

**Plasma rico en plaquetas (PRP): ¿Es una herramienta terapéutica en diferentes situaciones clínicas?**

**Platelet-rich plasma (PRP): Is it a useful therapeutic tool in different clinical situations?**

**PRP: Fundamento de su mecanismo de acción.**

**PRP: Basis of its mechanism of action.**

**Etulain J**

*Investigadora Asistente CONICET, Laboratorio Trombosis Experimental, Instituto de Medicina Experimental-CONICET/Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.*

juliaetulain@hotmail.com / jetulain@hematologia.anm.edu.ar



**DEBATE**

HEMATOLOGÍA  
Volumen 20 • Número Extraordinario  
XII Congreso del Grupo CAHT: 91-103  
Septiembre 2016

**Palabras clave:** angiogénesis,  
plasma rico en plaquetas,  
medicina regenerativa.

**Keywords:** angiogenesis,  
platelet rich plasma,  
regenerative medicine.

Las plaquetas, además de ser elementos claves en la hemostasia y la trombosis, también juegan un rol activo en la regeneración de tejidos a través de la liberación de diversos factores de crecimiento y citoquinas que modulan la angiogénesis, el remodelado de la matriz extracelular y el reclutamiento, proliferación y diferenciación de células madre. Basándose en este fundamento, los derivados de plasma rico en plaquetas (PRP) son empleados en medicina regenerativa para el tratamiento de diversas condiciones clínicas incluyendo reparación de úlceras y tejido muscular, tratamiento de enfermedades óseas y recuperación tisular luego de intervenciones quirúrgicas.

Las ventajas de la administración de PRP están asociadas a un método de obtención económico, rápi-

do y simple. Además, debido a características asociadas a su origen principalmente autólogo y a sus técnicas de obtención inocuas, los posibles riesgos infecciosos o de rechazo asociados al tratamiento con PRP son mínimos. Por estas razones, los hemoderivados enriquecidos en plaquetas han cobrado gran relevancia en la última década, y conforman un creciente objeto de estudio experimental y clínico en el contexto de la curación de heridas.

En esta revisión se describen los fundamentos biológicos subyacentes al uso de estos tratamientos, los diversos métodos de preparación y aplicación de estos hemoderivados, como así también las controversias y perspectivas futuras vinculadas al empleo del PRP en medicina regenerativa.

### **Cicatrización, regeneración y reparación de tejidos**

La reparación de heridas es un proceso dinámico y fisiológico que tiene como objetivo reconstruir tejidos dañados. Este proceso comprende tres etapas secuenciales y solapadas: 1) etapa inflamatoria (4-6 días), 2) proliferativa (4-24 días) y 3) remodelado o maduración (21 días – 2 años)<sup>(1,2)</sup>.

Durante la etapa inflamatoria se evita la pérdida de sangre inicial a través de la formación de un coágulo. Además, en esta etapa se remueve el tejido desvitalizado a través del reclutamiento de neutrófilos y monocitos capaces de fagocitar residuos del tejido dañado y de prevenir posibles infecciones a través de la fagocitosis de bacterias que hayan ingresado a través de las heridas<sup>(1,2)</sup>. La etapa proliferativa está caracterizada por la aparición de nuevos vasos sanguíneos a partir de la proliferación y migración de células endoteliales adyacentes al tejido dañado o reclutadas desde la circulación. Así mismo, el crecimiento, migración y activación de fibroblastos permite la formación de una nueva matriz extracelular provisoria denominada cicatriz inicial o tejido de granulación<sup>(1,2)</sup>.

La etapa de maduración se caracteriza por la contracción de la cicatriz y el remodelado del colágeno que conforma la matriz extracelular. En esta fase también ocurre la reparación/regeneración de los tejidos dependiendo de la capacidad regenerativa intrínseca de cada tipo tisular<sup>(1,2)</sup>. En este sentido, si la herida fue ocasionada en un tejido de reparación continua (ej. mucosas y epitelios), se logrará una completa regeneración de los componentes celulares dañados a través de la diferenciación y proliferación de células madre residentes y/o reclutadas desde la médula ósea o la circulación. Dependiendo de las características de la lesión, la diferenciación de células madre también tendrá lugar en tejidos con menor tasa regenerativa, como son los de origen mesenquimal (huesos, cartílagos, tendones y músculo). Por el contrario, si la lesión fue ocasionada en tejidos con baja tasa regenerativa, como el músculo cardíaco o el sistema nervioso central, el tejido será reparado pero no regenerado, dejando una cicatriz en la zona de la herida<sup>(3)</sup>.

Existen diversos aspectos que pueden afectar la curación de heridas, incluyendo factores locales (presencia de cuerpos extraños en el sitio de la herida, la maceración de tejidos, isquemia o infección) y factores intrínsecos al individuo (edad, diabetes, enfermedades renales, medicamentos y desnutrición,

entre otros). Estos factores impactan directamente en los mecanismos fisiológicos de regeneración tisular ocasionando diversas complicaciones clínicas: cicatrización anormal (hipertrófica, queloides, atróficas), dolor, prurito, malignización tisular (síndrome de Marjolin), hemorragia, úlcera, infección y amputación. En conjunto estos factores afectan las tasas de morbilidad y mortalidad, siendo uno de los grandes desafíos médicos actuales que incluyen el tratamiento de heridas crónicas, la prevención de la cicatrización, formación de queloides o contracturas y la curación cosméticamente aceptable<sup>(2,4)</sup>. Debido al avance en el conocimiento de la ciencia básica, la innovación técnica y la reciente participación de las empresas farmacéuticas, actualmente existen diversos recursos para promover la reparación de heridas incluyendo matrices sintéticas, reemplazo de tejidos biológicos, factores de crecimiento recombinantes y terapia con células madre<sup>(4-6)</sup>. También existen métodos locales para favorecer la circulación sanguínea en pacientes con heridas crónicas vinculadas a neuropatías y vasculopatías. Estos últimos incluyen métodos mecánico/físicos (terapia de presión negativa en heridas y compresión neumática intermitente) y métodos iónicos (tratamiento hiperbárico con ozono)<sup>(6,7)</sup>. Los derivados de plasma rico en plaquetas (PRP) constituyen otra alternativa terapéutica para favorecer la regeneración tisular<sup>(8,9)</sup>. De manera similar a los otros métodos, las bases moleculares subyacentes al uso del PRP, como así también los posibles efectos adversos y la eficacia de estos tratamientos, aún no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, y a diferencia de las otras terapias regenerativas, la utilización de PRP es un método económico y no requiere de equipamiento o entrenamiento complejo para su ejecución. Asimismo, debido a características asociadas a su origen principalmente autólogo y a sus técnicas de obtención inocuas, los posibles riesgos infecciosos o de rechazo asociados al tratamiento con PRP son mínimos<sup>(8,9)</sup>. Por estas razones, los hemoderivados enriquecidos en plaquetas han cobrado gran relevancia en la última década, y conforman un creciente objeto de estudio experimental y clínico en el contexto de la curación de heridas.

