of Autologous Platelet-Rich Plasma on Pain in Patients With Pilonidal Abscess Treated With Surgical Removal of Extensive Tissue. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2013; 15(11): e6301.
13. Achalsov EE, Uliánov AA, Bezuglov EN. The use of autoplasmá rich in platelet growth factors (APRPGF) on results of treatment of patients with pilonidal sinus abscess. *Khirurgiia (Mosk)*, 2013;(12): 43-7.



## Discusión





Tal y como se ha explicado en la introducción de la presente tesis doctoral, la utilización de plasmas ricos en factores de crecimiento constituyen una alternativa eficaz para el tratamiento de heridas crónicas.

El trabajo experimental realizado se ha centrado en un plasma rico en plaquetas conocido como Plasma Rico en Factores de Crecimiento y mediante 4 artículos pretende responder a dos grandes preguntas:

- La eficacia y seguridad de su uso terapéutico, en las dos indicaciones habituales, heridas crónicas y postquirúrgicas (Artículos 1, 3 y 4).
- La caracterización de dicho producto, con el objetivo de conocer por un lado la concentración de plaquetas y factores de crecimiento como determinar la eficacia antibacteriana del mismo frente a los patógenos cutáneos más frecuentes (Artículos 1 y 2).

### ***Caracterización del PRGF***

La caracterización del PRGF fue necesaria por el hecho de que aunque a priori el proceso de obtención de un plasma rico en plaquetas se basa en una centrifugación diferencial de una pequeña porción de la sangre del propio paciente, existen importantes diferencias en los protocolos de obtención de los concentrados plaquetarios.

Distintos estudios en los que se ha evaluado comparativamente diferentes dispositivos y/o protocolos para obtener plasma rico en plaquetas [Weibrich, 2002; Appel, 2002; Weibrich, 2003; Key, 2004; Weibrich, 2005] se han obtenido resultados dispares

respecto a las características del producto final obtenido, lo que puede explicar las diferencias encontradas respecto a la eficacia terapéutica de dichos preparados.

Este hecho dificulta el establecimiento de un sistema de estandarización que permita analizar e interpretar de forma unívoca los resultados de los distintos estudios clínicos realizados para la valoración de la eficacia terapéutica de los diferentes concentrados plaquetarios obtenidos [Anitua E, 2006; Luces G, 2006], lo que prácticamente obliga a que cada tratamiento tenga que demostrar de manera independiente su eficacia y seguridad en el tratamiento de las úlceras cutáneas.

### **Concentración de plaquetas y factores de crecimiento**

Como se muestra en el primer artículo de esta tesis, esta tecnología permite una concentración de plaquetas entre 2 y 3 veces mayor respecto a existente en sangre periférica.

Esta concentración plaquetaria se relaciona con un beneficio biológico óptimo. De hecho, concentraciones inferiores pueden resultar subterapéuticas mientras que por el contrario concentraciones superiores pueden inducir efectos adicionales que incluso pueden llegar a ejercer acciones inhibitorias. [Knighton DR, 1986, Marx RE 2001].

Una posible explicación de por qué concentraciones superiores no significan una mayor eficacia es aportada en un reciente estudio que sugiere que altas concentraciones plaquetarias favorecerían el inicio de la fase inflamatoria mientras que concentraciones más bajas facilitarían el paso de la fase inflamatoria a la fase proliferativa y posterior remodelado de las heridas por estimulación de la secreción del factor de crecimiento hepatocitario, de la proteína de quimioatracción de monocitos, de

la proteína activadora de los neutrófilos y del VEGF así como de la IL-6 encargada de estimular la formación de tejido de granulación, la quimiotaxis de los leucocitos, la angiogénesis y la reepitelización [Xian LJ, 2015].

Por otro lado, en el estudio de caracterización incluido en el artículo 1 se encontró una correlación directa entre el número de plaquetas y algunos de los factores de crecimiento liberados, tales como PDGF, TGF- $\beta$ 1, VEGF y EGF, no habiéndose observado dicha correlación para HGF e IGF-I. Este hecho puede ser una consecuencia de una menor presencia de estos factores de crecimiento en los gránulos alfa plaquetarios.

Estos resultados han sido confirmados en distintos estudios en los que se han comparado diferentes sistemas de de preparación de PRP a través de un análisis del rendimiento de plaquetas obtenido con cada sistema y la cuantificación de los principales factores de crecimiento contenidos en ellos. Dichos estudios han concluido que el número de plaquetas por si sólo no puede utilizarse para predecir la cantidad de factores de crecimiento que serán producidos aunque exista una asociación significativa entre el número de plaquetas y la concentración de algunos factores de crecimiento [Weibrich, 2002 ; Zimmerman, 2004].

Otra de las características distintivas del PRGF observadas en la caracterización realizada es la ausencia total de leucocitos en el producto obtenido.

Esta ausencia de leucocitos permite evitar los efectos pro-inflamatorios de las proteasas y las hidrolasas ácidas contenidas en los leucocitos [Snabel, 2007] lo que ha sido confirmado por diversos estudios han analizado la relación entre el contenido

leucocitario de los plasmas ricos en plaquetas y la eficacia de los mismos.

Una revisión sistemática realizada por Riboh en 2015 ha mostrado resultados significativamente superiores en los pacientes tratados con PRP sin contenido leucocitario respecto a aquellos tratados con PRPs ricos en leucocitos en el tratamiento sintomático de la artrosis. Desde el punto de vista de la seguridad no se han encontrado diferencias significativas entre ambas formulaciones. [Riboh, 2015].

Otro estudio publicado por Zhou en 2015 ha encontrado una respuesta heterogénea al tratamiento al comparar el efecto de la aplicación de PRPs ricos y pobres en leucocitos sobre la diferenciación de tenocitos activos. Los hallazgos de este estudio sugieren que, mientras que no parece haber diferencias entre los distintos PRPs respecto a la seguridad en la inducción de la diferenciación de las células madre, la presencia de leucocitos puede inducir efectos catabólicos e inflamatorios en las células del tendón, pudiendo prolongar el tiempo de recuperación de los tendones.

Estos resultados complementan los descritos en un estudio publicado en 2015 en el que se observó que en condiciones inflamatorias, la diferente composición celular de PRP al añadir leucocitos aumenta los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, estimulando asimismo a las células residentes para producir una mayor cantidad de las proteínas antes mencionadas. Las propiedades mecánicas del coágulo son más pobres, probablemente debido a la mayor degradación de las redes de fibrina bajo condiciones inflamatorias. Estos cambios podrían estar directamente relacionados con una disminución de la



proliferación celular, lo que en última instancia podría resultar perjudicial para la regeneración de tejidos [Anitua, 2015].

### **Propiedades antimicrobianas**

Otro de los elementos de caracterización del producto incluidos en la presente tesis y concretamente en el artículo 2 fue el estudio de la capacidad bacteriostática del PRGF para las cepas de *estafilococo* más frecuentes en las heridas cutáneas incluyendo tanto las *meticilin* sensibles como las resistentes.

Los hallazgos de dicho estudio nos han permitido confirmar que el potencial bacteriostático del PRGF es independiente de la presencia de leucocitos en su composición, no habiéndose encontrado diferencias significativas en este aspecto entre el PRGF y otros PRPs, aunque sin embargo se comprobó que la inclusión de leucocitos alteraba la estructura y uniformidad de la matriz de fibrina siendo posible que el contenido adicional de leucocitos pueda incrementar la respuesta inflamatoria en el sitio de la herida debido a las metaloproteasas secretadas por los leucocitos junto a las proteasas proinflamatorias e hidrolasas ácidas contenidas en los glóbulos blancos.

Esta capacidad antibacteriana coincide con la descrita en diferentes estudios en los que se evidencia que las preparaciones sin presencia de leucocitos y a pesar de la ausencia de estos mostraron actividad bacteriostática frente a un gran número de cepas bacterianas y fúngicas probablemente debido al efecto de las tromboquinas y otros péptidos plaquetarios como el factor de plaquetario 4, el péptido 3 activador del tejido conectivo, la proteína básica de las plaquetas, la timosina  $\beta$ -4, y los fibrinopeptidos A y B capaces de alterar las membranas bacterianas [Zhou, 2015].

## Discusión

---

Asimismo y a tenor de los resultados obtenidos en nuestro estudio y recogido en el artículo 2 podemos afirmar que la actividad antimicrobiana del PRGF frente a las cuatro cepas de estafilococo estudiadas alcanza su máxima expresión durante las primeras horas tras la aplicación, por lo que consideramos que su uso debería localizarse en la profilaxis de la infección más que el tratamiento, pudiendo la adición de PRGF reducir el número de bacterias lo suficiente para prevenir la reinfección y acelerar el proceso de cicatrización como complemento al desbridamiento quirúrgico.

