

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento Medicina y Cirugía Animal



Aplicación del Plasma Rico en Factores de
Crecimiento Autólogo en Asociación con Células
Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el
Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo

TESIS DOCTORAL

Deborah Chicharro Alcántara

VALENCIA
2016



CEU
Universidad
Cardenal Herrera

Facultad de Veterinaria

JOAQUÍN JESÚS SOPENA JUNCOSA, MÓNICA RUBIO ZARAGOZA Y JOSÉ MARÍA CARRILLO POVEDA, DOCTORES EN VETERINARIA Y PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo”** de la que es autora **Doña Deborah Chicharro Alcántara**, Licenciada en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en el marco del Programa de Doctorado de Ciencias Veterinarias, y reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente en Alfara del Patriarca (Valencia), a 5 de diciembre de 2016.

Fdo: Joaquín J. Sopena Juncosa Mónica Rubio Zaragoza José M^a Carrillo Poveda

A ti, **Abel**, sin ti nada hubiera sido posible.

Gracias por hacerme feliz.

A mis padres, **Rosa y Jose**, por permitirme soñar.

AGRADECIMIENTOS

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Agradecimientos

Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional por parte de muchas personas, gracias a todos ellos por poner su granito de arena y empeño en que hoy este sueño se haya podido hacer realidad.

Mil gracias a mis directores de tesis por vuestra paciencia, dedicación y motivación. Han hecho fácil lo difícil. A Mónica Rubio, en tu lucha diaria por tranquilizarme, por ver siempre una salida donde parecía no haberla, por creer en mí , por tu apoyo, por tu amistad. A Jose M^o Carrillo por hacerme ver que todo es posible, por compartir momentos clave de mi vida , por tus sabios consejos y por ser mi referente, mi amigo. A Joaquín Sopena, por la gran persona que eres, por tener siempre un hueco para ayudarme, escucharme... y siempre transmitirme lo mejor de ti. Mil gracias de verdad a los tres, ha sido un auténtico privilegio contar con vuestra guía y ayuda, porque parte de lo que soy hoy es gracias a vosotros.

Mi más sincero agradecimiento a la Fundación García-Cugat por confiar en mí, por ofrecerme esta grandísima oportunidad imprescindible para mi desarrollo profesional y por permitirme

continuar formando parte de este gran equipo. En especial, gracias a Montse García y Ramón Cugat porque además de ser grandes profesionales sois grandes personas.

Gracias al centro de investigación Príncipe Felipe por vuestra colaboración en el procesado de las muestras para el estudio histológico, en especial a Victoria Moreno por su empeño y dedicación, siempre pendiente de que todo saliera bien, gracias de corazón.

A todo el personal veterinario del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera que tanto me ayudó durante la fase experimental de mi proyecto, junto con Tomás y Coral, por todas vuestras horas de empeño dedicadas. Muchas gracias de verdad.

A Silvia de Córdoba, por tu gran ayuda con la histopatología del estudio, por tus clases magistrales de histología, gracias por tu paciencia y empeño por que todo saliera bien.

A Abel, por estar a mi lado siempre, apoyarme, hacerme reír, mover cielo y tierra para hacerme feliz, quererme incondicionalmente y tenerme enamorada desde el primer día. Porque la mejor decisión que he tomado en mi vida fue casarme contigo. Te quiero siempre.

A mis padres, por ser los mejores padres del mundo, porque gracias a vosotros he podido cumplir muchos sueños en mi vida y por estar junto a mi siempre en las buenas y las malas. A mi mami, la “seta” porque siempre lo has significado todo para mi, por cuidarme, mimarme y darme todo tu amor. A mi padre, el “chicharro” porque a pesar de ser muy iguales y discutir a veces nos queremos y nos tenemos siempre. Os quiero mucho.

A mis yayos, que los quiero con locura y los necesito a mi lado. A mi yaya Manuela por todo su cariño, por esos torreznos tan buenos que siempre nos prepara, por llamarme “perejililla” “hermosura”. A mi yayo Aurelio por ser tan bueno, quererme tanto y cuidar de todos. A mi yaya Maruja que se que allá donde esté cuida de todos nosotros cada día. A mi yayo Fernando que aunque era muy pequeñita cuando te fuiste la mama me recuerda muchas cosas de ti y sé que nos proteges desde arriba.

A mis princesas “Lolita” y “Mya” por ser mis niñas, por el amor incondicional que nos dais, por ayudarnos a ser más felices cada día, por sacarme siempre una sonrisa y ser imprescindibles para mí. A otra de mis princesas que ya no está conmigo, “Rubi” te quiero pequeña, te echamos mucho de menos, gracias por todo lo que nos has dado. A “Kuka” la más pequeñita de la casa por devolvernos la alegría y hacerte tanto de querer. A “King” mi chico favorito, por cuidar de todas tus hermanitas y por tu cariño. A “Blue” porque sabemos que nos quieres a pesar de tus bocaditos de agradecimiento. A todos aquellos que ya nos dejaron y que llevo en mi corazón.

A toda la familia por parte de mi marido, en especial a “Miguelillo” y “Ave” por brindarme vuestra confianza y quererme como una hija más. A los “yayos” por siempre estar deseando vernos y pasar tiempo juntos. Gracias.

A mis amigas del alma, Sonia, Mireia y Aída. Gracias por hacerme ver lo importante que sois en mi vida, por tantas risas, momentos vividos juntas, por apoyarme, animarme y estar siempre a mi lado. Por todo lo que hemos compartido y aún nos queda por vivir. Porque sabéis que os quiero y que siempre vamos a estar juntas. Gracias.

A mis compañeros de la Universidad CEU Cardenal Herrera, gracias por vuestro apoyo continuo, por animarme y constantemente recordarme que yo podía con todo y que pese a lo que me quedase aún por redactar me dijerais que ya se veía la luz.

Muchas gracias de verdad a todos los que me habéis ayudado a cumplir mis sueños.

ÍNDICES

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
<i>Uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento en Piel</i>	4
Actuación sobre la fase inflamatoria	5
Actuación sobre la fase de proliferación	5
Actuación en la fase de remodelado	5
<i>Uso de Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en Piel</i>	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	9
OBJETIVOS	11
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
LA PIEL	15
<i>Anatomía y fisiología cutánea</i>	15
<i>Ontogenia</i>	16
<i>Funciones de la piel</i>	16

<i>Histología y Estructura cutánea</i>	17
Epidermis.....	17
Estrato basal	18
Estrato espinoso	18
Estrato granuloso.....	18
Estrato córneo	18
Membrana basal	19
Dermis	19
Tipos Celulares de la Dermis.....	20
Hipodermis.....	23
<i>Anejos Cutáneos</i>	23
El Pelo y el Folículo Piloso	23
Glándulas Cutáneas.....	25
Glándulas sebáceas.....	25
Glándulas Sudoríparas	25
Otras Glándulas especializadas.....	26
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS	27
<i>Introducción a las heridas cutáneas</i>	27
<i>Clasificación de Heridas</i>	28
Según su profundidad	28
Según la duración y grado de contaminación	29
Según su persistencia.....	30
Según su etiología	30
Según la solución de continuidad de la piel	30
Según su complejidad	31
Heridas simples.....	31
Heridas complicadas	31
<i>Proceso de Cicatrización Cutánea</i>	31
Hemostasis	32
Fase Inflamatoria.....	32
Fase de proliferación.....	34
Neovascularización/Angiogénesis	35
Fibroplasia.....	35
Epitelización.....	36
Contracción de la herida.....	37
Fase de remodelación	37
<i>Tipos de cicatrización</i>	38
Cicatrización por primera intención.....	38

Cicatrización por segunda intención.....	39
<i>Factores que afectan a la cicatrización cutánea</i>	39
Factores internos del hospedador	39
Factores externos	40
Factores propios de la herida	41
<i>Complicaciones en la cicatrización cutánea</i>	41
<i>Cicatrización cutánea patológica</i>	42
Desórdenes fibroproliferativos	42
Úlceras cutáneas.....	43
<i>Tratamiento de las heridas cutáneas</i>	45
Tratamientos no farmacológicos	46
Limpieza de la herida.....	46
Desbridamiento de la herida	46
Apósitos.....	46
Vendajes.....	47
Otras terapias	48
Tratamientos farmacológicos	48
Tratamientos quirúrgicos.....	49
Colgajos cutáneos.....	49
Injertos cutáneos.....	49
Terapias regenerativas.....	49
Factores de crecimiento (FC).....	50
Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) o Plasma rico en plaquetas (PRP).....	51
Células madre (CM)	51
FACTORES DE CRECIMIENTO.....	53
<i>Introducción</i>	53
<i>Principales factores de crecimiento</i>	56
Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)	56
Efecto sobre la cicatrización cutánea	57
Efecto sobre la cicatrización de otros tejidos	58
Factor de Crecimiento Transformante B (TGF-B).....	59
Efecto sobre la cicatrización cutánea	60
Efecto sobre la cicatrización de otros tejidos	61
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF).....	62
Efecto sobre la cicatrización cutánea	63
Efecto sobre otros tejidos	64
Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)	64
Efecto sobre la cicatrización cutánea	66