### **Bases moleculares de la regeneración tisular mediada por plaquetas**

Las plaquetas son células anucleadas derivadas de

los megacariocitos que circulan por los vasos sanguíneos y poseen un rol esencial en los procesos de hemostasia y trombosis. Estas células contribuyen a prevenir la pérdida de sangre como consecuencia de la injuria vascular mediante la adhesión a componentes del subendotelio, la agregación entre ellas, la liberación del contenido de sus gránulos y la formación de una superficie procoagulante que favorece la generación de trombina, la formación de fibrina

y la consolidación del trombo plaquetario<sup>(10)</sup>. Estas células también participan activamente en otros procesos fisiológicos incluyendo la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos a través de la liberación de factores de crecimiento, modeladores de la matriz extracelular, y moléculas que inducen la quimiotaxis y diferenciación de células madre endoteliales y la activación y diferenciación de células mesenquimales (**Tabla 1**)<sup>(8)</sup>.

**Tabla 1.** Factores de crecimiento liberados por las plaquetas.

Factores de crecimiento				
	Angiogénesis	Restitución del tejido conectivo	Regeneración de las células tejido-específicas	Otros
<b>PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)</b>	Estabilización de vasos sanguíneos nacientes a través del reclutamiento de pericitos.	Reclutamiento y activación de fibroblastos induciendo síntesis de colágeno.	Proliferación de oligodendrocitos.	Activación de macrófagos.
		Diferenciación a macrófagos M2 (regeneradores).	Proliferación de osteoblastos.	
<b>bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico)</b>	Migración y proliferación de células endoteliales.		Proliferación de osteoblastos.	
			Proliferación de condrocitos.	
<b>TGF-β (Factor de Crecimiento Tumoral β)</b>		Proliferación y activación de fibroblastos induciendo síntesis de colágeno y fibronectina.		
		Deposición de matriz ósea.		
		Inhibición de osteoclastos y resorción ósea.		
<b>IGF-I (Factor de Crecimiento Insulínico tipo I)</b>		Reclutamiento y activación de fibroblastos induciendo síntesis de colágeno.	Proliferación de osteoblastos.	
<b>VEGF (Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular)</b>	Migración y proliferación de células endoteliales.	Creación del lumen vascular.		Quimioattractante de macrófagos y granulocitos.
		Modulador actividad de MPPs.		Vasodilatador (induce liberación ON). Promueve linfo y vasculogénesis.
<b>EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico)</b>	Proliferación células endoteliales.	Diferenciación a macrófagos M2 (regeneradores).	Diferenciación de queratinocitos y fibroblastos dérmicos para regenerar dermis y epidermis.	
	Proliferación células epiteliales.	Proliferación y activación de fibroblastos.	Proliferación de hepatocitos.	
<b>PAF (Factor Activador de Plaquetas)</b>	Activación de células endoteliales induciendo síntesis de factores de crecimiento.			Quimiotaxis y activación de leucocitos.
				Funguicida.
<b>Angiopoyetina-1</b>	Migración y proliferación de células endoteliales.			Modulador permeabilidad vascular.
	Estabilización de vasos sanguíneos nacientes a través del reclutamiento de pericitos.			Vasculogénesis.
<b>MMP (Metaloproteasas)</b>	Disolución de membrana basal promoviendo movilización de células endoteliales.	Remodelado de tejido conectivo.		

La acción conjunta de estas moléculas modula secuencial y solapadamente 1) la revascularización del tejido dañado a través de la inducción de la migración, proliferación, diferenciación y estabiliza-

ción de células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos, 2) la restitución del tejido conectivo dañado a través de la migración, proliferación y activación de fibroblastos, y 3) la proliferación y diferenciación de

células madre mesenquimales que dan origen a los distintos tipos celulares específicos de cada tejido (**Tabla 1**)<sup>(8,11,12)</sup>.

Cabe destacar que, además de las plaquetas, existen otros tipos celulares capaces de liberar factores de crecimiento, incluyendo células endoteliales, macrófagos, fibroblastos, granulocitos y células madre mesenquimales y endoteliales. En respuesta al daño tisular, estas células son activadas y se diferencian localmente hacia un fenotipo regenerador y pro-angiogénico, culminando en la síntesis *de novo* de factores de crecimiento luego de horas a días de ocurrida la injuria<sup>(3,9)</sup>. A diferencia de este complejo proceso, el reclutamiento y la activación de plaquetas en el foco inflamatorio ocurre en minutos, y culmina con la rápida secreción de factores de creci-

miento preformados y almacenados en los gránulos plaquetarios<sup>(3,9)</sup>. De esta manera, y a diferencia de los otros tipos celulares, la obtención y activación de plaquetas *ex vivo* es una técnica simple, rápida y económica que permite obtener un biomaterial rico en factores de crecimiento.

Además de su acción regeneradora, las plaquetas también liberan gran cantidad de sustancias que están involucradas en la defensa contra microbios incluyendo quimioquinas y citoquinas. Éstas inducen el reclutamiento y activación de células del sistema inmune en el foco inflamatorio en regeneración. Las plaquetas también liberan sustancias con efecto bactericida, funguicida, virucida y parasiticida, contribuyendo a matar patógenos de manera directa (**Tabla 2**)<sup>(13,14)</sup>.