## ***Ética y diseño de los ensayos clínicos realizados***

Como ya se ha comentado en los primeros párrafos de la presente discusión, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la obtención de datos de eficacia y seguridad de la aplicación del PRGF para el tratamiento de heridas cutáneas de difícil cicatrización.

Respecto a su uso en úlceras cutáneas, en un primer lugar se llevó a cabo un ensayo clínico exploratorio en el que se incluyeron heridas crónicas de diferentes orígenes: úlceras por presión, úlceras por insuficiencia venosa y heridas crónicas postquirúrgicas (artículo 1).

Una vez finalizado dicho estudio y partiendo de la experiencia obtenida en el mismo, se llevó a cabo un segundo ensayo clínico en el que únicamente se valoraron úlceras de origen venoso (artículo 3).

Finalmente, y para investigar su otro uso fundamental, en heridas quirúrgicas de difícil cicatrización, se estudió la eficacia del producto en el cierre post intervención del sinus pilonidal mediante la realización de un tercer ensayo clínico randomizado y controlado con el tratamiento convencional (artículo 4).

La razón de realizar estos ensayos clínicos vino determinada por la pequeña cantidad de ensayos clínicos aleatorizados y controlados diseñados con el fin de demostrar la eficacia de los plasmas ricos en plaquetas en estas aplicaciones, siendo los resultados de los mismos contradictorios, no habiéndose podido confirmar de forma definitiva la eficacia de los mismos [Martínez Zapata FJ; 2009].

Asimismo esta necesidad se ha visto reforzada por la consideración en 2013 por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios de los plasmas ricos en plaquetas como medicamentos de uso humano por lo que desde la administración se anima a los investigadores a realizar ensayos clínicos adecuadamente diseñados para establecer niveles de evidencia adecuados en cada una de las patologías y tipos de PRP [ICO, 2013].

A la hora de plantear los tres estudios clínicos se cuidaron todos y cada uno de los aspectos éticos recomendados para estudios con seres humanos. Así los ensayos se llevaron a cabo siguiendo las normas establecidas por la Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95), la Declaración de Helsinki y la legislación vigente en el momento del inicio de cada uno de los ensayos clínicos que forman parte de la tesis doctoral. También se ha protegido la confidencialidad de los registros que pudieran identificar a los sujetos respetando la privacidad y las normas de confidencialidad de acuerdo con los requisitos legales pertinentes, fundamentalmente la Ley Orgánica de Protección de Datos Personales.

Asimismo, todos los ensayos clínicos incluidos fueron realizados siguiendo estrictamente los protocolos que previamente recibieron un dictamen favorable de un Comité Ético de Investigación Clínica, así como la autorización de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios..

### **Selección de los pacientes**

Los pacientes incluidos en los ensayos clínicos objeto de la presente memoria fueron reclutados desde las consultas de cirugía vascular y de traumatología del Hospital de Txagorritxu de Vitoria y desde el servicio de cirugía mínimamente invasiva de la

Clínica Quirón Sagrado Corazón de Sevilla en el caso de las heridas quirúrgicas.

Antes de ser seleccionados, todos los pacientes potencialmente reclutables en los diferentes estudios fueron valorados en la consultas externas de servicios traumatología, cirugía vascular, o cirugía mínimamente invasiva en el caso de las heridas postquirúrgicas

En estas consultas se exploraba a los pacientes y se valoraba el grado de cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio.

Cumpliendo con las normas de buena práctica clínica así como con la legislación vigente, no se incluyó en ninguno de los estudios a ningún paciente que no hubiera otorgado por escrito su consentimiento informado.

La elección de los criterios de inclusión de los pacientes vino determinada tanto por las características de las lesiones objeto de estudio como por los objetivos de los estudios, teniendo en cuenta de forma definitiva la seguridad del paciente.

Con el fin de minimizar el efecto de los posibles factores de confusión se decidió excluir de los tres estudios a todos aquellos pacientes que presentaran en el momento del reclutamiento cualquier proceso que pudiera interferir o retrasar la correcta cicatrización de las heridas.

Asimismo y con el objeto de homogeneizar las muestras se excluyeron todos los procesos sistémicos que pudieran ser causa por si mismos de úlceras crónicas, concretamente la diabetes mellitus y los procesos autoinmunes, ya que el control de estas heridas requería un exhaustivo control de la enfermedad de base que escapaba a los objetivos y medios de esta tesis.

Asimismo se excluyeron los tratamientos inmunosupresores ya que pueden influir en la evolución de las lesiones al alterar la respuesta de las células responsables de la fase inflamatoria de la cicatrización, causando una deficiencia en la reparación tisular.

### **Diseño de los estudios**

El diseño de los tres estudios clínicos se realizó buscando obtener la máxima evidencia, por lo que se optó por el ensayo clínico aleatorizado, abierto y controlado mediante tratamiento convencional.

### **Aleatorización**

El hecho de haber elegido un diseño aleatorizado para los tres estudios incluidos en la presente tesis doctoral vino determinado porque la asignación al azar de los tratamientos permite que ni el sujeto ni el investigador influyan en la decisión de que intervención recibirá cada uno de los sujetos. De esta forma se minimizan los posibles sesgos en la evaluación de la respuesta que pudieran comprometer la comparabilidad de los grupos.

Sin embargo cuando el tamaño muestral es pequeño como los estudios incluidos en la presente memoria, la probabilidad de que los pacientes no se distribuyan de forma homogénea en ambos grupos de tratamiento aumenta de forma significativa por lo que se llevaron a cabo una serie de estrategias para disminuir dicho riesgo:

Por un lado la aleatorización se llevó a cabo en bloques de 4, lo que garantiza el mismo número de pacientes en cada grupo de tratamiento.

Por otro se incluyeron variables que específicamente evaluarán la evolución de las heridas a lo largo del tiempo como es el caso

del porcentaje de superficie recuperada utilizado en los dos primeros estudios clínicos.

Por último, en aquellos casos en los que fue preciso (como en el estudio incluido en el artículo 3), se realizó un ajuste estadístico por aquellas variables de confusión que mostraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la visita basal.

### **Enmascaramiento**

Si bien es cierto que el «ciego» es un elemento fundamental para la validez interna de los estudios clínicos al reducir el riesgo de sesgo de información que puede surgir bajo la influencia física o psicológica del conocimiento de las intervenciones recibidas, por los grupos entre los participantes de un estudio [Bang H, 2004], las diferentes características de los tratamientos aplicados en este trabajo, hacían muy difícil el enmascaramiento de los mismos tanto para el paciente como para el investigador.

Además el hecho de que para obtener el PRGF sea necesario obtener una muestra de plasma y no en el tratamiento convencional, podría suponer una dificultad ética al ciego (que supondría obtener muestras de sangre innecesarias en el grupo control).

Por último, las variables utilizadas en los ensayos clínicos incluidos en la presente memoria son objetivas y lo suficientemente robustas como para evitar una posible sobreestimación el efecto de la intervención, de acuerdo con la afirmación de que la relevancia del «ciego» en términos de la validez de un estudio depende directamente del tipo de variable utilizada para medir la eficacia de una intervención, [Letelier, 2004].

### **Elección del tratamiento control**

A la hora de escoger el tratamiento comparador, no se consideró ética la utilización de placebo como control y se eligió de forma consensuada con los facultativos de los distintos servicios implicados en el diseño de los estudios el tratamiento convencional.

En los dos primeros ensayos clínicos se escogió la cura diaria mediante método tradicional: limpieza y desbridamiento mecánico quirúrgico atendiendo a las recomendaciones del grupo nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión y heridas crónicas.

Se eligió este control frente al resto de las soluciones y apósitos existentes en el mercado porque la cura convencional era en el momento del diseño de los ensayos clínicos el único tratamiento que había demostrado eficacia en la cicatrización de úlceras cutáneas en ensayos clínicos aleatorizados, siendo junto al vendaje compresivo en úlceras por insuficiencia venosa los únicos tratamientos con evidencia demostrada respecto a la eficacia [AETS, 2001; Palfreyman SJ, 2008; O'Meara S, 2009].

El único cambio en las pautas de tratamiento entre el primero y el segundo ensayo clínico fue el tipo de apósito secundario.

En el primer ensayo clínico se utilizaron gasas humedecidas con suero salino en el primer ensayo clínico, que fueron sustituidas en el segundo estudio por apósitos transparentes siliconados. El motivo del cambio de apósito fue la constatación en el primer ensayo clínico de que las gasas humedecidas se terminaban secando, aumentando la adhesión al lecho lesional, lo que en muchos casos dificultaba la cura posterior, aumentando el dolor en las curas y lo que es peor, levantando en ocasiones el tejido



de granulación que se había formado. Sin embargo los apósitos siliconados, constituían una alternativa sólida ya que careciendo de efectos biológicos activos sobre el lecho ulceroso, idéntico a las gasas estériles empapadas de suero, en este caso facilitaban un levantamiento de la cura indoloro respetando la integridad del tejido de granulación.