Efecto sobre otros tejidos.....	67
Factor de Crecimiento Queratinocítico (KFG)	67
Efecto sobre la cicatrización cutánea	68
Efecto sobre otros tejidos.....	68
Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)	68
Efecto sobre la cicatrización cutánea	69
Efecto sobre otros tejidos.....	70
Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)	70
Efecto sobre la cicatrización cutánea	71
Efecto sobre otros tejidos.....	71
Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)	71
Efecto sobre la cicatrización cutánea	72
Efecto sobre otros tejidos.....	73
Factor de Necrosis Tumoral (TNF).....	74
Efecto sobre la cicatrización cutánea	74
Efecto sobre otros tejidos.....	74
Factor de Crecimiento Estimulador de Colonias (CSF)	74
Efecto sobre la cicatrización cutánea	75
Efecto sobre otros tejidos.....	75
Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)	75
Efecto sobre la cicatrización cutánea	76
Efecto sobre otros tejidos.....	76
Factor de Crecimiento Hepatocítico (HGF)	76
Efecto sobre la cicatrización cutánea	76
Efecto sobre otros tejidos.....	77
<i>Posibles riesgos asociados al uso de factores de crecimiento</i>	<i>77</i>
PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF) – PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)	79
<i>Introducción.....</i>	<i>79</i>
<i>Nomenclatura de PRP vs PRGF</i>	<i>80</i>
<i>El papel de las plaquetas en el proceso de reparación/cicatrización</i>	<i>81</i>
Introducción y fisiología plaquetaria.....	81
Ontogenia plaquetaria	82
Concentración de plaquetas	82
Membrana y citoplasma plaquetario	82
Gránulos plaquetarios.....	83
Gránulos alfa (α).....	83
Gránulos densos	84
Gránulos lisosomales	84

Respuesta de las plaquetas ante el daño tisular.....	84
<i>Procedimiento para la obtención de preparados ricos en plaquetas</i>	85
Métodos manuales	87
Sistemas de centrifugación simple	87
Sistemas de centrifugación doble	88
Métodos semiautomáticos comerciales.....	89
Platelet Concentrate Collection System (PCCS® Kit) (3i-Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA).....	89
Gravitational Platelet Separation (GPS® System) (Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany)	89
Smart PReP® System (Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany)	89
Plateltex® (Plateltex, Bratislava, Slovakia)	90
Arthrex ACP® System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)	90
Obtención de PRP por aféresis	90
<i>Aplicaciones del PRP-PRGF en piel</i>	91
<i>Aplicación de PRP-PRGF en otros tejidos</i>	97
Cirugía oral y maxilofacial	97
Lesiones musculares	97
Lesiones óseas	98
Lesiones tendinosas y ligamentosa.....	98
Oftalmología	99
<i>Complicaciones en el uso de PRP-PRGF</i>	99
CÉLULAS MADRE.....	101
<i>Introducción</i>	101
<i>Clasificación de las células madre</i>	102
En función de su potencial de diferenciación	102
Células Madre Totipotenciales	102
Células Madre Pluripotenciales.....	103
Células Madre Multipotenciales.....	104
Células Madre Oligopotenciales	104
Células Madre Unipotenciales.....	104
En función de su origen	104
Células Madre Embrionarias (ESC)	104
Célula Madre Germinales (GSC)	105
Células Madre Fetales (FSC)	105
Células Somáticas o Adultas (ASC)	105
MATERIALES Y MÉTODOS	121

MATERIALES.....	123
<i>Modelo Animal</i>	124
<i>Instalaciones</i>	125
<i>Criterios de inclusión</i>	125
<i>Criterios de exclusión</i>	126
<i>Equipos</i>	127
<i>Soluciones y fármacos</i>	128
<i>Material fungible</i>	129
MÉTODOS	131
<i>Diseño experimental</i>	131
Grupos de estudio.....	131
<i>Preparación del paciente y procedimiento anestésico</i>	132
<i>Procedimiento quirúrgico</i>	134
<i>Tratamientos aplicados</i>	136
PRGF.....	136
Obtención del PRGF.....	136
Aplicación del PRGF	138
AMSC.....	139
Obtención de las AMSC.....	139
Aplicación de las AMSC.....	141
<i>Obtención y procesado de las muestras</i>	141
Tiempo de sacrificio	141
Procesado microscópico.....	142
<i>Evaluación de las muestras</i>	144
Estudio macroscópico	144
Estudio microscópico	146
Tinción Hematoxilina-Eosina.....	146
Tinción Tricrómico de Masson.....	148
<i>Estudio estadístico</i>	150
Factor tiempo.....	150
Factor Tratamiento	151
RESULTADOS	153
<i>Descripción de los animales</i>	156
Exclusión e inclusión de animales en el estudio.....	156
GRUPO AMSC: ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO	159
<i>Estudio Macroscópico</i>	159
Cicatrización Cutánea.....	160
Presencia o ausencia de infección.....	161

Color de la cicatriz.....	162
Grosor de la cicatriz	163
Retracción de la cicatriz	164
<i>Estudio Microscópico</i>	165
Epitelización Cutánea.....	165
Inflamación	167
Intensidad Inflamatoria	167
Distribución de la reacción inflamatoria	169
Angiogénesis	170
Porcentaje de colágeno	172
GRUPO AMSC+PRGF: ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO	175
<i>Estudio Macroscópico</i>	175
Cicatrización cutánea.....	176
Presencia o ausencia de infección	177
Color de la cicatriz.....	178
Grosor de la cicatriz	179
Retracción de la cicatriz	180
<i>Estudio Microscópico</i>	182
Epitelización Cutánea.....	182
Inflamación	184
Intensidad Inflamatoria	184
Distribución de la reacción inflamatoria	185
Angiogénesis	186
Porcentaje de colágeno	188
GRUPO PRGF: ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO	191
<i>Estudio Macroscópico</i>	191
Cicatrización cutánea.....	192
Presencia o ausencia de infección	193
Color de la cicatriz.....	193
Grosor de la cicatriz	195
Retracción de la cicatriz	196
<i>Estudio Microscópico</i>	197
Epitelización Cutánea.....	197
Inflamación	199
Intensidad Inflamatoria	199
Distribución de la reacción inflamatoria	201
Angiogénesis	202
Porcentaje de colágeno	204

GRUPO PLACEBO: ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL FACTOR TIEMPO.....	207
<i>Estudio Macroscópico</i>	207
Cicatrización cutánea.....	207
Presencia o ausencia de infección.....	209
Color de la cicatriz.....	209
Grosor de la cicatriz.....	211
Retracción de la cicatriz.....	212
<i>Estudio Microscópico</i>	213
Epitelización Cutánea.....	213
Inflamación.....	215
Intensidad Inflamatoria.....	215
Distribución de la reacción inflamatoria.....	216
Angiogénesis.....	217
Porcentaje de colágeno.....	219
ESTUDIO COMPARATIVO DEL FACTOR TRATAMIENTO.....	221
<i>Estudio macroscópico</i>	221
Cicatrización Cutánea.....	222
Presencia o ausencia de infección.....	224
Color de la cicatriz.....	224
Grosor de la cicatriz.....	225
Retracción de la cicatriz.....	227
<i>Estudio Microscópico</i>	228
Epitelización Cutánea.....	228
Inflamación.....	231
Intensidad Inflamatoria.....	231
Distribución de la reacción inflamatoria.....	232
Angiogénesis.....	234
Porcentaje de colágeno.....	236
DISCUSIÓN.....	239
HERIDAS CUTÁNEAS Y PROCESO DE CICATRIZACIÓN.....	241
EVALUACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	245
USO DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE GRASA (AMSC).....	249
<i>Introducción y tipos de células madre</i>	249
<i>Variables estudiadas</i>	252
USO DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (PRGF).....	257
<i>Introducción y metodologías</i>	257
<i>Variables estudiadas</i>	259
ASOCIACIÓN DE PRGF Y AMSC.....	265

<i>Introducción</i>	265
<i>Variables estudiadas</i>	266
CONCLUSIONES	271
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	275
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	279
RESUMEN	283
ABSTRACT	289
BIBLIOGRAFÍA	295