**Tabla 2.** Moléculas plaquetarias involucradas en la defensa contra microbios.

Inmuno moduladores				
	Angiogénesis	Restitución del tejido conectivo	Regeneración de las células tejido-específicas	Otros
<b>SDF-1<math>\alpha</math> (Factor Derivado del Estroma 1-<math>\alpha</math>)</b>	Reclutamiento, proliferación y diferenciación de células progenitoras endoteliales circulantes.		Quimiotaxis de células madre mesenquimales.	Quimiotaxis y activación de leucocitos.
<b>CD40L (CD40 Ligando)</b>	Activación de células endoteliales induciendo síntesis de factores de crecimiento.			
<b>PF-4 (Factor Plaquetario 4)</b>	Inhibición de proliferación y migración de células endoteliales.	Quimiotaxis de fibroblastos.		
<b>Sustancias microbicidas</b>	Kinocidinas (PF-4, proteína básica derivada de plaquetas, RANTES) y defensinas ( $\beta$ -defensina 2, timocina $\beta$ 4, PMP, péptidos microbicidas A y B).			

Debido a su efecto anti-hemorrágico, regenerador y microbicida, los hemoderivados ricos en plaquetas son actualmente empleados en medicina regenerativa. Estos derivados constan de una fase semisólida y otra líquida. La primera está constituida por plaquetas atrapadas en una red gelatinosa de fibrina, la cual se forma a través de la conversión del fibrinógeno durante la coagulación inducida por  $\text{CaCl}_2$  y/o trombina. Este fenómeno ofrece un soporte semisólido para la reepitelización y la angiogénesis fundamentales durante la regeneración tisular<sup>(15)</sup>. Por esta razón, algunos tratamientos regenerativos con PRP son suplementados con sustancias fibrilares obtenidas por crioprecipitación del plasma<sup>(16,17)</sup>.

Por otro lado, la fase líquida es rica en factores de crecimiento derivados de las plaquetas y de plasma pobre en plaquetas (PPP). Aunque las plaquetas se-

cretan moléculas pro- y anti-angiogénicas, el efecto global de estas células es pro-angiogénico<sup>(18,19)</sup>. Este fenómeno está asociado al hecho de que mientras los niveles intra-plaquetarios de las sustancias anti-angiogénicas (incluyendo interleuquinas (IL)-10 y -12, inhibidores de metaloproteasas, endostatina y angiostatina) son despreciables comparado con los altos niveles plasmáticos, la relación opuesta se observa para los factores de crecimiento (VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF y EGF)<sup>(18-21)</sup>. De manera controvertida, los derivados de PRP utilizados actualmente en la medicina regenerativa contienen plasma, el cual podría ejercer una interferencia con el efecto regenerador deseado. Este fenómeno aún no ha sido contemplado en el contexto del PRP en medicina regenerativa.

### Aplicaciones clínicas del PRP

La primer aplicación documentada de PRP en medicina regenerativa fue realizada durante una cirugía cardíaca en 1987<sup>(22)</sup>. En la actualidad el uso de PRP en medicina regenerativa ha crecido significativamente. Estos hemoderivados se utilizan en el ámbito hospitalario, así como en pacientes ambulatorios, centros de cirugía ambulatoria y consultorios médicos u odontológicos.

Las ventajas de la administración de PRP están asociadas a su método de obtención económico, rápido y simple, como así también a la ausencia de efectos adversos debido a su origen autólogo, evitando necrosis tisular o respuestas inmunológicas por parte del huésped. No obstante, en pacientes con bajo recuento plaquetario o enfermedades asociadas a anomalías de estas células, los tratamientos pueden ser realizados con donaciones alogénicas<sup>(23)</sup>.

El PRP es empleado con fines regenerativos en diversas especialidades clínicas incluyendo dermatología, odontología, oftalmología, ortopedia y densitometría<sup>(8,9,24)</sup>.

Si bien existen publicados más de 200 casos clínicos aislados que demuestran efectos favorables, los beneficios clínicos de estos tratamientos aún no han sido comprobados de manera robusta. A partir del año 2008 se han registrado más de 50 ensayos clínicos controlados y randomizados sobre este tema, pero la mayoría de ellos aún no ha concluido<sup>(8)</sup>. Tres de estos estudios han demostrado mejoría en la regeneración ósea luego de cirugías odontológicas, siete de nueve estudios en el área de la ortopedia demostraron resultados positivos en la regeneración de músculo y articulaciones, cinco estudios dermatológicos demostraron beneficio en la curación de heridas, y dos estudios oftalmológicos demostraron mejoría en el epitelio ocular luego del tratamiento con PRP<sup>(8)</sup>. A pesar de estos resultados prometedores, los beneficios clínicos de estos tratamientos aún son controvertidos. Para entender la efectividad de estas terapias habrá que esperar los resultados de los ensayos clínicos que actualmente se encuentran en fase 3 y 4<sup>(8)</sup>.

### Contraindicaciones

El uso de PRP autólogo está contraindicado en pacientes con síndromes de disfunción plaquetaria, trombocitopenia, inestabilidad hemodinámica, sepsis e infección local en la herida<sup>(25,26)</sup>.

Dentro de las contraindicaciones relativas, se aconseja evitar el uso de PRP dentro de las 48 horas de ingestión de AINES o dos semanas de tratamiento con corticoides sistémicos. También se desaconseja el tabaco, o iniciar el tratamiento en pacientes con fiebre, hemoglobina <10g/dl, recuento plaquetario <10<sup>5</sup>/μl y en pacientes que tuvieron cáncer, especialmente de origen hematopoyético u óseo. La terapia con PRP alógeno debería ser indicada por el médico luego de evaluar los riesgos que eso implica en cada paciente<sup>(25,26)</sup>.

### Preparación de PRP para medicina regenerativa

La preparación de PRP es realizada de manera manual o a través del empleo de dispositivos comerciales que permiten realizar este procedimiento de manera automática.

Los equipos comerciales más utilizados incluyen Biomet GPS II y III; Harvest SmartPREP 2 APC+, ArterioCyte-Medtronic Magellan, Arthrex ACP, Cascade PPR therapy, PRGF, Regen PRP, Angel; Magellan, Secquire, Sympony II, Genesis CS y Vivostat<sup>(8,24)</sup>.

Todos los métodos de preparación de PRP, ya sean manuales o automáticos, tienen en común tres etapas: 1) recolección de la sangre anticoagulada, 2) aislamiento del PRP por centrifugación y 3) formación del gel de PRP como resultado de la conversión del fibrinógeno en una red de fibrina durante la coagulación<sup>(9)</sup>. Las variables metodológicas para cada uno de estos pasos derivan de protocolos clásicos previamente optimizados para los ensayos de coagulación, funcionalidad plaquetaria y obtención de concentrados plaquetarios con fines transfusionales.