En el tercer ensayo clínico realizado para valorar la eficacia del PRGF en el lecho quirúrgico del sinus pilonidal incluido en el artículo número 4, el tratamiento control consistió en la excisión limitada con cierre por segunda intención con curas regulares. La elección de este control vino determinada (al igual que en los dos estudios previos) por la evidencia descrita en la literatura.

De hecho, una revisión sistemática publicada por Brasel en 2010 comparando las técnicas abiertas y cerradas concluyó que no hay clara ventajas en el tratamiento quirúrgico por el cierre primario o la curación segunda intención, presentando menos complicaciones y una menor tasa de recurrencia que el cierre primario [Brasel, 2010].

De la misma forma, otras revisiones sistemáticas concluyeron que aunque el tiempo de curación es superior en las heridas cerradas por segunda intención, la tasa de recurrencias es significativamente inferior a la registrada en aquellas heridas sometidas a un cierre primario [Al-Kharmis, 2010; Enriquez-Navascues, 2014] sugiriendo que la excisión radical seguida de cierre primario debe ser desechada debido a que la tasa de infecciones y dehiscencias de las heridas es significativamente mayor a otras alternativas como la excisión limitada o la sinectomía abierta.

### **Elección de las variables de eficacia**

A la hora de escoger las variables de valoración utilizadas en los distintos estudios incluidos en esta tesis hubo que tener en cuenta que la cicatrización es un proceso que incluye una compleja serie de eventos celulares y moleculares que tienen como fin restaurar la integridad de la piel y el funcionamiento normal de los tejidos afectados, por lo que no depende de un único factor, sino que es multicausal.

Cuando pretendemos evaluar la evolución de una herida en proceso de cicatrización son múltiples los factores que deberíamos tener en cuenta, no habiéndose establecido método estandarizado seguro y fiable que nos permita valorar la evolución de las heridas crónicas.

En nuestros estudios se incluyeron distintos métodos de evaluación con el objetivo de tener una visión lo más global posible, teniendo en cuenta que una buena escala de valoración debe ser objetiva, aplicable a distintos tipos de heridas y ser de fácil aplicación, debiendo ser asimismo válida, fiable y sensible al cambio [Restrepo-Medrano, 2011].

Resumiendo, debe ser consistente en los resultados y medir lo que realmente se quiere medir, siendo capaz de detectar cualquier cambio en la lesión.

En este sentido, la evaluación de una herida con una medida cuantitativa (como, por ejemplo, su tamaño) a lo largo del tiempo constituye actualmente uno de los métodos unidimensionales de medida de cicatrización más utilizados en el ámbito clínico y experimental.

Esta medida ha demostrado una fuerte correlación con la cicatrización, habiéndose confirmado que transcurridas dos

semanas los cambios en el diámetro de la lesión se correlacionaban con la probabilidad de cicatrización de la herida [Van-Rijswijk, 1993].

Por lo antes descrito, y tal como se ha comentado en otros apartados de esta discusión, se consideró que en los estudios con un pequeño tamaño muestral y un seguimiento relativamente corto, esta variable constituye una herramienta robusta para establecer la eficacia de los distintos tratamientos existentes para las úlceras cutáneas y por ello es una de las variables más utilizadas tanto de forma única o combinada en distintos estudios desde Steed en 1992 hasta Cervelli en 2009, sobre todo en aquellos casos como en el nuestro con un corto tiempo de seguimiento.

Las otras variables de valoración utilizadas para evaluar la eficacia del tratamiento fueron el número de úlceras totalmente cicatrizadas, el tiempo transcurrido hasta la cicatrización completa y el tiempo transcurrido hasta la vuelta a la actividad diaria.

El motivo por el que se eligió el número de úlceras que alcanzaron la cicatrización completa fue el hecho de que es una variable objetiva, fácil de valorar y ampliamente utilizada en la bibliografía.

Al revisar los ensayos clínicos publicados para valorar la eficacia de los diferentes preparados de plasma rico en plaquetas podemos observar que ésta variable fue utilizada bien de forma única o combinada con otras variables en el 80% de los mismos.

Asimismo ha sido incluida como variable principal de valoración en los distintos metanálisis publicados en los que se evalúa la eficacia de los plasmas ricos en factores de crecimiento en diferentes aplicaciones [Martínez Zapata, 2009; Del Fabro, 2011, Carter, 2011].

La siguiente variable utilizada para valorar la eficacia en nuestros ensayos clínicos, e íntimamente relacionada con la primera fue el tiempo transcurrido hasta la cicatrización completa de las lesiones.

Aquí chocamos con una de las principales limitaciones de los dos primeros ensayos clínicos llevados a cabo, pues el tiempo de seguimiento escogido no fue suficiente para que se alcanzara la cicatrización completa en un número suficiente de pacientes.

Aunque es cierto que hay en la literatura distintos estudios con periodos de seguimiento iguales o inferiores a las 12 semanas [Aminian, 1995; Aminian, 1999; O'Connell, 2008; Cervelli, 2009], la medición de la eficacia de los tratamientos no se basó en el tiempo de cicatrización, sino en la disminución del área lesional tanto en valores absolutos como relativos, siendo el tiempo de cicatrización una variable secundaria en aquellos estudios en los que se analizó.

Debido que únicamente un 30% de las úlceras analizadas alcanzaron la curación completa en las 8 semanas de seguimiento, se hizo una aproximación al tiempo de cicatrización para aquellas úlceras que evolucionaron favorablemente mediante la aplicación de un modelo de regresión simple. La principal restricción de esta aproximación fue que precisamente excluía a aquellos pacientes con una mala evolución clínica, ya que debido a que el área de las lesiones era creciente el tiempo calculado en este supuesto era negativo.

Mención especial merece la selección de las variables de eficacia llevada a cabo en el tercer estudio clínico. En este caso, las heridas son originadas de forma aséptica en un entorno controlado, con un seguimiento activo desde el origen hasta la

curación total.

Por esto es por lo que la evaluación de la evolución del área lesional pierde relevancia, ganando importancia otras variables relacionadas con el confort del paciente entre las que destacan la intensidad del dolor postquirúrgico, el tiempo hasta la defecación en sedestación y los tiempos transcurridos hasta la deambulacion, destacando el tiempo hasta el retorno a la actividad laboral habitual.

Esta última variable es asimismo importante desde el punto de vista de la gestión sanitaria, ya que concretamente el seno pilonidal constituye un problema de salud que origina importantes costos económicos, tanto directos como indirectos, y debido a que no existe un consenso respecto al tratamiento ideal la elección de un correcto abordaje terapéutico cobra importancia, porque estos pacientes, generalmente población activa asocian un tiempo considerable de baja laboral, habiéndose estimado que el tiempo medio de baja es de 30 días [Bonacho, 2009].

### **Elección de las variables de seguridad**

La evaluación de seguridad en todos los estudios incluidos se basó en la recogida de los acontecimientos adversos acontecidos durante el periodo experimental, siendo valorados teniendo en cuenta su intensidad, frecuencia, evolución en el tiempo y posibles requerimientos de medidas específicas de tratamiento.

Para describir, categorizar y evaluar los acontecimientos adversos se decidió utilizar la terminología recogida en la página web del NCI americano ya que ésta terminología es ampliamente reconocida, representando una forma de unificar criterios.

## Discusión

---

Para evaluar la relación causal han ido surgiendo diferentes algoritmos que nos ayudan a caracterizar mejor dichos acontecimientos entre los que el propuesto por Karch y Lasagna en 1977 y posteriormente modificado por Naranjo y colaboradores en 1981 es uno de los más utilizados en la actualidad.

En nuestro caso, además de definir los acontecimientos adversos acontecidos se recogieron datos de inicio-fin y duración, relación causal con el fármaco experimental, evolución y medidas adoptadas registrándose la relación de causalidad atendiendo a este algoritmo de Karch y Lasagna.

Por ello, la caracterización, la recopilación y el seguimiento de los acontecimientos adversos recogidos en los ensayos clínicos incluidos en esta memoria fue considerado adecuado y suficiente, ya que se emplearon criterios y escalas sobradamente probadas, validadas y reconocidas en el ámbito científico.

## ***Resultados de los ensayos clínicos***

### **Resultados de eficacia**

La eficacia del PRGF, tanto en heridas cutáneas como quirúrgicas, se ha evaluado mediante distintas variables.

### **Número de úlceras cicatrizadas**

La primera de las variables ha sido el número de úlceras cicatrizadas. Al analizar el número de lesiones crónicas totalmente curadas al final del periodo de seguimiento podemos ver que alcanzaron la total cicatrización entre un 25% y un 50% de las úlceras incluidas en el grupo experimental no habiéndose registrado ningún caso en el grupo control.