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: CLASIFICACIÓN DE LAS HERIDAS SEGÚN EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LA HERIDA Y LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.....	29
TABLA 2: CLASIFICACIÓN DE HERIDAS EN FUNCIÓN DE LA DURACIÓN Y NIVEL DE CONTAMINACIÓN.....	29
TABLA 3: CLASIFICACIÓN DE LAS QUEMADURAS SEGÚN SU PROFUNDIDAD.....	30
TABLA 4: PRINCIPALES COMPLICACIONES EN LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.....	42
TABLA 5: CLASIFICACIÓN DE LAS ÚLCERAS DE DECÚBITO EN FUNCIÓN DE SU GRADO.....	44
TABLA 6: CLASIFICACIÓN DE LOS APÓSITOS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE HERIDA.....	47
TABLA 7: FACTORES DE CRECIMIENTO QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN CUTÁNEA Y EL ORIGEN DE CADA UNO DE ELLOS.....	55
TABLA 8. INTERVENCIÓN DE LOS DISTINTOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA FASE DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN CUTÁNEA.....	77
TABLA 9: SISTEMAS COMERCIALES ALTERNATIVOS PARA OBTENCIÓN DE PRP.....	81
TABLA 10: CLASIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS GRÁNULOS ALFA DE LAS PLAQUETAS.....	83
TABLA 11: METODOLOGÍA PARA OBTENCIÓN DE PRP, Y CARACTERÍSTICAS DE CADA UNO DE ELLOS.....	91

TABLA 12. FUENTES DE OBTENCIÓN CLÍNICAS DE LAS MSC	112
TABLA 13: PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN ANIMALES.	126
TABLA 14: DISTRIBUCIÓN DE CONEJOS POR GRUPO Y TIEMPO SUPERVIVENCIA.....	132
TABLA 15: PROTOCOLO ANESTÉSICO EMPLEADO EN LOS ANIMALES.....	134
TABLA 16: ESCALA SEMICUANTITATIVA DE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN INFLAMATORIA.....	148
TABLA 17: ESCALA SEMICUANTITATIVA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA	148
TABLA 18: VALORES HEMATOLÓGICOS DE LOS ANIMALES EMPLEADOS EN LA FASE EXPERIMENTAL.....	156
TABLA 19: VALORES BIOQUÍMICOS DE LOS ANIMALES EMPLEADOS DURANTE LA FASE EXPERIMENTAL.	157
TABLA 20: DISTRIBUCIÓN DE LAS HERIDAS EN LOS ANIMALES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE SUPERVIVENCIA Y DEL TRATAMIENTO RECIBIDO.....	158
TABLA 21 : EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	160
TABLA 22: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	160
TABLA 23: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INFECCIÓN EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	161
TABLA 24 : EVALUACIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	162
TABLA 25: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	162
TABLA 26 : EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	163
TABLA 27: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	164
TABLA 28: EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	165
TABLA 29: EVALUACIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	166
TABLA 30: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	166
TABLA 31: EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	168
TABLA 32: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	168
TABLA 33: EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	169
TABLA 34: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	169
TABLA 35: EVALUACIÓN DE ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	170
TABLA 36: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	171

TABLA 37: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.	172
TABLA 38: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	172
TABLA 39: EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.	176
TABLA 40: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	176
TABLA 41: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INFECCIÓN EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.	177
TABLA 42: EVALUACIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	178
TABLA 43: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	178
TABLA 44: EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	179
TABLA 45: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	180
TABLA 46: EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	181
TABLA 47: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	181
TABLA 48: EVALUACIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	182
TABLA 49: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	183
TABLA 50: EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA RECCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	184
TABLA:51 ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA RECCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	184
TABLA 52: EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA RECCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	185
TABLA 53: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA RECCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	186
TABLA 54: EVALUACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	187
TABLA 55: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	187
TABLA 56: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.	188
TABLA 57: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	189
TABLA 58: EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	192
TABLA 59: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.	192

TABLA 60: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INFECCIÓN EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	193
TABLA 61: EVALUACIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	194
TABLA 62: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	194
TABLA 63: EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	195
TABLA 64: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	195
TABLA 65: EVALUACIÓN DE LA RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.	196
TABLA 66: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	197
TABLA 67: EVALUACIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	198
TABLA 68: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	198
TABLA 69: EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	200
TABLA 70: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	200
TABLA 71: EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	201
TABLA 72: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	201
TABLA 73: EVALUACIÓN DE ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	202
TABLA 74: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	203
TABLA 75: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	204
TABLA 76: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	204
TABLA 77: EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	208
TABLA 78: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.	208
TABLA 79: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE INFECCIÓN EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	209
TABLA 80: EVALUACIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	210
TABLA 81: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR COLOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.	210
TABLA 82: EVALUACIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	211

TABLA 83: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR GROSOR DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	211
TABLA 84: EVALUACIÓN DE LA RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	212
TABLA 85: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	212
TABLA 86: EVALUACIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	213
TABLA 87: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	214
TABLA 88: EVALUACIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	215
TABLA 89: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	215
TABLA 90: EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	216
TABLA 91: ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	217
TABLA 92: EVALUACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	218
TABLA 93: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR ANGIOGÉNESIS EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	218
TABLA 94: EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	219
TABLA 95: ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE TIEMPOS DEL FACTOR PORCENTAJE DE COLÁGENO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.....	220
TABLA 96: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	222
TABLA 97: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	229
TABLA 98: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA ANGIOGÉNESIS DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	234
TABLA 99: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.....	236

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: COMPARATIVA DE LA VASCULARIZACIÓN CUTÁNEA DEL PERRO Y GATO CON EL HUMANO.....	22
FIGURA 2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CUATRO FASES QUE TIENEN LUGAR DURANTE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA.....	38
FIGURA 3: FRACCIONES TRAS LA CENTRIFUGACIÓN DE PLAQUETAS.....	86
FIGURA 4: ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES EN LAS INSTALACIONES DE LA GRANJA DOCENTE DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA.....	125
FIGURA 5: OBTENCIÓN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE LA ARTERIA AURICULAR.....	133
FIGURA 6: RASURADO Y DESINFECCIÓN DE LA ZONA QUIRÚRGICA.....	133
FIGURA 7: ANESTESIA INHALATORIA MEDIANTE EL EMPLEO DE MASCARILLA.....	133
FIGURA 8: PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y ASPECTO FINAL DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS.....	135
FIGURA 9: DISTRIBUCIÓN DE HERIDAS CUTÁNEAS EXPERIMENTALES EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO ADMINISTRADO.....	135
FIGURA 10: EXTRACCIÓN SANGUÍNEA DE LA ARTERIA AURICULAR Y RECOLECCIÓN EN TUBOS DE CITRATO SÓDICO.....	136

FIGURA 11: CENTRIFUGACIÓN DE MUESTRAS Y ASPECTO DE LAS MISMAS TRAS LA CETRIFUGACIÓN.	137
FIGURA 12: OBTENCIÓN DE LAS DIFERENTES FASES PLASMÁTICAS Y PIPETEO BAJO CAMPANA DE FLUJO LAMINAR DE LAS MISMAS.	138
FIGURA 13: MATERIAL EMPLEADO PARA LA ACTIVACIÓN DEL PRGF.....	138
FIGURA 14: INFILTRACIÓN PERILESIONAL DEL PRGF EN HERIDAS CUTÁNEAS CORRESPONDIENTES.	139
FIGURA 15: PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE TEJIDO GRASO INGUINAL, Y ALMACENAMIENTO DE LAS MISMAS EN RECIPIENTES ESTÉRILES.....	140
FIGURA 16: PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO. DIGESTIÓN, CULTIVO Y AMPLIFICACIÓN DE AMSC. .	141
FIGURA 17: ASPECTO MACROSCÓPICO DE LAS HERIDAS A DISTINTOS DÍAS DE ESTUDIO.....	142
FIGURA 18: OBTENCIÓN DE LAS HERIDAS CUTÁNEAS PARA EL ESTUDIO MICROSCÓPICO.	143
FIGURA 19: CONSERVACIÓN DE MUESTRAS EN FORMALDEHÍDO DENTRO DE CASSETTES E IDENTIFICACIÓN DE LAS MISMAS PARA SU ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO.....	143
FIGURA 20: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS EN LA VALORACIÓN MACROSCÓPICA.	145
FIGURA 21: CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE EPITELIZACIÓN DE LAS HERIDAS EN LA VALORACIÓN MICROSCÓPICA.....	147
FIGURA 22: EVALUACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS.	149
FIGURA 23: IMÁGENES PARA EVALUACIÓN DEL ÁREA DE COLÁGENO.	150

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1: EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC EN EL TIEMPO.	161
GRÁFICA 2: EVOLUCIÓN DEL COLOR DE CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC EN EL TIEMPO.....	163
GRÁFICA 3: EVOLUCIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ DE HERIDAS DEL GRUPO AMSC EN EL TIEMPO.....	164
GRÁFICA 4: EVOLUCIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	167
GRÁFICA 5: EVOLUCIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC EN EL TIEMPO.....	168
GRÁFICA 6: EVOLUCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC EN EL TIEMPO.....	170
GRÁFICA 7: EVOLUCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL TIEMPO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	171
GRÁFICA 8: EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN EL TIEMPO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC.....	173
GRÁFICA 9: EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.....	177