### Anticoagulantes

El anticoagulante utilizado para la recolección de la sangre debe preservar la funcionalidad, integridad y morfología plaquetaria, y debe ser inocuo para los pacientes. Se utilizan anticoagulantes citratos, que actúan como quelantes de calcio impidiendo la iniciación de la cascada de coagulación y cuyo efecto es revertido por el agregado de calcio exógeno. El anticoagulante recomendado para estos protocolos es el ácido-citrato-dextrosa (ACD), aprobado para fines transfusionales y disponible en la mayoría de los equipos comerciales diseñados para este fin. También está aceptado el uso de citrato trisódico o citrato-fosfato-dextrosa (CFD)<sup>(24,26)</sup>. Por el contrario, el EDTA está contraindicado ya que su efecto

no es reversible por el agregado de calcio, altera la membrana plaquetaria y puede generar daño en los tejidos<sup>(24)</sup>.

Existe una excepción al empleo de anticoagulante. Como se explica más adelante, la sangre es extraída sin anticoagulante en el protocolo de preparación de L-PRF, un tipo de PRP enriquecido en fibrina y en componentes leucocitarios.

### Métodos de recolección de la sangre

La recolección de la sangre puede realizarse en tubo mediante un circuito abierto, donde la aplicación del PRP debe realizarse dentro de las 6 horas de extracción y es destinada únicamente a tratamientos tópicos. Para otras aplicaciones se utiliza el método de bolsa obtenido en circuito cerrado, donde el PRP puede ser almacenado en agitación continua hasta 5 días a 22°C, o por un año a -20°C<sup>(25,26)</sup>.

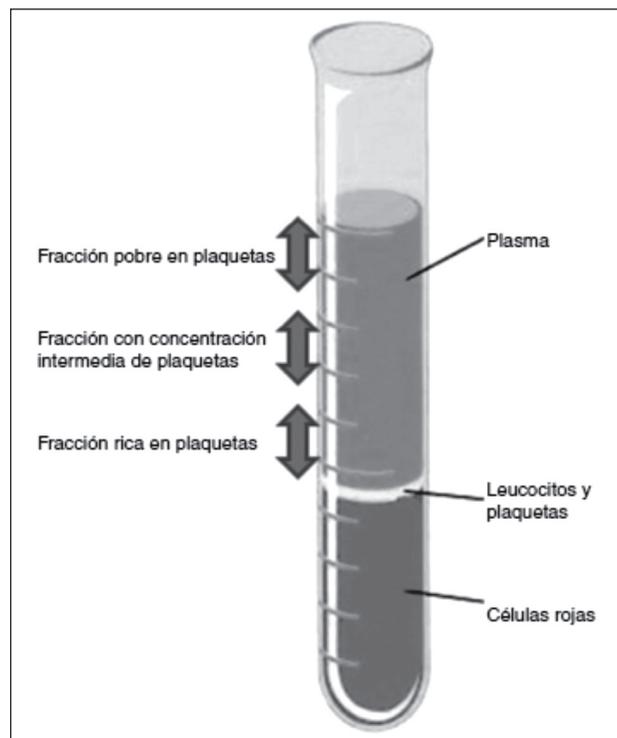
### Centrifugación de la sangre

Existe una gran variabilidad en los protocolos de centrifugación destinados a la preparación de PRP. Las condiciones de centrifugación de la sangre descritas para estos protocolos varían en tiempo (4-20 minutos), velocidad (100-3000 g), temperatura (12-26°C) y ciclos de centrifugación (1-2 ciclos)<sup>(8,9,24)</sup>. En consecuencia, la concentración de plaquetas recuperada en el PRP varía entre 300.000 a 1.900.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$ <sup>(24)</sup>.

La mayoría de los equipos comerciales diseñados para este fin tienen como objetivo concentrar entre 5-9 veces a las plaquetas en el PRP comparado con la concentración sanguínea, para luego obtener un producto final más concentrado en factores de crecimiento<sup>(24)</sup>. Este proceso se logra con altas velocidades de centrifugación y temperaturas inferiores a 16°C. Sin embargo, la activación plaquetaria inducida por la acción mecánica de la centrifugación puede ocasionar la liberación de factores de crecimiento, los cuales serían descartados en los protocolos que incluyen varios ciclos de centrifugación<sup>(8)</sup>. Por lo tanto, el mayor número de plaquetas en el PRP no siempre asegura una mayor concentración de factores de crecimiento en el producto final. Es conveniente evitar aquellos protocolos que incluyan altas velocidades de centrifugación y temperaturas inferiores a 16°C que puedan contribuir a la activación plaquetaria durante la centrifugación<sup>(8)</sup>.

### Clasificación del PRP

Como resultado de la centrifugación, la sangre es dividida en tres capas de distinta densidad. La capa inferior está compuesta por glóbulos rojos, la capa media está compuesta por glóbulos blancos y plaquetas (del inglés, *buffy coat*) y la capa superior está compuesta por plasma. A su vez, la fase plasmática puede subdividirse en tres fracciones en función de la concentración de plaquetas: pobre, intermedia o rica en plaquetas (**Figura 1**).



**Figura 1.** Fases obtenidas luego de la centrifugación de la sangre<sup>(27)</sup>.

La composición y el volumen del PRP varían en función de la fase que sea recolectada. En este sentido, algunos protocolos recolectan toda la capa plasmática, otros las fases plasmáticas con concentración intermedia y rica en plaquetas, y otros protocolos utilizan únicamente el *buffy coat*. En función de su recolección el volumen de PRP variará entre el 2-40% del volumen original de la sangre<sup>(24)</sup>. De esta manera, el contenido del PRP es variable ya que si bien todos estos derivados están enriquecidos en componentes plaquetarios, algunos de ellos también son ricos en leucocitos. Además existen

protocolos de preparación del PRP que permiten enriquecer a este hemoderivado en fibrina, y tienen como objetivo obtener una matriz sólida para rellenar tejidos luego de cirugías.