Estos resultados son apoyados por los publicados en 2009 por Cervelli y colaboradores al presentar su experiencia en la aplicación de plasma autólogo rico en factores de crecimiento combinado con grasa autóloga como complemento a la cirugía reconstructiva en el tratamiento de úlceras crónicas en extremidades inferiores. En este estudio, en el que se incluyeron 30 úlceras, de las cuales 20 fueron tratadas mediante PRP y grasa autóloga y 10 mediante ácido hialurónico, se observó que 16 de las 20 lesiones sometidas a tratamiento experimental reepitelizaron por completo transcurridas 10 semanas, mientras que las incluidas en el grupo control lograron el cierre completo únicamente en dos casos.

Otro estudio descriptivo no comparativo publicado por Martimestre en 2005, mostró cicatrización total en 12 de los 14 pacientes incluidos en un tiempo medio de 2,93 meses (0,5-7 meses).

### **Tiempo de cicatrización**

Otra de las variables usadas ha sido el tiempo de cicatrización.

En los dos estudios clínicos realizados con heridas crónicas los tiempo estimados de cicatrización de los pacientes tratados mediante PRGF fueron entre 10 y 24 semanas inferiores a los obtenidos en los pacientes sometidos a tratamiento convencional.

Estos datos coinciden con los publicados por Mazzucco y colaboradores en 2004 en los que se comparó la evolución de 31 sujetos con úlceras cutáneas necróticas de los cuales 17 recibieron el tratamiento experimental con suero salino más gel procedente de concentrado de plaquetas autólogas con la de 14 controles históricos que habían sido sometidos a tratamiento convencional mediante limpieza de la herida y apósitos de ácido hialurónico y colágeno sintético. Los pacientes tratados mediante gel de plaquetas requirieron un tiempo significativamente inferior ( $p < 0,0001$ ) para poder ser intervenidos quirúrgicamente que los tratados mediante método tradicional (15 semanas por 35,5 semanas respectivamente).

Otro estudio en el que el tiempo de cicatrización mostró cifras similares a las alcanzadas en los ensayos clínicos analizados en el presente trabajo fue el publicado por Steed y colaboradores en 1992 en el que 5 de 7 úlceras tratadas mediante factores de crecimiento autólogos alcanzaron tiempos de cicatrización que oscilaban entre las 15 semanas frente a una de cinco úlceras del grupo control que cicatrizó a las 20 semanas de haber iniciado el tratamiento [Steed, 1992].



En un estudio publicado por O'Connell y colaboradores se observó la eficacia de una matriz preparada a base de plasma autólogo rico en plaquetas en el tratamiento de úlceras cutáneas de extremidades inferiores. se alcanzó una cierre total en el 65% de las lesiones tratadas en una media de 7 semanas, con un promedio de dos aplicaciones por paciente.

Estos resultados se repiten en las heridas postquirúrgicas, ya que al analizar los resultados obtenidos en el tercer ensayo clínico incluido en esta tesis y realizado en pacientes tratados quirúrgicamente del seno pilonidal, la mediana de tiempo de cicatrización en los pacientes tratados de sinus pilonidal fue de 46 días en el grupo experimental frente a los 70 días del grupo control ( $p < 0,001$ ), observándose asimismo que el tiempo de vuelta a la actividad laboral habitual de los pacientes incluidos en el grupo experimental son también significativamente inferiores a los registrados en el grupo control.

Esta mejoría en el tiempo hasta el cierre de la herida postquirúrgica en el seno pilonidal atribuida al plasma rico en plaquetas se observa también en el estudio publicado por Spiridakis en 2009 en los que se estudió la evolución de 52 pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico de sinus pilonidal, 30 de los cuales recibieron tratamiento adicional con plasma rico en plaquetas frente PRP frente a 20 tratados mediante excisión seguida de cura pos segunda intención.

El tiempo de cicatrización de los pacientes incluidos en el grupo experimental fue de 24 días, siendo superior a los 30 días en los pacientes asignados al grupo control, siendo la mediana del tiempo de retorno al trabajo de 25 vs 37 días a favor del grupo experimental.

### **Evolución del área**

Al observar la evolución de la superficie recuperada en los ensayos clínicos en los que se ha analizado esta variable, se puede observar la superioridad del tratamiento experimental sobre el control.

Esta superioridad coincide con los resultados publicados por Steed y colaboradores, en 1992, donde el porcentaje de superficie recuperada en el grupo experimental a las 20 semanas fue del 94% frente al 73% del grupo control.

La diferencia encontrada en el porcentaje de superficie recuperada respecto al tratamiento control también se vio en un ensayo clínico diseñado para evaluar la eficacia de un plasma rico en plaquetas de origen autólogo en el tratamiento de úlceras de presión publicado por Aminian y colaboradores en 1999. En este ensayo clínico terapéutico aleatorizado, en grupos paralelos, doble ciego y controlado con placebo se analizó la evolución de un total de 20 úlceras por decúbito, correspondientes a 15 pacientes que fueron asignadas de forma aleatoria a dos grupos de tratamiento. A las dos semanas de seguimiento, en el grupo del tratamiento, cuatro lesiones habían cicatrizado por completo y en otros dos casos se había producido una reducción significativa del área de la lesión.

El mismo autor ya había publicado en 1995 resultados de un estudio con el objeto de evaluar la eficacia de la aplicación tópica de factores de crecimiento de origen plaquetario obtenidos del plasma del propio paciente en la reparación activa de heridas crónicas en pacientes diabéticos en los que al final del estudio, 4 pacientes asignados al grupo experimental habían completado la curación de la úlcera, alcanzándose una significativa reducción en

el tamaño de la lesión en el resto de las heridas incluidas en este grupo de tratamiento.

### **Dolor postoperatorio**

Los resultados obtenidos en el tercer ensayo clínico (artículo 4) respecto al dolor postoperatorio muestran una diferencia de 3 puntos en la escala analógica visual a favor del grupo de tratamiento experimental en la primera semana de tratamiento y de dos puntos transcurrido un mes lo que viene a confirmar los resultados del estudio publicado por Bahar MM y colaboradores en 2013 en los que los datos de dolor postquirúrgico en el grupo tratado con PRP son significativamente inferiores a los obtenidos por el tratamiento convencional a la semana y el mes de la intervención quirúrgica.

Respecto a esta variable llama la atención el hecho de que en nuestro estudio el grado dolor registrado en el grupo tratado con PRGF es significativamente inferior al obtenido en el grupo control ya desde el primer día postcirugía, lo que facilitaría una rápida recuperación clínica que se acompañaría de una temprana vuelta a la actividad habitual.

### **Resultados de seguridad**

Durante el transcurso de los ensayos clínicos realizados se han registrado un total de 9 acontecimientos adversos, dos en pacientes tratados mediante PRGF y los otros 7 en pacientes tratados mediante método convencional, siendo la sobreinfección del lecho ulceroso el acontecimiento adverso más frecuente en los pacientes con heridas crónicas. Dos pacientes con heridas quirúrgicas asignados al tratamiento convencional precisaron una reintervención debido a una hemorragia postoperatoria, frente a ninguno de los pacientes tratados con PRGF. El hecho de únicamente requirieran reintervención por hemorragia pacientes asignados al grupo control podría explicarse por las propiedades hemostáticas de la matriz de fibrina.

Todas las lesiones que presentaron sobreinfección del lecho de la úlcera fueron tratadas mediante desbridamiento quirúrgico de las mismas y antibioterapia oral, evolucionando los pacientes de manera favorable, presentando cultivos negativos a los 15 días de instaurado el tratamiento, alcanzándose la cicatrización completa trascurridos entre dos y cuatro meses desde la infección.

La práctica ausencia de acontecimientos adversos registrada durante los periodos experimentales, y el hecho de que hasta un 75% de los mismos se hayan producido en el grupo control, nos induce a pensar en que el PRGF constituye un tratamiento seguro.

Para finalizar podemos afirmar que los resultados de seguridad obtenidos en los tres ensayos clínicos incluidos en la presente tesis coinciden con todo lo mencionado en la literatura respecto a la utilización de plasma rico en factores de crecimiento en otras especialidades médicas como es el caso de la cirugía oral y ortopédica campos en los que existe una amplia causística sin

## Discusión

---

que se hayan descrito hasta el momento la aparición de reacciones adversas graves secundarias a la aplicación de PRGF [Sanchez, 2003; Anitua,2008; Anitua, 2011].

### ***Limitaciones de los estudios***

A pesar de la teórica robustez del diseño escogido, al analizar los resultados de los ensayos clínicos enfocados a valorar la eficacia del PRGF las heridas crónicas incluidos en los artículos 1 y 3, se ha evidenciado la existencia de una serie de factores que han podido limitar las diferencias encontradas entre los grupos de tratamiento para las distintas variables de eficacia.

Entre estas limitaciones ha destacado el tamaño muestral, el tiempo de seguimiento de las lesiones y la dificultad en el reclutamiento de los pacientes.