GRÁFICA 10: EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.	179
GRÁFICA 11: EVOLUCIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.	180
GRÁFICA 12: EVOLUCIÓN DE LA RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.....	181
GRÁFICA 13: EVOLUCIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.....	183
GRÁFICA 14: EVOLUCIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.	185
GRÁFICA 15: EVOLUCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF EN EL TIEMPO.	186
GRÁFICA 16: EVOLUCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL TIEMPO DE HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.	188
GRÁFICA 17: EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN EL TIEMPO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF.	189
GRÁFICA18: EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.	193
GRÁFICA 19: EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ DE HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.....	194
GRÁFICA20: EVOLUCIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ DE HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.....	196
GRÁFICA 21: EVOLUCIÓN DE RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ DE HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN TIEMPO. .	197
GRÁFICA 22: EVOLUCIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.	199
GRÁFICA 23: EVOLUCIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.	200
GRÁFICA 24: EVOLUCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF EN EL TIEMPO.	202
GRÁFICA 25: EVOLUCIÓN DE ANGIOGÉNESIS EN EL TIEMPO DE LAS HERIDAS DEL GRUPO AMSC+PRGF...	203
GRÁFICA 26: EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN EL TIEMPO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PRGF.....	205
GRÁFICA 27: EVOLUCIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.....	209
GRÁFICA 28: EVOLUCIÓN DEL COLOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.	210
GRÁFICA 29: EVOLUCIÓN DEL GROSOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.	211

GRÁFICA 30: EVOLUCIÓN DE LA RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.	212
GRÁFICA 31: EVOLUCIÓN DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA EXPRESADA EN PORCENTAJE EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.	214
GRÁFICA 32: EVOLUCIÓN DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.	216
GRÁFICA 33: EVOLUCIÓN DE LA DISTRUBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO EN EL TIEMPO.	217
GRÁFICA 34: EVOLUCIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL TIEMPO DE LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO... ..	219
GRÁFICA 35: EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO EN EL TIEMPO EN LAS HERIDAS DEL GRUPO PLACEBO.	220
GRÁFICA 36: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA CICATRIZACIÓN CUTÁNEA DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	223
GRÁFICA 37: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL COLOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	225
GRÁFICA 38: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL GROSOR DE LA CICATRIZ DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	226
GRÁFICA 39: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA RETRACCIÓN DE LA CICATRIZ EN LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	227
GRÁFICA 40: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA EPITELIZACIÓN CUTÁNEA DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	230
GRÁFICA 41: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA INTENSIDAD DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	232
GRÁFICA 42: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA EN LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	233
GRÁFICA 43: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DE LA ANGIOGÉNESIS DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	235
GRÁFICA 44: COMPARACIÓN ENTRE GRUPOS DEL PORCENTAJE DE COLÁGENO DE LAS HERIDAS EN CADA UNO DE LOS TIEMPOS DE ESTUDIO.	237

LISTADO DE ABREVIATURAS

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

LISTADO DE ABREVIATURAS

A continuación se detallan todas las abreviaturas que aparecen a lo largo del documento:

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADP: Adenosín difosfato
- AFGF: Factor de Crecimiento Ácido
- AINES: Antiinflamatorios No Esteroideos
- AIUC: Asociación Italiana de Ulceras Cutáneas
- ALP: Fosfatasa Alcalina
- ALT: Alanino Aminotransferasa
- AMSC: Celulas Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ASC: Celulas Madre Adultas
- AST: Aspartato Aminotransferasa
- ATP: Adenosín Trifosfato
- BDGF: Factor de Crecimiento Derivado del Hueso

- BFGF: Factor de Crecimiento Básico
- BMSC: Células Mesenquimales Derivadas de Médula ósea
- CIPF: Centro de Investigación Príncipe Felipe
- ClCa: Cloruro Cálcico
- CH: Cicatrices Hipertróficas
- CK: Creatinina-Kinasa
- Cm: Centímetro
- CM: Células Mesenquimales
- CMG: Células Mesenquimales de Grasa
- CSF: Factor de Crecimiento Estimulador de Colonias
- CTGF: Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo
- ECM: Matriz extracelular
- EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
- EMEA: Autoridades Europeas
- ESC: Células Madre Embrionarias
- FC: Factores de crecimiento
- FDA: Administración de Drogas y Alimentación de Estados Unidos
- FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
- FSC: Células Madre Fetales
- G-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
- GH: Hormona de Crecimiento
- GGT: Gama Glutamil Transpeptidasa
- GSC: Células Madre Germinales
- HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario
- HSC: Células Madre Hematopoyéticas
- IGF: Factor de Crecimiento Insulínico
- IL: Interleucinas
- IPSC: Células Madre Pluripotenciales Inducidas
- ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular
- KGF: Factor de Crecimiento Queratinocítico
- LAP: Latency associated peptide
- LTBP: Latent TGF- B binding protein
- MCH: Hemoglobina Corpuscular Media
- MCHC: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
- MCV: Volumen Corpuscular Medio

- MMP: Metaloproteinasas de Matriz
- MSC: Células Madre Mesenquimales
- N: Tamaño de la muestra
- NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
- NO: Óxido Nitríco
- PAF: Factor Activador de Plaquetas
- PDGF B: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
- PGE: Prostaglandinas
- PGE₂: Prostaglandina E₂
- PPGF: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento
- PRFM: Matriz de Fibrina Rica en Plaquetas
- PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- PRP: Plasma Rico en Plaquetas
- RPM: Revoluciones por minuto
- SARM: Staphilococcus aureus resistente a la meticiclina
- SHT: Serotonina
- SSF: Suero Salino Fisiológico
- TGF-B: Factor de Crecimiento Transformante B
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral
- VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
- WADA: World antidoping agency

INTRODUCCIÓN

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el problema de las úlceras cutáneas en humana está siendo cada vez más importante, particularmente por el incremento en la población anciana, presentándose como patologías crónicas. Las úlceras cutáneas constituyen un problema de asistencia serio y creciente y son, frecuentemente, difíciles de tratar. Según la asociación italiana de úlceras cutáneas (AIUC), éstas cuestan al Servicio Nacional de Sanidad Italiana unos 10.000 millones de euros cada año, y una pérdida de 500,000 días de trabajo (Bernuzzi et al., 2010). Las úlceras del pie afectan al 25% de los pacientes diabéticos y suponen alrededor de un 20% del total de los gastos sanitarios (Boulton et al., 2005; Reiber and Raugi, 2005; Bernuzzi et al., 2010).

Las causas más comunes de úlceras son desórdenes vasculares (venosos o cutáneos), traumatismos, presión y diabetes. Independientemente del origen, las úlceras cutáneas se caracterizan por pérdida de tejido, incluyendo la epidermis, dermis, y en ocasiones tejido adiposo y capas musculares. La falta de reparación espontánea, en estos casos, se debe probablemente al envejecimiento (ausencia de proliferación) de la población de células madre

mesenquimales o a la incapacidad para reclutar células precursoras circulantes (Vande Berg and Robson, 2003; Boulton et al., 2005; Reiber and Raugi, 2005; Bernuzzi et al., 2010).

Existe una gran necesidad de desarrollo de nuevas acciones terapéuticas para úlceras, con el objetivo de ser económicas y aplicables a gran escala. Una de las acciones más interesantes es la que trataremos en el presente proyecto, el uso del plasma rico en factores de crecimiento y de células madre mesenquimales de grasa. El tratamiento con plasma rico en factores de crecimiento en úlceras se ha empleado desde que se conoce su efecto sobre la regeneración de tejidos mesenquimales como tendones, hueso, vasos y tejido conectivo (Crovetti et al., 2004; Mazzucco et al., 2004; Bernuzzi et al., 2010).

Uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento en Piel

Son numerosos los estudios referentes al uso de los factores de crecimiento en diversas aplicaciones. Una de las aplicaciones hace referencia a su uso en el tratamiento de diversos tipos de heridas y úlceras cutáneas (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010), (Wu et al., 2010), (Saaristo et al., 2006), (Atri et al., 1990; Herouy et al., 2000; Gilsanz et al., 2001; Margolis et al., 2001; Tarroni et al., 2002).

A principios de los 90 se observó que la presencia de factores plaquetarios autólogos en úlceras recalcitrantes inducía la formación de un tejido de granulación temprano (Atri et al., 1990). Además son numerosos los estudios que demuestran su eficacia en el tratamiento de lesiones en pacientes diabéticos (Gilsanz et al., 2001; Margolis et al., 2001; Tarroni et al., 2002; Saaristo et al., 2006).

También es interesante el trabajo de Rajkumar y colaboradores en el que indican que tras la inhibición del PDGF- β (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) se observa una disminución precoz (7 días) de la cicatrización, miofibroblastos, expresión de la fibronectina ED-Y y del colágeno tipo I (Rajkumar et al., 2006).

La curación de las heridas tiene lugar en cuatro fases bien diferenciadas y superpuestas:

- **Hemostasia:** En la que predomina la agregación plaquetaria y formación del coágulo.
- **Inflamación:** Predominio de la fagocitosis, neutrófilos y macrófagos.
- **Proliferación:** Donde se producen fenómenos de angiogénesis, producción de matriz celular y colágeno, tejido de granulación y reepitelización. Predomina el tipo celular del fibroblasto.
- **Remodelación o maduración:** Reorganización de la herida resultante en función de diversos factores internos y externos.