A partir del año 2009 se ha clasificado a los derivados de PRP en cuatro grupos en función de su contenido: P-PRP (puro en plaquetas y pobre en leucocitos), L-PRP (rico en plaquetas y leucocitos),

P-PRF (rico en plaquetas y fibrina) y L-PRF (rico en plaquetas, leucocitos y fibrina)<sup>(28)</sup>. En el año 2012 se agregó el término “gel” para subclasificar al P-PRP y L-PRP como activado o no activado con CaCl<sub>2</sub> y/o trombina<sup>(29)</sup>.

Las características de composición, preparación y aplicación de los distintos tipos de PRP se detallan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Clasificación de los derivados de PRP<sup>(24,28,29)</sup>.

	P-PRP o Puro en Plaquetas	L-PRP	P-PRF	L-PRF
Plaquetas	Rico			
Leucocitos	Pobre	Rico	Pobre	Rico
Fibrina	Pobre		Rico	
Manipulación de la sangre	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP.	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP + buffy coat.	1) Extracción sangre anticoagulada. 2) Centrifugación. 3) Aislamiento de PRP.	1) Extracción de sangre sin anticoagulante.
Activación	Activación con CaCl <sub>2</sub> y/o trombina. Se denomina "gel" una vez activado.		1) Activación con CaCl <sub>2</sub> y/o trombina durante centrifugación. 2) Compresión de malla de fibrina.	Se activa por ausencia de anticoagulante. Se centrifuga inmediatamente luego de la extracción de sangre. 2) Compresión de malla de fibrina.
Consistencia	Gelifica luego de activación. Se utiliza el gel o el exudado líquido.		Sólido	
Costo	5-50 euros MM* o >50 euros MA*		5-50 euros (sólo MM)	<5 euros (sólo MM)
Facilidad	Simple MM; Muy complejo MA Complejo MM; Simple MA		Simple	Muy simple
Aplicación	Muy versátil debido a su consistencia. Aplicación superficial y/o inyectable.		Poco versátil debido a su consistencia sólida. Se utiliza para rellenar luego de cirugías (oral, maxilofacial, plástica).	
*MM: Método Manual. MA: Método Automático o con kit comercia				

Si bien esta clasificación del PRP es actualmente aceptada, todavía no existen protocolos estandarizados para la preparación de los mismos, como tampoco existen evidencias que indiquen qué tipo de PRP es más eficiente, en qué situación clínica es indicado aplicarlos, o cuáles son los posibles efectos adversos asociados a cada uno de ellos.

En particular, y teniendo en cuenta la gran cantidad de sustancias microbicidas provenientes de los leucocitos, los derivados de PRP enriquecidos en estas células tienen como objetivo potenciar la defensa contra patógenos, fenómeno fundamental para prevenir posibles infecciones durante la curación de heridas. Sin embargo, las enzimas leucocitarias no sólo son capaces de dañar la membrana de los patógenos, sino que también son capaces de hidrolizar a la matriz extracelular y a las células involucradas en la reparación del tejido dañado<sup>(30,31)</sup>. En un contexto fisiológico, la acción exacerbada de las proteasas

leucocitarias es impedida a través de inhibidores endógenos de estas enzimas. Sin embargo, estos mecanismos de control se encuentran alterados de manera local y sistémica en enfermedades inflamatorias crónicas como la diabetes, fenómeno que contribuye a la progresión de heridas crónicas en estos pacientes<sup>(31,32)</sup>. Teniendo en cuenta que el tratamiento de heridas de diabéticos con PRP ha crecido exponencialmente en la última década<sup>(33)</sup>, resulta crucial entender si el PRP enriquecido en leucocitos podría ejercer un efecto contraproducente en el tratamiento de estos pacientes. Cabe mencionar que la mayoría de los equipos comerciales diseñados para la preparación del PRP dan como resultado un hemoderivado rico en leucocitos<sup>(24)</sup>. Este fenómeno podría contribuir al daño secundario de los tejidos y derivar en resultados negativos en los ensayos clínicos que evalúan el uso de PRP en medicina regenerativa.

## Activación del PRP

Una vez obtenido, el PRP debe ser “activado” antes de su aplicación. Este procedimiento consiste en inducir la activación plaquetaria provocando la secreción de los factores de crecimiento almacenados en los gránulos de estas células.

Los métodos de activación más utilizados son el agregado de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) o gluconato de calcio, restituyendo los niveles del catión plasmático que fueron quelados por el anticoagulante y permitiendo la generación de trombina<sup>(34)</sup>.

Teniendo en cuenta el rol primordial que tiene la trombina en la activación del PRP, algunos protocolos han considerado el agregado de esta enzima de manera individual<sup>(24,35)</sup> o combinada<sup>(36,37)</sup> con las soluciones de  $\text{CaCl}_2$ . La administración de trombina bovina se ha asociado al desarrollo de autoanticuerpos contra factores de la coagulación<sup>(38)</sup>, motivo por el cual se recomienda utilizar únicamente trombina de origen autólogo.

Algunas revisiones de la literatura señalan que el PRP puede ser aplicado sin activación previa en tejidos blandos, ya que las plaquetas serán activadas *in situ* por el colágeno expuesto en la matriz de los tejidos dañados<sup>(24)</sup>. Este fenómeno no ha sido comprobado y podría ocasionar un daño secundario por exposición de los tejidos al anticoagulante.

### ¿Cuánto calcio se debe agregar?

Se debe agregar la cantidad de calcio que fue quelada por el anticoagulante.

Para tal fin se utilizan soluciones de  $\text{CaCl}_2$  o gluconato de calcio agregados en una concentración final de 22-25 mM. Este valor proviene de la ecuación química de interacción del calcio con el citrato trisódico y el ácido cítrico contenidos en los anticoagulantes. Por lo tanto, los cálculos indican que, mientras el anticoagulante citrato trisódico 0.38% secuestra 22 mM de calcio, los anticoagulantes CFD y ACD secuestran 24-25 mM de calcio, ya que además de citrato trisódico también contienen ácido cítrico.

De esta manera, la cantidad de calcio que debe agregarse varía en función del tipo de anticoagulante empleado y de su concentración. De manera controvertida, los protocolos publicados no brindan información exacta sobre este tema. Por ejemplo, algunos protocolos indican que se deben agregar 0.2-0.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  por cada 1 ml de PRP anticoagulado con ACD<sup>(8)</sup>, o 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  cada 6 ml de PRP

anticoagulado con CFD<sup>(36)</sup>. En estos ejemplos no se especifica cuál es la concentración de la solución de  $\text{CaCl}_2$  que debe ser utilizada.