Respecto al tamaño muestral de los ensayos clínicos incluidos en esta memoria, la estimación del número de pacientes incluidos, pese a ser acorde al recogido en la mayoría de los ensayos clínicos diseñados para valorar la eficacia de los distintos PRPs [Aminian B, 1999; Senet P, 2003; O'Connell SM, 2008; Cervelli V, 2009], constituyó una principales limitaciones de este trabajo, ya que se registró una gran variabilidad interpersonal respecto a la respuesta del tratamiento (sobre todo en el grupo asignado a control) lo que afectó a la potencia estadística de los resultados.

Dicho de otro modo, a pesar de las importantes diferencias en los valores medios obtenidos para todas las variables entre los tratamientos objeto de estudio, la importante desviación estándar registrada en el grupo control hace que en determinadas variables como el número de úlceras totalmente cerradas no se alcanzara la significación estadística al comparar ambos grupos de tratamiento al final del periodo de seguimiento.

Para minimizar este problema del tamaño muestral se llevó a cabo un análisis de la evolución de cada una de las variables de evolución a lo largo de las distintas visitas de seguimiento para

cada grupo experimental, habiéndose observado que aquellas heridas tratadas mediante PRGF mejoraban significativamente para todas las variables de eficacia, fenómeno que no ocurrió en el grupo asignado a tratamiento convencional.

Otras de las limitaciones impuestas por el ajustado cálculo del tamaño muestral fue el hecho de que a pesar de que las variables utilizadas en la evaluación de la evolución de las lesiones fueron cuantitativas y objetivas, la asignación aleatoria de los pacientes a los distintos grupos de tratamiento no consiguió balancear los grupos de tratamiento respecto a las características basales de los pacientes, resultando que en el grupo tratado mediante PRGF las lesiones resultaron significativamente más antiguas que las sometidas a tratamiento convencional.

Otro factor, que probablemente haya podido derivar del tamaño muestral ha sido la existencia de diferencias significativas entre los grupos de tratamiento respecto a la duración de las lesiones en el momento de la visita basal del segundo ensayo clínico.

El mecanismo por el que la antigüedad de las lesiones influye en un posible retraso de la cicatrización puede deberse a la acumulación en el lecho de la herida una población de fibroblastos senescentes incapaz de reproducirse [Harding KG, 2005; Henderson EA, 2006].

Si tenemos en cuenta que la antigüedad de las heridas constituye junto a otros elementos como el área lesional o la presencia de fibrina en más del 50% de la herida un factor relacionado con el retraso en la cicatrización de las heridas [Margolis EJ, 1999], el hecho de que las heridas asignadas al grupo tratado mediante PRGF tuvieran una duración previa significativamente superior a aquellas asignadas al grupo control constituía un importante

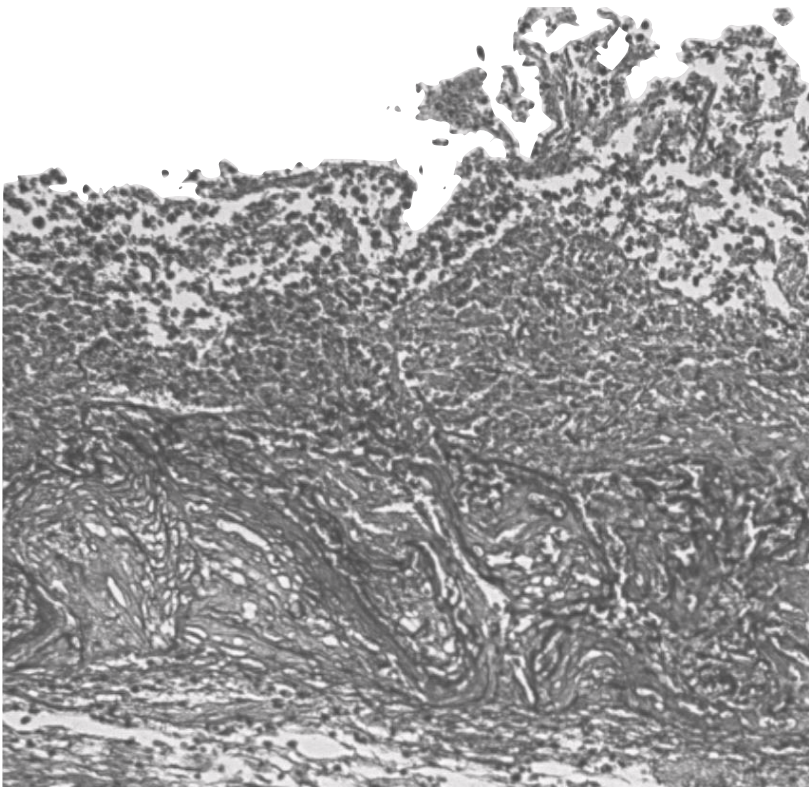
sesgo a la hora de interpretar los resultados, por lo que se decidió realizar un análisis ajustado por dicha variable.

Otro posible factor que ha podido influir en las diferencias detectadas entre ambos grupos de tratamiento ha sido la duración de periodo de seguimiento de 8 semanas, que aunque se ajustaba a los seguimientos medios de la mayoría de los artículos publicados en la bibliografía [Aminian, 1995; Senet, 2003; O'Connell, 2008; Cervelli, 2009], se ha demostrado escaso para poder valorar el tiempo de cicatrización (estimado en 11 semanas para el grupo tratado mediante PRGF y 16 semanas para las heridas asignadas a tratamiento convencional).

Sin embargo, este intervalo de tiempo fue suficiente para establecer diferencias entre ambos grupos de tratamiento respecto al porcentaje de superficie recuperada.



## Conclusiones





### Conclusiones

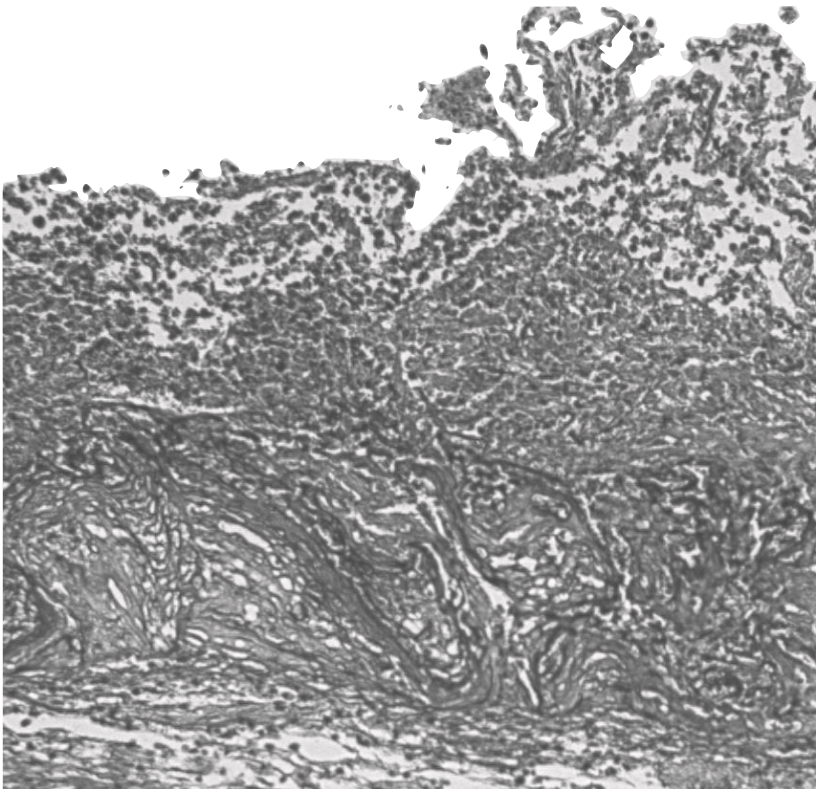
Los resultados obtenidos en los diferentes estudios experimentales incluidos en la presente tesis y dirigidos a estudiar el grado de eficacia y seguridad del PRGF en el tratamiento de heridas cutáneas nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- La aplicación de PRGF ha mostrado superioridad significativa en eficacia y seguridad respecto al tratamiento convencional en el tratamiento de heridas cutáneas crónicas . (Artículo 1)
- El estudio de caracterización realizado pone de manifiesto que el sistema de obtención del PRGF constituye un método reproducible y eficaz para obtener un concentrado de plaquetas libre de leucocitos a partir de pequeñas cantidades de sangre que se puede adaptar a las necesidades clínicas (Artículo 1).
- El PRGF ha demostrado actividad antimicrobiana eficaz ante las cepas más frecuentes de *estafilococos aureus* y *epidermis* incluyendo cepas *meticilin* resistentes. (Artículo 2).
- La aplicación de PRGF ha mostrado una eficacia superior al tratamiento convencional tanto en la curación de úlceras de origen venoso, como en el tiempo de cicatrización, manteniendo idéntico perfil de seguridad (Artículo 3)
- En el tratamiento de heridas postquirúrgicas en pacientes con sinus pilonidal la aplicación de PRGF ha mostrado tiempos de curación y vuelta a la actividad significativamente inferiores al tratamiento quirúrgico convencional, disminuyendo el dolor postquirúrgico con un alto perfil de seguridad (Artículo 4).