Evidentemente hay muchos factores implicados en el desarrollo de estos procesos, entre ellos los Factores de Crecimiento (Enoch et al., 2006b).

La importancia de los factores de crecimiento en la terapia de las heridas de diversos tipos se pone de manifiesto si analizamos los avances más recientes en el tratamiento de las mismas:

Actuación sobre la fase inflamatoria

Además de productos que inactivan las proteasas, se han utilizado Factores de Crecimiento como el G-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos) o el TGF- β (Factor de Crecimiento Transformante β). El primero de ellos obtenido por recombinación genética e inoculado por vía subcutánea, mejora la curación de heridas infectadas en el pie en diabéticos (induce la diferenciación de los neutrófilos y estimula su función, al igual que con los macrófagos). El TGF- β es quimiotáctico para los macrófagos, induce la formación de colágeno y fibronectina e inhibe la actividad metaloproteinasa (ha demostrado acelerar la curación de heridas en ensayos en animales y en heridas en pie diabético) (Singer and Clark, 1999; Robson et al., 2001).

Actuación sobre la fase de proliferación

Los fibroblastos son atraídos hacia la herida por varios Factores de Crecimiento, entre ellos el PDGF y el TGF- β . El PDGF atrae queratinocitos y promueve la formación de tejido de granulación. Se ha producido PDGF recombinante para mejorar esta fase y es el único Factor de Crecimiento de este tipo autorizado comercialmente en Reino Unido (Bauer et al., 2005; Reinke and Sorg, 2012).

El FGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico) aumenta la granulación y regeneración epidérmica en pacientes con úlceras de decúbito y quemaduras (Enoch et al., 2006b).

El VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) mejora la angiogénesis y la formación de tejido de granulación en heridas isquémicas (Roth et al., 2006; Sorg et al., 2007).

Actuación en la fase de remodelado

El EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico) es útil para la diferenciación, proliferación, migración y adhesión del queratinocito. El EGF recombinante induce la epitelización en quemados. Adicionalmente el KGF (Factor de Crecimiento Queratinocítico) también induce la proliferación y migración del queratinocito (Reinke and Sorg, 2012).

El TGF- β disminuye la deposición de colágeno en la fase proliferativa y de remodelado, reduciendo la formación de cicatriz. Se está estudiando su uso en cicatrices hipertróficas y en queloides (Enoch et al., 2006b; Berman et al., 2016).

Uso de Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en Piel

Las células madre, son un tipo especial de células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin llegar a perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas (Diekman and Guilak, 2013).

Las Células Madre Mesenquimales de grasa (AMSC) tienen características multipotenciales, y se pueden obtener de tejido adiposo (Black et al., 2008; Yarak and Okamoto, 2010).

Las AMSC son buenas candidatas para el tratamiento de diversas patologías, gracias a su fácil obtención, bajo riesgo de formación de tumores, ausencia de rechazo por parte del individuo y a que poseen propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias (Lisiany, 2013).

En medicina humana se han empleado para tratar defectos en tejidos blandos, lesiones en quemados, cicatrices y regeneración de diferentes tejidos dañados (Teng et al., 2014; Fu et al., 2016; Lerman et al., 2016).

En medicina veterinaria, a nivel experimental y clínico, se han empleado para acelerar la cicatrización de heridas. En el estudio de Griffeth y colaboradores, empleaban el uso de células madre mesenquimales de grasa y Plasma Rico en Plaquetas (en asociación o de forma individual) para el tratamiento de heridas en piel de delfines (Griffeth et al., 2014). Luo y colaboradores, inyectaban MSC derivadas de cordón umbilical en defectos completos realizados en piel de ratones y mostraron una mejora significativa de la cicatrización dando lugar a una curación más rápida (Luo et al., 2010).

A pesar de todos los estudios publicados, pensamos que no existe ninguna publicación que aborde la cicatrización cutánea evaluando de manera individual y combinada los dos tratamientos. Por ello se ha planteado la realización de este estudio experimental.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y actúa como barrera de defensa frente a microorganismos. Este hecho explica la elevada casuística de lesiones dérmicas traumáticas tanto en medicina humana como en medicina veterinaria, ya sean debidas a agentes externos o postquirúrgicos (Theoret, 2009).

La reparación de heridas cutáneas es un proceso complejo que incluye diferentes fases (hemostasis, inflamación, proliferación y remodelación) en las que intervienen varios tipos celulares, factores de crecimiento y citoquinas con el objetivo de conseguir el cierre de la herida y preferiblemente la reparación de los tejidos. El incremento de la esperanza de vida lleva a un incremento de patologías crónicas degenerativas que pueden afectar a la piel como pueden ser la diabetes, endocrinopatías, entre otras. Esta situación eleva considerablemente el gasto sanitario y obliga a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de las lesiones cutáneas.

Hasta el momento, las terapias empleadas de manera más frecuente para el tratamiento de éstas lesiones cutáneas independientemente de su origen, van encaminadas a paliar el dolor y la inflamación de la zona afectada. Como son el uso de curas húmedas o secas, o incluso los abordajes quirúrgicos en los casos más complicados, lo que se traduce en elevados costes económicos tanto en tratamientos médicos como quirúrgicos.

El uso de factores de crecimiento y de células madre dentro del campo de la medicina regenerativa se encuentra hoy en día en el punto de mira. Cada vez más se tiende a ser menos traumático a la hora de reparar lesiones tisulares y se opta por terapias regenerativas, sencillas de obtener y a la vez inocuas. En el caso de los factores de crecimiento están comenzando a convertirse en una herramienta indispensable y fundamental para el avance en éste campo.

A la vista de los resultados obtenidos por otros autores en el tratamiento de heridas cutáneas con PRGF y células madre y ante el potencial terapéutico de las mismas, nuestra hipótesis de trabajo es que la aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), Células Madre Mesenquimales de Grasa (AMSC) y la asociación de ambos tratamientos en infiltraciones perilesionales de heridas cutáneas experimentales de espesor completo, producirá una aceleración de la cicatrización, disminuyendo así los tiempos de curación de dichas heridas.

OBJETIVOS

Con la hipótesis de trabajo anteriormente expuesta nos planteamos un estudio experimental con objetivo general de demostrar la efectividad de la asociación del tratamiento con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) y Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) en la resolución de heridas cutáneas estandarizadas en conejos. Para ello, valoraremos de manera separada la evolución de las heridas tanto macroscópica como microscópicamente a lo largo de diferentes tiempos de estudio.

Como resultado, nos planteamos desarrollar varias fases en este proyecto para poder cubrir los siguientes objetivos específicos, que han de guiar el desarrollo de nuestro estudio:

- Valorar la efectividad del tratamiento con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) y la combinación de ambos tratamientos sobre heridas cutáneas estandarizadas, mediante el estudio macroscópico y microscópico de las mismas. Para ello, se empleará un modelo

experimental de conejo. La valoración del efecto de estas nuevas terapias regenerativas se llevará a cabo mediante:

- Determinación del porcentaje de cicatrización e epitelización de las heridas cutáneas experimentales a lo largo de los tiempos de estudio en los diferentes grupos de estudio.
 - Valoración del aspecto estético macroscópico de cada una de las heridas cutáneas a lo largo de tiempo.
 - Valoración de la intensidad y distribución de la reacción inflamatoria a nivel microscópico en los distintos grupos de estudio.
 - Evaluación de la angiogénesis de cada una de las heridas cutáneas mediante un estudio histológico.
 - Determinación del porcentaje de colágeno en cada una de las heridas cutáneas mediante el uso de la tinción tricrómico de masson.
- Por último, nos gustaría potenciar el uso de nuevas terapias y asociaciones terapéuticas junto a la cura húmeda mejorando su eficacia, rendimiento y facilidad de aplicación en heridas clínicas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

La piel

Anatomía y fisiología cutánea

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y barrera anatómica y fisiológica entre el animal y el ambiente. Representa junto con el pelo y el tejido subcutáneo el 24% del peso total en cachorros y el 12% en perros adultos (Amat et al., 2009). En el caso del humano tiene una extensión de entre 1,4m² y 1,8m², mientras que en el recién nacido su extensión es el triple en relación con el peso corporal (Magaña García and Magaña Lozano, 2011). La superficie cornificada externa, el estrato córneo, permite mantener un elevado grado de hidratación (Pavletic M, 2010c).

El espesor cutáneo de la piel va a depender del grosor de la dermis ya que el de la epidermis se mantiene constante en todo el cuerpo a excepción de áreas como las almohadillas y la trufa. El grosor cutáneo medio en perros de 0,5 a 5mm, 0,4 a 2mm en gatos (Amat et al., 2009; Noli and Ghibaud, 2010).