Cabe destacar que el exceso de  $\text{CaCl}_2$  en el PRP no es recomendable. En estudios preliminares de nuestro laboratorio se comprobó que el agregado de 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  10% a 1 ml de PRP con ACD induce coagulación y activación plaquetaria. Por el contrario, el agregado de 40  $\mu\text{l}$  de la misma solución de  $\text{CaCl}_2$  (apenas 10  $\mu\text{l}$  de más) inhibe la coagulación del PRP. Este fenómeno radica en que el exceso de  $\text{CaCl}_2$  disocia al FXIII de la coagulación, y afecta la integridad de la membrana plaquetaria, interfiriendo con la coagulación y la activación plaquetaria<sup>(39-41)</sup>. La temperatura y el tiempo son otras variables que afectan a la activación del PRP. Dependiendo del protocolo, el proceso de gelificación del PRP se realiza durante 20 minutos a 1 hora ya sea a 37°C<sup>(42)</sup> o a temperatura ambiente<sup>(37)</sup>. Todos estos métodos son válidos. Se debe tener en cuenta que la activación del PRP no debe realizarse a temperaturas inferiores de 20°C porque la coagulación es inhibida al descender de esas temperaturas<sup>(43)</sup>.

### Suplemento con sustancias fibrilares plasmáticas

Algunos protocolos de preparación de PRP incluyen el suplemento con sustancias fibrilares, las cuales funcionan como una matriz provisoria durante la regeneración, y favorecen el anclaje de las células involucradas en regeneración de tejidos<sup>(16,17)</sup>. Estos concentrados fibrilares son obtenidos por fraccionamiento y crioprecipitación del plasma, y son ricos en fibrinógeno, fibronectina, factor von Willebrand y factor VIII. Teniendo en cuenta que la proteína mayoritaria es el fibrinógeno, estos materiales son usualmente denominados biomateriales basados en fibrinógeno y se obtienen comercialmente (origen heterólogo) o manualmente por la crioprecipitación de plasma autólogo<sup>(16)</sup>.

### PRP en medicina regenerativa, ¿verdad o mito?

A pesar de que el PRP es utilizado hace tres décadas en el contexto de la medicina regenerativa, en la actualidad existen diversas controversias acerca de su efectividad. Estas controversias radican en un proceso multifactorial causado por 1) difícil acceso a la información, 2) interpretación subjetiva de la información, 3) ausencia de significancia estadística y 4) ausencia de consenso en las técnicas de preparación del PRP.

### **Difícil acceso a la información**

En la literatura existen más de 3000 artículos sobre la utilización de PRP en medicina regenerativa. Sólo el 50% de estos trabajos están indexados en bases de datos médicas y científicas de uso masivo (PubMed, MEDLINE, EMBASE, etc.). El resto está publicado en revistas de diversas sociedades médicas, cuyo acceso es dificultoso debido a su baja visibilidad y a la alta variabilidad de idiomas empleados. El 70% de los trabajos indexados en PubMed están escritos en inglés y el 30% restante está escrito en chino, francés, alemán y español dificultando entendimiento por los angloparlantes.

El 60% de los artículos indexados en PubMed sobre este tema fueron publicados a partir del año 2013. Dentro de estos trabajos, el 50% corresponde a revisiones; el 15% son ensayos clínicos aún no concluidos en su mayoría, el 15% son trabajos de investigación básica, que tienen como objetivo entender las bases biológicas subyacentes al uso del PRP, y el 20% restante corresponden a casos clínicos, los cuales en su mayoría no detallan los protocolos de preparación del PRP, ni incluyen métodos estadísticos que avalen la significancia de sus resultados.

En conjunto, estas cifras indican que, a pesar de ser una técnica empleada hace 30 años, la mayoría del conocimiento sobre este tema fue generado y publicado hace sólo 3 años, siendo difícil acceder a información rigurosa antes de esa fecha.

### **Interpretación subjetiva de la información**

Un claro ejemplo de esta problemática surge del análisis de los artículos publicados por Picard<sup>(33)</sup>, Martínez-Zapata<sup>(44)</sup> y sus colaboradores. Ambos trabajos constituyen revisiones exhaustivas de los artículos científicos publicados sobre el uso de PRP en la curación de heridas crónicas, incluyendo úlceras de pie diabético, úlceras por presión y/o vasculares (venosas o arteriales). Los dos trabajos analizan a los mismos casos y ensayos clínicos publicados sobre el tema. Llamativamente, ambos autores concluyen resultados opuestos. Mientras Picard asegura que el uso del PRP es efectivo en estos tratamientos, Martínez-Zapata concluye lo contrario.

A modo de ejemplo, en ambas revisiones se discuten los resultados del ensayo clínico realizado por Driver y colaboradores<sup>(45)</sup>. Basándose en este trabajo, Picard concluye que el tratamiento de úlceras de pie diabético con PRP es efectivo, porque el porcenta-

je de área completamente curada fue del 81.3% con PRP comparado con el tratamiento control (42.1%,  $p=0.036$ ). Por el contrario, Martínez-Zapata concluye que el tratamiento con PRP no fue efectivo porque no fue capaz de mejorar todos los parámetros clínicos evaluados, y además cuestiona la significancia estadística de los resultados obtenidos por Driver.

### **Ausencia de significancia estadística**

Controversialmente, mientras algunos trabajos demuestran que el PRP es efectivo en la regeneración de tejidos, otros no observan diferencias significativas que avalen la efectividad de estos tratamientos. Basados en el ejemplo anterior, diversos ensayos y casos clínicos concluyen que el PRP no es efectivo para la curación de heridas crónicas debido a la ausencia de significancia contra los controles (solución salina, vendas, matrices sintéticas, etc.)<sup>(8,44)</sup>. Las variables estudiadas en estos trabajos incluyen número de úlceras curadas, porcentaje de área reepitelizada, porcentaje de área curada, tiempo de curación, presencia o ausencia de dolor y complicaciones (infección, necrosis, úlceras recurrentes, prurito, dermatitis)<sup>(33,44)</sup>. Llamativamente, y si bien algunos parámetros clínicos evaluados en esos trabajos no son alterados por el PRP, este tratamiento sí es capaz de mejorar significativamente otras variables estudiadas. A pesar de esto, el análisis estadístico global resulta en la ausencia de significancia. Específicamente, en el trabajo de Driver y colaboradores demuestran que mientras el PRP fue significativamente efectivo al aumentar el número de pacientes con curación completa y el porcentaje de área curada, este tratamiento no tuvo efecto significativo en el tiempo de curación<sup>(45)</sup>.