---

## Bibliografia





## Bibliografía

---

Achkasov EE, Ul'ianov AA, Bezuglov EN. The use of autoplasm rich in platelet growth factors (APRPGF) on results of treatment of patients with pilonidal sinus abscess. *Khirurgiia (Mosk)*. 2013; (12):43-7.

Agren MS, Eaglstein WH, Ferguson MWJ, Harding KG, Moore K, Saarialho-Kere UK, Schultz GS. Causes and effects of the chronic inflammation in venous leg ulcers. *Acta Dermato-Veneorológica*. Supl 2000; 210:3-17.

AL-Khamis A, McCallum I, King PM, Bruce J. Healing by primary versus secondary intention after surgical treatment for pilonidal sinus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2010, Issue 1.

Alvarez Fernandez LJ, Lozano F, Marinelo\_roura J, Masegosa-Medina JA. Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa crónica en España: estudio DETECT-IVC 2006. *Angiología*. 2008; 60(1):27-36.

Aminian B., et al. The role of the autologous platelet-derived growth factor in the management of decubitus ulcer. *Archives of Iranian Medicine*. 1999;2.

Aminian B., et al. Topical Autologous Platelet-Derived Growth Factors in the Treatment of Chronic Diabetic Ulcers, Department of Internal Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF) against *Staphylococcus aureus* and epidermidis strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012.

## Bibliografía

---

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets, as a source of proteins for healings of tissue regeneration, Thrombosis and Haemostasis. 2004; 91:4-15.

Anitua E, Andia I, Sanchez M. PRGF Plasma Rico en Factores de Crecimiento. Dental Dialogue. 2004; 2:2-15.

Anitua E, Andía I. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Ed Eduardo Anitua. Puesta al día Publicaciones. Vitoria. 2000.

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications from plaquetelets rich fibrin therapies. Trends in Biotechnology .2006; 5:227- 234

Anitua E, Sanchez M, Sarabia R, Sanz J, Aguirre JJ, Orive G. Eficacia y seguridad del PRGF (Plasma Rico en factores de Crecimiento) en la regeneración cutánea facial. Ensayo clínico randomizado y controlado con ácido hialurónico. Revista AACP. 2011; 2:23-33.

Anitua E. Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants. The International Journal fo Oral & Maxillofacial Implants. 1999; 14: 529-35.

Anitua E. Sanchez M. Nurden AT. Zalduendo M. de la Fuente M. Azofra J. Andia I. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. Plastic and Reconstructive Surgery. 2007; 119(3):950-9

Anitua E. Un enfoque biológico de la implantología. 1ª edición pág. 57-65. Team Work Media España Ediciones. 2008.



## Bibliografía

---

Anitua E. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). 1ª Edición, pág. 51-145. Vitoria, España. Puesta al día Publicaciones,2000.

Anitua E, Sánchez M, Aguirre JJ, Prado R, Padilla S, Orive G. Efficacy and safety of plasma rich in growth factors intra-articular infiltrations in the treatment of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2014;30(8):1006-17.

Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*. 2015; 30;10(3).

Appel TR, Potzsch B, Muller J, von Lindern JJ, Berge SJ, Reich RH. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. [Journal Article] *Clinical Oral Implants Research*. 2002. 13(5):522-8.

August PD. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE). 2006;0:0–71.

Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell and Tissue Research*. 2003; 314:157–166

Ballester JF, Sola J, Borrás J, Ferreira J, Morales D, Arnas MM, Molines JR, Alvarez A. Estudio comparativo de cuatro procedimientos para la obtención del coágulo de concentrado de plaquetas. *Revista Española Odontostomatológica de implantes*. 2003;11(1):6-13.

## Bibliografía

---

Barbeito CG, Lambe PF. Factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta veterinaria*. 2005; 25 (1): 8-27

Baum C, Prpey C. Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with cellular and Molecular Events. *Dermatologic Surgery*. 2005; 31:674-86

Beca T, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Avances en Periodontología e Implantología*. 2007; 19, 1: 39-52.

Benavides J,. Reparación de heridas cutáneas. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología*. 2008; 16(1):29-35.

Benglis D. Wang MY. Levi AD. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery*. 2008; 62(5 Suppl 2): 423-431.

Bennet SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *British Journal of Surgery*. 2003; 90:133-146

Berlanga J, Fernández JI, López E, López PA, del Río A, Valenzuela C, Baldomero J, Muzio V, Raíces M, Silva R, Acevedo BE, Herrera L. Heberprot-P: a novel product for treating advanced diabetic foot ulcer. *MEDICC Reviews*. 2013 Jan;15(1):11-5.

Bielsa I. Proceso de cicatrización de las heridas. *Piel*. 2006; 21(4): 207-12.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological rol of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews*. 1997; 18:26-45.

## Bibliografía

---

Bjorklund A. Rosenblad C. Winkler C. Kirik D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. 1997; 4(3-4):186-200.

Blakytyn R. Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine*. 2006; 23(6): 594-608.

Bonacho EC. Duración de la Incapacidad Temporal asociadas a diferentes patologías en trabajadores españoles 2009 [[www.seg-social.es/prdi00/groups/public/documents/binario/146667.pdf](http://www.seg-social.es/prdi00/groups/public/documents/binario/146667.pdf)].

Brasel KJ, Gottesman L, Vasilevsky CA. Meta-analysis comparing healing by primary closure and open healing after surgery for pilonidal sinus. *Journal of the American College of Surgeons*. 2010; 211(3):431-434.

Brem H, Maggi J, Nierman D, Rolnitzky L, Bell D, Rennert R, et al. High cost of stage IV pressure ulcers. *The American Journal of Surgery*. 2010; 200(4): 473-477.

Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006; 117 (Suppl): 12s-34s.

Brunner R.B. Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thrombosis and Haemostasis*. 2004; 92:253-61.

C. Betsholtz *et al.*, Developmental roles of platelet-derived growth factors. *BioEssays*. 2001;**23**: 494–507.

## Bibliografía

---

Callam MJ, Harper DR, Dale JJ, Ruckley CV. Chronic ulcer of the leg: clinical history. *BMJ* 1987; 294: 1389-1391.

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. Epub 2011 Sep 15.

Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. Regenerative Surgery: Use of Fat Grafting Combined with Platelet-Rich Plasma for Chronic Lower-Extremity Ulcers. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2009; 33:340–345.

Chaparro M, Alvarez F, Novo E. Úlceras vasculares y por decúbito. Un gran problema de salud pública. Revisión epidemiológico-histórica. *Semergen*. 2003; 29(9):485-91.

Chaput CD, Patel KV, Brindley GW, Roux MA, Hu N, Dmitrev A, Cunningham B. Influence of platelet concentrate on prosthetic bone ingrowth in a rabbit model. *Journal of Surgical Orthopaedic Advances*. 2007

Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )? *British Journal of Plastic Surgery*. 2004; 57(3): 215-221.

Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of Biological Chemistry*. 1962; 237: 1555-62.

Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ. Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005; 23:84-92.

Danielsen P, Jorgensen B, Kalsmark t et cols. Effect of Topical Autologous Platelet-Rich Fibrin versus No Intervention on

## Bibliografía

---

Epithelialization of Donor Sites and Meshed Split-Thickness Skin Autografts: A Randomized Clinical Trial. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2008; 122: 1431.

DeLong JM, Russell RP, Mazorca AD. Platelet-Rich Plasma: The PAW Classification System. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. 2012; 28(7): 998-1009.

De Potter CR, Schelfhout AM. The neu-protein and breast cancer. *Virchows Archiv*. 1995; 426(2):107-15.

Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S, Weinstein R. Is platelet concentrate advantageous for the surgical treatment of periodontal diseases? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* 2011;82(8):1100-11.

Di Michele M, Van Geet C, Freson K. Recent advances in platelet proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 2012;9(4):451-66.

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 in Biotechnology*. 2009;27:158-167.

Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002;31:615-9.

Dunn IF, Heese O, Black PM. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *Journal of Neuro-Oncology*. 2000; 50(1-2):121-37.

## Bibliografía

---

Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S. A modified method for preparing platelet rich plasma: An experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004;62:1403-7.

El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet rich plasma: growth factors and pro and anti-inflammatory properties. *Journal of Periodontology*. 2007;78:661-9.

Embil JM, Papp K, Sibbald G, Tousignant J, Smiell JM, Wong B, Lau CY. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becclapermin) for healing chronic lower extremity diabetic ulcers: an open-label clinical evaluation of efficacy. *Wound Repair Regeneration*. 2000;8(3):162-8.

Emparanza JL, Aranegui P, Ruiz M *et al*. A simple Severity index for pressure ulcers. *Journal of Wound Care*. 2000; 9 (2): 86-90.

Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M. Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2006; 118:147e-59e.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2004;114(6):1502-8.

Escotto I, Rodriguez JM, Padilla L, Rodriguez N. Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras en pacientes diabéticos. Mitos y realidades. *Revista Mexicana de Angiología*. 2001; 29(3): 75-82.

## Bibliografía

---

Ezzat VA, Duncan ER, Wheatcroft SB, Kearney MT. The role of IGF-I and its binding proteins in the development of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*. 2008; 10(3):198-211.

Faglin P, Guerreschi P. Supuraciones crónicas: quiste pilonidal. *EMC - Cirugía Plástica Reparadora y Estética*. 2015;23(15):1–11.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*. 2004; 25(4):581-611.

Frystyk J. Utility of free IGF-I measurements. *Pituitary*. 2007; 10(2):181-7.

Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *Journal of Controlled Release*. 2014; 10; 185: 51-61

Galvez-Gastelum FJ, Sandoval\_Rodriguez AS, Ardendariz-Borunda J. El factor de crecimiento transformante b como blanco terapéutico. *Salud Pública de México*. 2004; 46(4): 341-350

García GA, Cobos C, Rey CA, Tovar J, Casariego CA, Clavijo D, García A, Mejía AR, Hernández S, Báez SA. Biología, patobiología, bioclínica y farmacoterapéutica del factor de crecimiento epitelial (EGF) y el estrés celular en la especie humana. *Universitas Médica*. 2006; 47(3): 258-76.

George JN. Platelets. *Lancet*. 2000; 29 (335):1531-1539.

## Bibliografía

---

Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology-Hematology*. 2000; 34(3):185-94,

Gesto-Castromil R, Grupo DETECT-IVC, García JJ. Encuesta epidemiológica realizada en España sobre la prevalencia asistencial de la insuficiencia venosa crónica en atención primaria. *Estudio DETECT-IVC. Angiología*. 2001; 53(4):249-260.

Gianchandani EP, Brautigan DL, Papin JA. Systems analyses characterize integrated functions of biochemical networks. *Trends in Biochemical Sciences*. 2006; 31: 284-91.

Ghoul MS, Poskitt KR. Chronic ulceration of the leg. *Surgery (Oxford)*. 2010; 28 (6) :273–276.

Gonzales-Calvar SI, Salcedo JL, Martinez-Mangini MÁ. Últimos avances en el diagnóstico de la hiperplasia benigna de próstata. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005; 39(2):171-185.

Graham ID, Harrison MB, Nelson EA, Lorimer K, Fisher A. Prevalence of Lower-Limb Ulceration: A systematic review of Prevalence Studies. *Advances in Skin & Wound Care*. 2003; 16(6):305-316.

Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabrielle M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research*. 2006; 17(2):219-219.

Grupo Nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión (GNEAUPP). Directrices generales sobre el tratamiento de las úlceras por presión. Arnedillo 1998.



## Bibliografía

---

Grupo Nacional para el estudio y asesoramiento en úlceras por presión (GNEAUPP). Clasificación-Estadiaje de las úlceras por presión. Gerokomos-Helcos .1997;7 (22):III.

Harding KG, Morris HL, Patel GK. Healing chronic wounds. British Medical Journal. 2002; 324(19): 160-163.

Hill DJ. Growth factors and their cellular actions. Journal of Reproduction and Fertility. 1989; 85:723-734.

Hoch R, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. Development. 2003; 130:4769-84

ICO, Modalidades LYSUS. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas. 2013;1-5.

Kallianinen LK, Hirshberg J, Marchant B, Rees RS. Role of platelet-derived growth factor as an adjuvant to surgery in the management of pressure ulcers. Plastic and Reconstructive Surgery.2000;106(6):1243-8.

Kerstein M, Gemmen E, van Rijswijk L, et al. Cost and cost effectiveness of venous and pressure ulcer protocols of care. Disease Management & Health Outcomes. 2001; 9(11): 651-63.

Keyv SV, Jacobson MS Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. The Journal of Extracorporeal Technology. 2004 Mar;36(1):28-35.

Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: Structural and biological properties. Progress in Growth Factor Research 1989; 1:207-235.

## Bibliografía

---

Knighton DR, Ciresi K, Fiegel VD, Schumerth S, Butler E, Cerra F. Stimulation of repair in chronic, nonhealing cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surgery Gynecology & Obstetrics*. 1990; 170(1):56-90.

Knighton DR, Fiegel VD, Austin II, Ciresi KF, Butler el. Classification and treatment of chronic non-healing wounds. *Annals of Surgery* .1986; 204: 322-30.

Kowanetz M. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(17):5018-22.

Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell. *Patología humana*. 9 ed. Ed. Elsevier; 2013.

Kushida S, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Ogawa T, Mitsui T, Kusumoto K. Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems. *The International Journal of Artificial Organs*. 2014;17(2):186-92.

Lacci KM, Alan Dardik A. Platelet-Rich Plasma: Support for Its Use in Wound Healing. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2010; 83 :1-9.

Landi F, Luigi A, Russo A, Cesari M, Onder G, Bonini S, Carbonin PU, Bernabei R. Topical treatment of Pressure Ulcers with Nerve Growth Factor. A randomized clinical trial. *Annals of Internal Medicine*. 2003; 139:635-641.

## Bibliografía

---

Laron Z. The essential role of IGF-I: lessons from the long-term study and treatment of children and adults with Laron syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999; 84(12): 4397-404

Laurens K, Koolwijk P, De maat M. Fibrin structure and wound healing. *J Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 4:932-9.

Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007; 25: 9-18.

Luces G, Garcia LA. Uso del Plasma Rico en Plaquetas para la Regeneración Tisular en la Terapia Periodontal. Universidad Central de Venezuela. Tesis Monográfica., 2006.

Maklebust J, Rodeheaver G, Bartolucci A *et al*. Pressure Ulcer Scale for Healing: Derivation and Validation of the PUSH Tool. *Advances in Wound Care*. 1997; 10 (5): 96-101.

Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad MA, Malay S Berlin JA. Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 2005;13:531-536.

Mariani S. Basciani S. Arizzi M. Spera G. Gnessi L. PDGF and the testis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2002; 13(1):11-7,

Martel-Pelletier J. Di Battista JA. Lajeunesse D. Pelletier JP. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflammation Research*. 1998; 47(3):90-100.

## Bibliografía

---

Martí-Mestre, M. Acosta-Gómez, A. Bonell-Pascual, P. Linares-Ruiz, A. Romera, C. Yñíguez-Navas, O. Lapiedra-Mur. Resultados preliminares de la aplicación de factores de crecimiento en el tratamiento de las úlceras vasculares. *Angiología*. 2005; 57 (4): 335-343.

Martínez JM, Cano J, Gonzalo JC, Campo J, Esparza GC, Seoane JM. ¿Existen riesgos al utilizar los concentrados de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) de uso ambulatorio? *Med Oral*. 2002;7:375-390.

Martinez Zapata MJ, Martin-Carvajal A, Sola I, Bolivar I, Exposito JA, Rodriguez L, García J. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 2009. 49(1):44-56

Marx RE, Carlson ER, Eichataedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet rich plasma. Growth Factor Enhancement for Bone Grafts. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*. 1998; 85: 638-46.

Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry*. 2001;10(4):225-8.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004; 62(4):489-96.

Matras H. Fibrin seal: the state of the art. [Journal Article] *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* .1985; 43(8):605-11.

Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Bradley JP, Arciero RA, Beitzel K. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2012;94(4):308-16.

## Bibliografía

---

Mazzucco L, Medici D, Serra M, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion*. 2004; 44:1013-1018.

Meana-Infiesta A, Llamas S. Tratamientos futuros de las úlceras cutáneas crónicas. *Angiología*. 2003; 55(3): 288-290.

Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2008; 22(6):432-8.

Memon MA. Anway MD. Covert TR. Uzumcu M. Skinner MK. Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Molecular & Cellular Endocrinology*. 2008;294(1-2): 70-80.

Michel D, Harmand MF. Fibrin seal in wound healing: Effect of thrombin and [Ca<sup>2+</sup>] on human skin fibroblast growth and collagen production. *Journal of Dermatological Science*.1990;1(5): 325-333 .

Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *The American Journal of Sports Medicine*. 2006;34(11):1774-8.

Mosseson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3:1984-1904.

## Bibliografía

---

Nonoshita LD, Wathen NC, Dsupin BA, Chard T, Giudice LC. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins (IGFBPs), and proteolyzed IGFBP-3 in embryonic cavities in early human pregnancy: their potential relevance to maternal-embryonic and fetal interactions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1994;79(5):1249-1255.

NPUAP Position Statement on Reverse Staging: The Facts about Reverse Staging in 2000.