De dorsal a ventral el espesor de la piel disminuye sobre el tronco y en las extremidades disminuye de proximal a distal. Encontramos una piel más delgada en pabellones auriculares y zonas perianal, inguinal y axilar y más gruesa en la zona dorsal del tórax, cuello, frente, cadera y base de la cola (Amat et al., 2009; Noli and Ghibaudo, 2010).

Ontogenia

La piel posee un origen ectodérmico por lo que, en un inicio, la piel del embrión está formada por una única capa de células ectodérmicas y una dermis formada por células mesenquimatosas. Mas tarde, el tegumento ectodérmico se desarrolla en dos capas bien diferenciadas (el estrato basal y el peridermo externo) y progresivamente tras repetidas divisiones, se van formando el resto de estratos celulares que conforman la epidermis (Visscher and Narendran, 2014).

En la dermis las primeras fibras que aparecen son las de colágeno y tras ellas las de elastina. Es característico el aumento en grosor de la dermis, de su cantidad de fibras, la transición de las células mesenquimatosas en fibroblastos y la disminución de la sustancia fundamental (Meruane and Rojas, 2012).

Durante la segunda mitad de la gestación tiene lugar la formación de las células grasas que encontraremos en el tejido subcutáneo a partir de células mesenquimatosas precursoras fusiformes. Por último, del estrato germinativo embrionario se forman los embriones pilosos, que son los que más tarde darán lugar a los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Los primeros pelos en aparecer son las vibrisas (bigotes) y los pelos táctiles, seguidos de los pelos corporales de la cabeza con progresión hacia la zona caudal del cuerpo (Meruane and Rojas, 2012).

Funciones de la piel

Son múltiples las funciones de la piel debido a su gran complejidad estructural, de forma que nos limitaremos a detallar las principales funciones cutáneas (Pavletic M, 2003; Amat et al., 2009; Pavletic M, 2010c) :

- **Producción de Vitamina D.** Es producida gracias a la estimulación por parte de la radiación solar.
- **Reservorio de electrolitos, agua, grasas, hidratos de carbono, proteínas y vitaminas.**
- **Preservar la integridad del organismo.** Se consigue evitando que el cuerpo pierda agua, electrolitos y otros componentes imprescindibles para el organismo.
- **Receptor sensorial.** Percibe el sentido del tacto, presión, vibración , dolor, calor y frío.

- **Barrera protectora ambiental.** Actúa como una barrera externa que nos protege frente a agentes químicos externos y radiaciones nocivas.
- **Protección y termorregulación.** Proporciona protección frente a traumatismos mecánicos, y aísla del frío mediante el suministro sanguíneo, manto piloso, las glándulas sudoríparas y el tejido adiposo subcutáneo.
- **Efecto antimicrobiano.** Gracias a la composición de su capa hidrolipídica la cual impide la entrada de gérmenes y por lo tanto limita su crecimiento.
- **Acción inmunológica.** Las células inmunocompetentes de la piel actúan frente a procesos infecciosos y neoplásicos.
- **Producción de anexos.** Formación del pelo, uñas, cascos, cuernos, plumas y estrato córneo de la epidermis.
- **Reflejo del estado de salud.** En la piel no solo se reflejan los procesos patológicos, también observamos los que son primarios a en otras regiones como las endocrinopatías o compartidos con otros tejidos.
- **Flexibilidad y movimiento.** La gran elasticidad de la piel permite que el mamífero pueda moverse libremente y mantener la forma.
- **Pigmentación.** Previene las lesiones fotoinducidas o agravadas por la radiación solar, además de determinar el color de la piel y manto.
- **Función secretora.**

Histología y Estructura cutánea

La piel se compone de tres capas bien diferenciadas: la epidermis (la más superficial y externa), la dermis justo por debajo que se adhiere a las estructuras subyacentes como el músculo y el hueso, y la hipodermis o también llamada tejido subcutáneo, que sería la capa más profunda de las tres. Entre la epidermis y la dermis encontramos la membrana basal (Bacha and Bacha, 2001; Hargis and Ginn, 2012).

Epidermis

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado queratinizado (Bacha and Bacha, 2001). Se compone de distintas capas de células (entre 2 y 5 en perro y gato). Son cuatro los distintos tipos de células que podemos encontrar en la epidermis: melanocitos, queratinocitos, células de Langerhans y células de Merkel, todas estas células están unidas entre sí y a la membrana basal mediante desmosomas y hemidesmosomas. Como regla general, la epidermis es más gruesa en áreas con menos cantidad de pelo, y es más fina en aquellas áreas que con gran cantidad de

pelo. La epidermis más gruesa la encontramos en la nariz y en las almohadillas (Al-Bagdadi, 2013).

Estrato basal

Consiste en una capa única de células cuboides a cilíndricas que descansan sobre la membrana basal adyacente a la dermis (Bacha and Bacha, 2001). El estrato basal está formado por queratinocitos, melanocitos, células de Merkel y células de Langerhans (células presentadoras de antígeno). Los queratinocitos poligonales se encuentran sobre la membrana basal que separa la dermis de la epidermis. Los melanocitos tienen la función de aportar pigmentación a la piel y al pelo mediante la melanina que se sintetiza en los melanosomas. Éstos melanocitos también poseen funciones inmunológicas, de fotoprotección y eliminación de radicales libres. Existe un promedio de un melanocito por cada 10 a 20 queratinocitos (Pavletic M, 2010c; Zhang and Michniak-Kohn, 2012).

Estrato espinoso

Lo forman los queratinocitos que provienen del estrato basal, su grosor es variable, puede tener un espesor de 1 a 2 capas de células y siempre se vuelve más gruesa en plano nasal, almohadillas plantares y uniones mucocutáneas. Sus células poligonales se vuelven escamosas a medida que se acercan a la superficie (Bacha and Bacha, 2001; Amat et al., 2009).

Estrato granuloso

Este estrato está presente de forma variable en la piel con pelo de 1-2 capas y en la piel glabra (sin pelo) o en el infundíbulo de los folículos pilosos puede alcanzar hasta 4-8 capas. Las células que encontramos en dicho estrato son queratinocitos planos y basófilos y contienen núcleos contraídos y grandes gránulos de queratohialina los cuales intervienen en la queratinización. Contiene también filagrina que alinea los filamentos de queratina y proporciona hidratación al estrato córneo y loricrina que está involucrada en la unión de los filamentos de queratina entre sí (Nemes and Steinert, 1999).

Estrato córneo

Es la capa más superficial y por lo tanto la más externa de la epidermis, compuesta por células queratinizadas escamosas muertas que se desprenden desde la superficie (Bacha and Bacha, 2001).

Se trata de una capa lipídica con espesor de 1 a 9 células, que ejerce una acción protectora química frente a patógenos externos, ya que contiene sales inorgánicas, interferón, albúmina, transferrina, complemento, glucocorticoides e inmunoglobulinas (Harding, 2004).

Membrana basal

Como hemos comentado con anterioridad se trata de la zona de unión entre la dermis y la epidermis. Se trata de una estructura importante ya que mantiene la arquitectura del tejido e interviene en el proceso de cicatrización de las heridas (Breitkreutz et al., 2009).

Dermis

La dermis, también llamada corion, la encontramos situada justo por debajo de la epidermis, su estructura aporta elasticidad y resistencia a la piel y presenta un grosor superior al de la epidermis. Su composición se basa en células, fibras y sustancia fundamental amorfa, el 90% de las fibras que componen la dermis son colágeno. La sustancia fundamental amorfa se constituye fundamentalmente por agua, proteínas plasmáticas, electrolitos y mucopolisacáridos. Se trata del material que rellena los espacios entre los componentes fibrosos y celulares de la dermis, además de ser responsable de la turgencia de la piel por su capacidad de captar agua. También encontramos en la dermis anejos cutáneos como las glándulas y folículos pilosos, vasos sanguíneos y linfáticos, el músculo erector del pelo y terminaciones nerviosas (Kawasumi et al., 2013; Maquart and Monboisse, 2014).

La dermis del perro y el gato se divide en dos estratos, el estrato profundo reticular y el estrato superficial papilar. El estrato papilar y superficial se compone de tejido conjuntivo superficial, delgado y rico en células y vasos (contiene numerosos capilares), mientras que el estrato reticular es la capa más profunda y gruesa, es rica en fibras y aporta firmeza al tejido conjuntivo cutáneo, contiene los anexos cutáneos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La vascularización de la dermis es de gran importancia para la cicatrización de las heridas y desde el punto de vista inmunológico (Pavletic M, 2003).

Las células propias de la dermis son los fibroblastos que se encargan de sintetizar las fibras y la sustancia fundamental. Las células móviles tienen una importante función defensiva y son los mastocitos, histiocitos/macrófagos, las células dendríticas dérmicas y los linfocitos. Las fibras de colágeno representan el elemento más importante de la dermis y además le aportan su firmeza mecánica característica. En la piel destacan los tipos de colágeno I, III, V y VI a nivel intersticial, y los tipos IV y VII en la membrana basal (Hargis and Ginn, 2012).