De esta manera, existe una ausencia de evidencias sólidas que demuestren la efectividad de los tratamientos regenerativos con PRP. Este fenómeno es directamente afectado por la falta de protocolos estandarizados para la preparación del PRP y la escasa cantidad de ensayos clínicos controlados y concluidos sobre este tema. Estas discrepancias estadísticas serán resueltas en un futuro, luego de analizar los resultados de los ensayos clínicos que actualmente están en curso (ClinicalTrials.gov; Clinicaltrialsregister.eu).

### **Ausencia de consenso en las técnicas de preparación del PRP**

Como fue mencionado anteriormente, la composi-

ción del PRP puede afectar significativamente sus propiedades biológicas. En este sentido, la gran variabilidad en las técnicas de preparación de PRP puede llevar a resultados clínicos indeseados, impactando directamente en la eficiencia de estos tratamientos.

Por este motivo, es fundamental que existan ensayos experimentales y clínicos diseñados para estudiar la eficacia y seguridad de cada tipo de producto derivado del PRP.

### Estudios preliminares de nuestro laboratorio

En los últimos cinco años se han publicado diversos trabajos de investigación básica dirigidos a definir las condiciones óptimas para la preparación de PRP con fines regenerativos. Estos trabajos tienen como objetivo encontrar las variables metodológicas que permitan aumentar la concentración de plaquetas y de los factores de crecimiento provenientes de las mismas. Sin embargo, en estos estudios no se realizan ensayos funcionales que comprueben la capacidad regenerativa de las variables propuestas.

Establecer las condiciones óptimas para la preparación de PRP a través de ensayos funcionales regenerativos constituye un pilar esencial para mejorar estos tratamientos, y conforma uno de los objetos de estudio de nuestro grupo de trabajo.

En nuestro laboratorio, la sangre anticoagulada es centrifugada a 200 g, 15 minutos, temperatura ambiente (22-26°C). La fase plasmática es recolectada evitando la contaminación con leucocitos. La concentración de plaquetas obtenida en el PRP es de 421.000-447.000/ $\mu$ l, y se recupera 30-37% del volumen original de la sangre. El PRP es activado durante 40 minutos a 37°C con  $\text{CaCl}_2$ . La concentración de  $\text{CaCl}_2$  es calculada en función de la cantidad de calcio quelada por cada anticoagulante empleado. Luego de la activación, el coágulo es descartado y el sobrenadante conteniendo los factores secretados por las plaquetas es recolectado. La capacidad angiogénica de los sobrenadantes provenientes del PRP activado es estudiada *in vitro* evaluando la proliferación, migración y formación de estructuras tubulares de células endoteliales.

Nuestros hallazgos indican que la concentración mínima de plaquetas en PRP requerida para inducir el máximo de respuestas angiogénicas *in vitro* es de 88.000-112.000 plaquetas/ $\mu$ l.

Hemos hallado tres variables en la preparación del

PRP que incrementan marcadamente la capacidad regenerativa de estos hemoderivados: el pre-acondicionamiento a 4°C, la dilución del PRP activado antes de su aplicación y el suplemento con crioprecipitados fibrilares plasmáticos.

La primera variable implica el pre-acondicionamiento del PRP a 4°C durante 30 minutos antes del agregado de  $\text{CaCl}_2$ . La exposición de plaquetas a bajas temperaturas gatilla la activación de mecanismos moleculares involucrados en la secreción del contenido de los gránulos<sup>(46)</sup>. Como resultado, el sobrenadante proveniente del PRP es enriquecido en factores de crecimiento liberados por las plaquetas, aumentando las respuestas angiogénicas inducidas por este biomaterial.

La segunda variable implica la dilución de los sobrenadantes del PRP activado con solución fisiológica. Nuestros hallazgos demuestran que la actividad angiogénica inducida por sobrenadantes provenientes de PRP activado son significativamente incrementados por la dilución entre el 25-50% del PRP con solución fisiológica. Este fenómeno podría estar asociado a la dilución de los factores anti-angiogénicos constitutivos del plasma, dando como resultado un balance óptimo entre los factores de crecimiento plaquetarios y las sustancias anti-angiogénicas plasmáticas. La importancia clínica de estos resultados no sólo estaría asociada al aumento de la eficiencia de los tratamientos, sino también a la disminución del volumen de sangre que debería ser obtenido para los mismos.

Por último, hemos demostrado que las respuestas angiogénicas mediadas por PRP son aumentadas significativamente por el suplemento con crioprecipitados fibrilares provenientes del plasma.

Estas tres variables actúan de manera aditiva potenciando marcadamente la capacidad angiogénica del PRP. Estos resultados obtenidos *in vitro* están siendo actualmente extrapolados a modelos de animales en nuestro laboratorio, los cuales no sólo evalúan la capacidad angiogénica del PRP sino también la capacidad regenerativa la cual involucra la reestructuración de varios tejidos.

### Conclusiones y perspectivas futuras

Las controversias sobre el empleo del PRP en medicina regenerativa radican en la ausencia de protocolos estandarizados para la preparación de estos hemoderivados; la escasez de ensayos clínicos mul-

ticéntricos, randomizados y controlados sobre estos tratamientos y la ausencia de publicaciones científicas rigurosas sobre este tema. A pesar de estas controversias, los recientes resultados de ensayos clínicos demuestran beneficios clínicos prometedores en el área de la dermatología, odontología, oftalmología, ortopedia y densitometría. Para entender la efectividad de estos tratamientos habrá que esperar al resultado de los ensayos clínicos controlados y randomizados que actualmente se encuentran en fase 3 y 4.

Todavía existen diversos interrogantes sin resolver sobre este tema: ¿cuál es el efecto de las drogas anti-agregantes en estos tratamientos?, ¿cuáles son los mecanismos biológicos subyacentes al empleo de estas terapias?, ¿cuál es la capacidad regenerativa del PRP de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas?, ¿cuáles son los posibles efectos adversos asociados al uso de PRP?, ¿cuál es la eficacia de estos tratamientos?