O'Connell SM, Impeduglia T, Hessler K, Wang XJ, Carroll RJ, Dardik H. Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. *Wound Repair and Regeneration* 2008;16:49–756

Palfreyman SJ, Nelson EA, Lochiel R, Michaels JA. Apósitos para la cicatrización de las úlceras venosas de la pierna *The Cochrane Library*, 2008 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).

Pancorbo-Hidalgo PL,. Epidemiología de las úlceras por presión en España en 2013: 4.º Estudio Nacional de Prevalencia. *Gerokomos* [online]. 2014, vol.25, n.4, pp. 162-170.

Phillips CJ, Humphreys I, Fletcher J, Harding K, Chamberlain G, Macey S. Estimating the costs associated with the management of patients with chronic wounds using linked routine data. *International Wound Journal*. 2015;1–5

Phillips TJ, Dover JS. Leg ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1991; 25: 965-87.

Pierce G, Mustoe T, Altrock B. Role of Platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1991; 45:319.

## Bibliografía

---

Pina E, Furtado K, Franks PJ, Moffatt CJ. Leg ulceration in Portugal: Prevalence and Clinical History. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2005;29:549-53.

Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and cancer risk. *European Journal of Cancer*. 2000; 36(19):1224-28

Posnett J, Franks PJ. The costs of skin breakdown and ulceration in the UK. In: Pownall M (ed). *Skin Breakdown – The silent epidemic*. Hull: The Smith and Nephew Foundation, 2007.

Prigent SA, Lemoine NR. The type1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Progress in Growth Research* 1992. 4:1-24.

Rajaram S, Baylink J, Mohan S. Insulin-Like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocrine Review*.1997; 18(6): 801- 831

Ratliff CR, Rodeheaver GT. Use of the PUSH tool to measure venous ulcer healing. *Ostomy Wound Management*. 2005; 51 (5): 58-60, 62-3.

Restrepo-Medrano Juan Carlos, Verdú José. Medida de la cicatrización en úlceras por presión: ¿Con qué contamos?. *Gerokomos*. 2011; 22(1): 35-42.

Riboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, Fortier L, Cole BJ. Effect of Leukocyte Concentration on the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *The American Journal of Sports Medicine*. 2015 Apr 29.

## Bibliografía

---

Rodríguez Flores J, Palomar Gallego MA, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial . 2012 ; 34(1): 8-17.

Rodríguez-medina U, Medina-murillo GR, Rodríguez-wong U. Enfermedad pilonidal : tratamiento mediante colgajos cutáneos. Revista del Hospital Juarez de México. 2014; 81(4): 220-225.

Rodriguez-Piñero M. Epidemiología, repercusión sociosanitaria y etiopatogenia de las úlceras vasculares. Angiología. 2003; 55(3): 256-263.

Romagnani P. CXC chemokines : the regulatory link between inflammation and angiogenesis. Trends in Immunology. 2004; 25: 201-209.

Roukis TS, Zgonis T, Tiernan B. Autologous Platelet–Rich Plasma for wound and Osseous Healing: A Review of the Literature and Commercially Available Products. Advances in Therapy. 2006; 23(2):218-237.

Rueda J, Torra JE, Martinez F, Verdu J, Soldevilla JJ, Roche E, Arboix M. Primer estudio nacional de prevalencia de úlceras de pierna en España: estudio GNAUPP-UIFC-Smith&Nephew 2002-2003. Epidemiología de las úlceras venosas, arteriales, mixtas y de pie diabético. Gerokomos. 2004; 4:230-247.

Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. Nature Medicine. 2002; 8:1227-1134.

Sanada H, Moriguchi T, Miyachi Y *et al.* Reliability and validity of DESIGN, a tool that classifies pressure ulcer severity and monitors healing. Journal of Wound Care. 2004; 13: 1



## Bibliografía

---

Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *The American Journal of Sports Medicine*. 2007; 35:245-251.

Sanchez M, Azofra J, Aizpurua B, Elorriaga R, Anitua E, Andia I. Use of autologous plasma rich in growth factors in Arthroscopic surgery. *Cuadernos de Artroscopia*. 2003; 10:12-19

Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I. Plasma Rich in Growth Factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2003; 35(10):1648-1652.

Sarvajnamurthy S, Suryanarayan S, Budamakuntala L, Suresh DH. Autologous Platelet Rich Plasma in Chronic Venous Ulcers: Study of 17 Cases. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*. 2013;6(2):97-99.

Schnabel, LV, Mohammed, HO, Miller, BJ, McDermott, WG, Jacobson, MS, Santangelo, KS, Fortier, LA Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research* 2007; 25: 230-240.

Senet P, Bon FX, Benbunan M, Bussel A, Traineau R, Calvof, et al. Randomised trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. *Journal of Vascular Surgery*. 2003; 38: 1342-8.

Shackelford DP, Fackler E, Hoffman MK, Atkinson S. Use of topical recombinant human platelet-derived growth factor BB in abdominal wound separation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2002;186(4):701-4.

Sitaras NM, Sariban E, Pantazis P, Zetter B, Antoniades HN. Human iliac artery endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. *Journal of Cellular Physiology*. 1987; 132(2):376-80.

Soldevilla JJ, Torra JE, Posnett J et al. Una aproximación al impacto del coste económico del tratamiento de las úlceras por presión en España. *Gerokomos*. 2007; 18(4): 43-52.

Soldevilla, JJ, Torra JE, Verdú J, Martínez F, López P, Rueda P, Mayán JM. 2º estudio nacional de prevalencia de úlceras por presión en España, 2005. Epidemiología y variables definitorias de las lesiones y los pacientes. *Gerokomos*. 2006; 17(3): 154-172.

Sporn MB. TGF-beta: 20 years and counting. [Historical Article. Journal Article] *Microbes & Infection*. 1999; 1(15):1251-3.

Stacey MC, Mata SD, Trengove NJ, Mather CA. Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2000; 20: 296-301.

Steed DL, Goslen JB, Holloway GA, Malone JM, Bunt TJ, Webster MW. Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers. CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo. *Diabetes Care* 1992; 15(11):1598-604.

Taylor RJ. Mouseeyes revisited: upgrading a computer program that aids wound measurement. *Journal of Wound Care* 2002;11(6) 213-6.

Tenvall GR, Hjelmgren J. Annual costs of treatment for venous leg ulcers in Sweden and the United Kingdom. *Wound Repair and Regeneration*. 2005; 13: 13-18.

Thomas DR, Rodeheaver GT, Bartolucci AA. Et al. Pressure ulcer scale for healing: Derivation and validation of the PUSH tool. *Advances in Wound Care*. 1997; 10(5): 96-101

Torra JE, Arboix M, Rueda J, Soldevilla JJ, Martínez F. El proceso de cicatrización en las heridas crónicas. En: Soldevilla JJ, Torra JE (eds). *Atención Integral de las Heridas Crónicas*, 1ª Ed. Madrid:SPA 2004; 31-45.

Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair & Regeneration*. 1996; 4(2):234-239.

Tsang MW, Wong WK et al. Human Epidermal Growth Factor Enhances Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care*. 2003; 26:1856-1861.

Tsay RC, Vo J, Burke A, Eisig SB, Lu HH, Landesberg R. Differential growth factor retention by platelet rich plasma composites. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2005; 63:521-8.

Van-Rijswijk L. Multi-center leg ulcer study group. Full-thickness leg ulcers: patient demographics and predictors of healing. *The Journal of Family Practice*. 1993; 36 (6): 625-32.

Verdú J, Nolasco A, García C. Análisis y evolución de la mortalidad por úlceras por presión en España. *Gerokomos*. 2003; 14(4): 212-226

Vowden KR, Vowden P. Preventing venous ulcer recurrence: a review. *International Wound Journal*. 2006; 3:11-21.

Weibrich G et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma rich in growth factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005; 20: 118-123.

Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on periimplant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34:665–671.

Weibrich G, Kleis WK. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clinical Oral Implants Research*. 2002;13:437-43.

Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G. The Harvest Smart PRPePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit Comparison of a semiautomatic method with a more complex method for the preparation of platelet concentrates. *Clinical Oral Implant Research*. 2003; 14: 233-239.

Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., Hitzler, WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004; 34: 665-671.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological Reviews*. 2003; 83:835-870.

Whitman DH, Berry RL, Green DM. An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1997; 55: 1294

Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. *Diabetes Care*. 1998; (5): 822-827.

Wouters MA, Rigoutsos I, Chu CK et al. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Science*. 2005; 14: 1091-103.

Xakellis G, Frantz RA. Pressure ulcer healing. What is it? What influences it? How is it measured? *Advances in Wound Care*. 1997; 10(5): 20-26

Xian Lj, Chowdhury S, Saim Ab, Ruszymah Bt Hj Idrus. Concentration-Dependent Effect Of Platelet-Rich Plasma On Keratinocyte And FiBroblast Wound Healing. *Cytotherapy*. 2015; 17: 293-300

Zimmermann R, Jackubietz R, Jackubietz M, y cols. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*. 2001; 41:11217-24.