El grosor de la piel está relacionado directamente con la capa dérmica y varía dependiendo del sexo, raza, área corporal y especie. En pieles gruesas, la dermis habitualmente presenta un grosor superior a 1mm, mientras que en pieles más finas, su grosor es inferior a 1mm. Tanto en el perro como en el gato, la piel más gruesa la encontramos sobre la cabeza y zona dorsal del

cuello, la espalda y el sacro. La piel más fina se extiende a lo largo de la zona ventral de la superficie corporal, zona medial de las extremidades, y superficie interna de los pabellones auriculares (Foster and Foil, 2003; Pavletic M, 2003, 2010c).

Tipos Celulares de la Dermis

En la dermis vamos a encontrar los siguientes elementos celulares: los fibroblastos, los cuales están presentes en todo su espesor, los melanocitos y mastocitos, que se encuentran cerca de los vasos sanguíneos, y por último, otras células que también observamos, aunque en menor concentración, son los eosinófilos, neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas e histiocitos (Noli and Ghibaudo, 2010; Maquart and Monboisse, 2014).

Fibras Dérmicas

Las fibras dérmicas las forman los fibroblastos y presentan importantes diferencias respecto a la dermis superficial y profunda. La dermis superficial contiene fibras de colágeno delgadas, ordenadas de forma laxa y distribuidas irregularmente, el número de fibras de elastina es elevado y éstas son finas, lo que conforma una dermis menos densa. La dermis profunda, contiene fibras de colágeno más gruesas que se distribuyen de forma paralela a la superficie, y una menor cantidad de fibras de elastina (Scott et al., 2001; Al-Bagdadi, 2013).

Las fibras de colágeno son las que se presentan en mayor número, suponen el 90% de las fibras y el 80% de la matriz extracelular. Tal y como se ha mencionado anteriormente con brevedad, existen diversos tipos de colágeno; el colágeno tipo I, III y V lo encontramos principalmente en la dermis, siendo el tipo I el más abundante (87%). Los tipos I, III, V y VI se distribuyen de forma homogénea por toda la dermis, y específicamente los tipos III y V alrededor de los vasos sanguíneos. Los colágenos tipo IV, V y VII se encuentran en la membrana basal (Scott et al., 2001).

Sustancia Fundamental

Se trata de la sustancia que ocupa los espacios intersticiales, permitiendo el paso de electrolitos, células y nutrientes hasta la epidermis la cual es avascular. Se compone de proteoglicanos, principalmente ácido hialurónico y sulfato de condroitina, y está producida por los fibroblastos. Éstos promueven el almacenamiento y homeostasis del agua, aportan lubricación, una estructura de sostén, y favorecen la orientación, el crecimiento y la diferenciación del colágeno (Hargis and Ginn, 2012; Al-Bagdadi, 2013).

También encontramos una importante glucoproteína de superficie, la fibronectina, la cual interviene en el proceso cicatricial de heridas, en la integridad y permeabilidad vascular y en la fagocitosis entre otras funciones (Amat et al., 2009).

Vasos Sanguíneos

El desarrollo embriológico de todos los vasos sanguíneos de cuerpo proviene del mesodermo esplácnico del embrión, siendo el primer gran sistema en llevar a cabo su desarrollo embriológico. El endotelio será formado por las células de la periferia, mientras que las células hemáticas primitivas las formarán las células del centro (García and Lozano, 2003).

Podemos diferenciar claramente tres sistemas vasculares cutáneos: el plexo superficial o subpapilar, el plexo medio o cutáneo y el plexo profundo, subcutáneo o subdérmico. En el perro existen variaciones en determinadas zonas como las almohadillas plantares, el oído externo, la nariz, los labios, y los párpados, entre otras (Pavletic M, 2003, 2010c; Hargis and Ginn, 2012).

El plexo profundo es la red vascular más grande que encontramos en la piel, está formado por ramificaciones de vasos cutáneos directos que se encuentran en el músculo cutáneo o panicular y se localiza entre la dermis y tejido subcutáneo. Estas ramificaciones se dirigen hacia arriba para vascularizar a los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y el músculo erector del pelo (Pavletic M, 2010c; Al-Bagdadi, 2013).

Una importante diferencia con respecto al perro es que, en personas, cerdos y simios, los vasos musculocutáneos nutren la piel de manera primaria y discurren de forma perpendicular a la superficie cutánea, en cambio, los vasos cutáneos directos responsables de nutrir la piel de gatos y perros discurren de forma paralela a la piel (Amat et al., 2009).

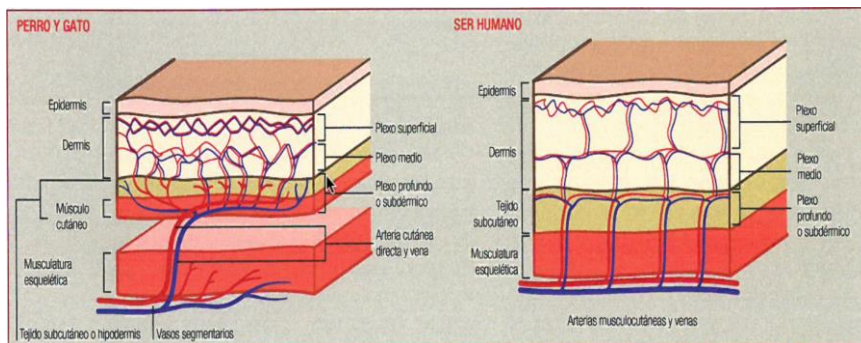
En las zonas donde encontramos el músculo panicular, el plexo profundo se sitúa tanto a nivel superficial como profundo respecto del mismo. Dicho plexo presenta una gran importancia para la viabilidad de la piel. Durante las cirugías en las que abordamos la piel debemos llegar al plano fascial, por debajo de la musculatura cutánea, con el fin de no dañar dicho plexo. En aquellas zonas en las que no existe músculo cutáneo, como en la zona distal y media de las extremidades, el plexo subcutáneo o profundo discurre por la superficie profunda de la dermis, con lo que los cirujanos debemos profundizar bien bajo la superficie dérmica para conseguir conservar su integridad (Cheryl S, 2009). En un estudio experimental sobre colgajos pediculados en el perro se comprobó que la preservación de músculo panicular garantizaba el éxito del colgajo al conservar el plexo subdérmico, mientras que su rotura suponía la necrosis del colgajo pediculado (Pavletic M, 2010c).

Los vasos del plexo profundo se continúan con ramificaciones a través de la dermis del plexo medio, cuya función va a ser nutrir las glándulas sebáceas y reforzar la red alrededor de los folículos pilosos, músculos erectores y glándulas tubulares (Scott et al., 2001; Hargis and Ginn, 2012).

Por último, encontramos el plexo superficial, que se comunica con las ramas ascendentes del plexo medio, se encuentra en la superficie más externa de la dermis, sus ramas irrigan la zona basal de la epidermis y la porción superior de los folículos pilosos. Curiosamente el plexo superficial está poco desarrollado en el perro y en el gato, al contrario de lo que sucede en el hombre, cerdo y simio, éste hecho explica que el perro raramente desarrolle ampollas cutáneas a consecuencia de quemaduras superficiales (Hargis and Ginn, 2012; Al-Bagdadi, 2013).

La piel del hombre y del cerdo está más vascularizada que la del perro o gato, ya que a menor densidad de pelo, mayor importancia tiene la termorregulación (Foster and Foil, 2003; Amat et al., 2009). En la figura 1 podemos apreciar diferencias anatómicas básicas entre la vascularización de los carnívoros y el humano.

Figura 1: Comparativa de la vascularización cutánea del perro y gato con el humano (Amat et al., 2009).



Vasos Linfáticos

Tienen su origen en las ramificaciones capilares de la dermis superficial y alrededor de los anexos. Juegan un papel importante en la nutrición, ya que controlan la microcirculación de la piel. Además se encargan de eliminar los detritus derivados del deterioro de la piel y de recuperar proteínas y células desde los tejidos al torrente sanguíneo (Young and Heath, 2004).

Inervación

Se trata de un plexo subepidérmico, cuyas fibras nerviosas están asociadas a vasos sanguíneos, órganos terminales especializados, folículos pilosos, glándulas sebáceas y músculo erector del pelo. Su objetivo principal es la percepción sensorial de tacto, calor, frío, dolor y ayudan a la supervivencia y correcto funcionamiento de la epidermis (Hargis and Ginn, 2012).

Encontramos distintos tipos de receptores en la piel, los termorreceptores (de frío y de calor), los mecanorreceptores (sensitivos al movimiento) y los nociceptores (receptores de dolor clásico y receptores que participan en el prurito y la hiperalgesia). Las señales internas y externas de la

piel son enviadas hacia el sistema nervioso central mediante un grupo de receptores terminales (Foster and Foil, 2003; Pavletic M, 2003; Amat et al., 2009).