A diferencia de otras terapias regenerativas, la utilización de PRP es un método económico que no requiere de equipamiento o entrenamiento complejo para su ejecución. Por este motivo, los derivados de PRP son una herramienta terapéutica prometedora en el contexto de la medicina regenerativa, y se han convertido en un foco de atención de la industria farmacéutica y la comunidad científica y médica en la última década.

#### Agradecimientos

Las investigaciones realizadas en el Laboratorio Trombosis Experimental, IMEX-CONICET/Academia Nacional de Medicina son subsidiadas por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (PICT-2014-0352 y PICT-2015-0152), Fundación A. Roemmers (Subsidio a la Investigación Médica Básica 2015-2016), y L'Oreal-UNESCO-CONICET (CONICET-LOREAL-2512-2015).

#### Declaración de conflictos de interés:

La autora declara que no posee conflictos de interés.

#### Bibliografía

- Rittie, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *J Cell Commun Signal*. 2016.
- Xue M, CJ. Jackson. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015. 4(3): p. 119-136.
- Forbes SJ, N. Rosenthal. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med*. 2014. 20(8): p. 857-69.
- Paul W, Sharma CP. *Advances in Wound Healing Materials. Science and Skin Engineering*. Vol. 1. 2016: Smithers Rapra Technology.
- Briquez PS, Hubbell JA, Martino MM. Extracellular Matrix-Inspired Growth Factor Delivery Systems for Skin Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015. 4(8): p. 479-489.
- Powers JG et al. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *J Am Acad Dermatol*. 2016. 74(4): p. 607-25.
- Ackermann, PW, Hart DA. Influence of Comorbidities: Neuropathy, Vasculopathy, and Diabetes on Healing Response Quality. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013. 2(8): p. 410-421.
- De Pascale MR et al., Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev*, 2015. 29(1): p. 52-61.
- Burnouf, T., et al. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016. 76: p. 371-87.
- Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med (Berl)*. 2011. 89(2): p. 109-21.
- Etulain J, Negrotto S, Schattner M. Role of platelets in angiogenesis in health and disease. *Curr Angiogenesis*. 2014. 3(1): p. 1-10.
- Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011. 105 Suppl 1: p. S13-33.
- Fabbro, MD et al. Antimicrobial properties of platelet-rich preparations. A systematic review of the current pre-clinical evidence. *Platelets*. 2016: p. 1-10.
- Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. *Nat Rev Microbiol*. 2014. 12(6): p. 426-37.
- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008. 14(2): p. 199-215.
- Burnouf T et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*. 2013. 27(2): p. 77-89.
- Ji B et al. The combination use of platelet-rich fibrin and treated dentin matrix for tooth root regeneration by cell homing. *Tissue Eng Part A*. 2015. 21(1-2): p. 26-34.

18. Etulain J et al. Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br J Pharmacol*. 2013. 170(2): p. 255-65.
19. Etulain J et al. Control of angiogenesis by galectins involves the release of platelet-derived proangiogenic factors. *PLoS One*. 2014. 9(4): p. e96402.
20. Amable PR et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther*. 2013. 4(3): p. 67.
21. Etulain J et al. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. *Platelets*. 2015: p. 1-6.
22. Ferrari M et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs*. 1987. 10(1): p. 47-50.
23. Greppi N et al. Treatment of recalcitrant ulcers with allogeneic platelet gel from pooled platelets in aged hypomobile patients. *Biologicals*. 2011. 39(2): p. 73-80.
24. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014. 7(4): p. 189-97.
25. Scordo W et al. Estándares para la obtención, producción y almacenamiento del plasma rico en plaquetas., in Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunoterapia (AAHI). Sociedad Argentina de Infectología (SADI). 2014.
26. Society, T.I.C.M. Guidelines for the use of platelet rich plasma. *Best Practices Standards in Cell Based Medicine*. 2012.
27. Rodríguez Flores J, Angustias Palomar Gallego M, Torres García-Denche J. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac*. 2012. 34(1).
28. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson R, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009. 27(3): p. 158-67.
29. Dohan Ehrenfest DM et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012. 13(7): p. 1131-7.
30. Everts PA et al. Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfus Med*. 2006. 16(5): p. 363-8.
31. Henriksen PA. The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies. *Curr Opin Hematol*. 2014. 21(1): p. 23-8.
32. Uccioli L et al. Non-healing foot ulcers in diabetic patients: general and local interfering conditions and management options with advanced wound dressings. *J Wound Care*. 2015. 24(4 Suppl): p. 35-42.
33. Picard F et al. The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. *Wound Repair Regen*. 2015. 23(5): p. 638-43.
34. Pietrzak WS, Eppley BL. Platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg* 2005. 16(6): p. 1043-54.
35. Marlovits S et al. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *Eur Spine J*. 2004. 13 Suppl 1: p. S102-6.
36. Marx RE et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998. 85(6): p. 638-46.
37. Su CY et al. Platelet-derived growth factor-AB and transforming growth factor-beta 1 in platelet gels activated by single-donor human thrombin. *Transfusion*. 2004. 44(6): p. 945.
38. Rodgers GM. Immune-mediated coagulopathy associated with topical bovine thrombin: review of the pediatric literature. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2011. 33(2): p. 86-8.
39. Cooke RD. Calcium-induced dissociation of human plasma factor XIII and the appearance of catalytic activity. *Biochem J*. 1974. 141(3): p. 683-91.
40. Kulkarni S, Jackson SP. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIb beta3 adhesive function and thrombus growth. *J Biol Chem*. 2004. 279(29): p. 30697-706.
41. Mihalyi E. Clotting of bovine fibrinogen. Calcium binding to fibrin during clotting and its dependence on release of fibrinopeptide B. *Biochemistry*. 1988. 27(3): p. 967-76.
42. Anitua E et al. Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves

- reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *J Control Release*. 2015. 202: p. 31-9.
43. Anstall HB, Huntsman RG. Influence of temperature upon blood coagulation in a cold- and a warm-blooded animal. *Nature*. 1960. 186: p. 726.
  44. Martinez-Zapata MJ et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016. 5: p. CD006899.
  45. Driver VR et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage*. 2006. 52(6): p. 68-70, 72, 74 passim.
  46. Egidi MG et al. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus*. 2010. 8 Suppl 3: p. s73-81.