Hipodermis

La hipodermis o tejido subcutáneo está formado por tejido adiposo y conectivo laxo. Representa la capa más profunda de la piel, y tiene un origen mesenquimatoso. Sus células, los adipocitos, son generalmente de forma redondeada, con el núcleo desplazado hacia la periferia y contienen un citoplasma lleno de lípidos. Está constituida por lobulillos delimitados por tabiques de tejido conjuntivo que se continúan con la dermis reticular, y en ellos están situados los vasos y los nervios (Magaña García and Magaña Lozano, 2011; Hargis and Ginn, 2012).

En ciertas zonas del cuerpo, la hipodermis está ausente, como por ejemplo en los labios, ano, párpados y oído externo, esto se traduce en un contacto directo entre la dermis y la musculatura y fascia, en éstas zonas. El grosor de ésta capa varía según la región de la piel, y sus funciones van a ser principalmente aislar el calor, promover el desplazamiento de la piel y crear una reserva energética (Hargis and Ginn, 2012; Al-Bagdadi, 2013).

Microscopicamente podemos diferenciar dos capas: el estrato adiposo a nivel superficial y más profundamente el estrato fibroso, el cuál incluye al músculo cutáneo. Las fibras del músculo cutáneo se extienden transversalmente de forma irregular y atraviesan la dermis, permitiendo que la piel tenga movimientos voluntarios (Pavletic M, 2003; Amat et al., 2009).

Anejos Cutáneos

Los anejos cutáneos de la piel tienen origen ectodérmico y son: los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas. Otras glándulas cutáneas son las glándulas mamarias, glándulas perianales, los sacos anales y la glándula de la cola (Bacha and Bacha, 2001; Pavletic M, 2003, 2010c; Hargis and Ginn, 2012; Al-Bagdadi, 2013).

El Pelo y el Folículo Piloso

El folículo piloso es una evaginación de la epidermis en la dermis, es una estructura que se encarga de producir pelo. Éstos folículos pilosos se encuentran en la dermis pero también se extienden hacia el tejido subcutáneo (Scott et al., 2001; Pavletic M, 2003).

La composición de los folículos pilosos se basa en queratinocitos muertos y diferenciamos dos partes: el tallo, que es la parte que sobresale de la piel, y la raíz, que es la parte que queda interna dentro del folículo piloso (Dellman, 1993; Scott et al., 2001).

Generalmente la forma del pelo depende de la forma del folículo, por lo que folículos rectos formarán pelos rectos. Tras el nacimiento no se suelen formar nuevos folículos pilosos y crecen de forma oblicua respecto a la epidermis. Los folículos pilosos son compuestos en los carnívoros, y simples en omnívoros y herbívoros. El manto de perros y gatos ésta formado por pelos primarios, con función protectora y de cobertura, y pelos secundarios que conforman el subpelo. Por norma general los pelos primarios son de mayor grosor que los pelos secundarios (Banks, 1993; Al-Bagdadi, 2013).

En los perros encontramos folículos pilosos agrupados en un folículo central primario, acompañado de glándula sebácea, glándula sudorípara apocrina y músculo erector, y dos folículos laterales secundarios con orificios independientes de los cuales emergen pelos secundarios (Amat et al., 2009).

El crecimiento del pelo varía entre especies y se ve afectado por la estación del año, siendo más rápido en invierno, y como norma general, el pelo en razas de pelo corto tarda unos 130 días en crecer, mientras que en razas de pelo largo como podría ser un afgano podría tardar hasta 18 meses. Como ejemplos, se ha visto que en beagles machos el crecimiento medio del pelo es de 0,4mm/día en invierno, y de 0,34mm/día en verano, mientras que en galgos (pelo largo) se vió que existía una velocidad de crecimiento de 0,18mm/día en otoño y 0,04 mm/días en verano (Scott et al., 2001; Pavletic M, 2003, 2010c).

En cambio, en el caso del humano, el pelo de la piel cabelluda crece cerca de 0,3mm diariamente, lo que se traduce en un centímetro (cm) al mes. El clima cálido estimula el crecimiento del pelo, aunque este puede estar afectado por factores endocrinos, nutricionales, y de edad del individuo, por ejemplo en la vejez el pelo crece muy poco, y en jóvenes y niños, el crecimiento es más rápido. También existen diferencias entre sexo, en la mujer el pelo de la cabeza crece más rápidamente que en el hombre, y en lo que se refiere al vello axilar ocurre a la inversa (Magaña García and Magaña Lozano, 2011).

El desarrollo del pelo tiene lugar en diferentes fases: encontramos la fase de crecimiento activo o generativa (anágena), la fase en la que el folículo entra en su periodo de degeneración parcial, denominada fase catágena, y por último encontramos una fase de inactividad, denominada fase telógena. Existe una pérdida constante de pelo, que simultáneamente es reemplazado por nuevo pelo (Al-Bagdadi et al., 1977; Scott et al., 2001; Magaña García and Magaña Lozano, 2011; Hargis and Ginn, 2012).

Las características del manto en perros y gatos varía en función de el área en la que se encuentre del cuerpo. Habitualmente su manto de pelo es más grueso sobre la zona del dorso y

laterales del cuerpo, mientras que el pelo en el interior de los pabellones auriculares, zona ventral del abdomen, flanco y zonas de la cola es más fino (Pavletic M, 2010c).

Anatómicamente los folículos pilosos los dividimos en tres partes: El infundíbulo, el istmo y el segmento inferior. El infundíbulo se extiende desde el orificio del folículo hasta la entrada del conducto de la glándula sebácea, el istmo va desde el mismo conducto de la glándula hasta el origen del músculo erector del pelo, y finalmente, el segmento inferior se extiende desde el istmo hasta la base del folículo (Foster and Foil, 2003; Castellanos et al., 2005).

Respecto al pelo, podemos diferenciar tres estructuras: la médula que es la estructura más interna, la corteza que es la capa intermedia, y la cutícula que sería la capa más externa del pelo, que sería responsable de proteger a la corteza (Scott et al., 2001).

Glándulas Cutáneas

Las estructuras glandulares de la piel la forman las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas, las glándulas de la cola, los sacos anales, las glándulas mamarias y las glándulas perianales.

Glándulas sebáceas

Se trata de glándulas exocrinas formadas por células productoras de lípidos que producen una sustancia oleosa que sale por el canal pilosebáceo para mantener la piel y el pelo suave y flexible y para protegerla de la deshidratación y de la excesiva humedad. Dichas glándulas están muy desarrolladas por el cuello, dorso y cola del perro (Pavletic M, 2010c; Hargis and Ginn, 2012).

La secreción oleosa de las glándulas sebáceas está bajo control hormonal. Además de actuar como barrera física, la emulsión sebo-sudorípara también actúa como barrera química, ya que determinados ácidos grasos de sebo presentan acciones antimicrobianas. Ésta película también aporta lustre al pelo, por lo que nos ayuda a detectar estados de enfermedad o desnutrición, observándose un pelaje seco (Lovell and Getty, 1957; Foster and Foil, 2003; Amat et al., 2009; Al-Bagdadi, 2013).

Las glándulas perianales son glándulas sebáceas modificadas que se encuentran en la unión mucocutánea de del ano (Lovell and Getty, 1957; Pavletic M, 2003).

Glándulas Sudoríparas

Las glándulas sudoríparas poseen una naturaleza apocrina y ecrina, por lo que podríamos decir que existen dos tipos de glándulas sudoríparas (Castellanos et al., 2005).

Las glándulas sudoríparas son grandes y simples. Son estructuras tubulares o saculares que poseen una porción secretora y un conducto recto. Su conducto excretor se abre dentro del canal piloso en el infundíbulo por debajo de la glándula sebácea. Las encontramos dispersas en la piel con pelo. Las glándulas sudoríparas ecricinas son más pequeñas, tubulares y su parte secretora tiene forma de ovillo y se localiza en la dermis profunda y en la región subcutánea de las almohadillas. Su conducto excretor se abre a la superficie de la piel (Banks, 1993; Pavletic M, 2010c; Al-Bagdadi, 2013).

La secreción de las glándulas sudoríparas posee propiedades feromonales y antimicrobianas, siendo rica en pigmentos y lípidos. En perros y gatos no participan activamente en el mecanismo de termorregulación, pero sí protegen la piel de incrementos excesivos de temperatura. Este hecho es una gran diferencia con los humanos, ya que para ellos las glándulas sudoríparas son de vital importancia para evaporar el calor y así poder bajar las altas temperaturas corporales (Pavletic M, 2003; Castellanos et al., 2005; Al-Bagdadi, 2013).

Otras Glándulas especializadas

Glándula mamaria

Son glándulas apocrinas tubuloalveolares y compuestas. Sufren numerosas modificaciones durante la gestación y después de la lactancia en la hembra (Pavletic M, 2003, 2010c).

Sacos Anales

Los sacos anales tienen un epitelio fino estratificado escamoso que incluye glándulas sebáceas y apocrinas (Dellman, 1993; Al-Bagdadi, 2013).

Glándula de la Cola

Se trata de un área oval sobre el dorso de la cola, a nivel de la 5ª a 7ª vértebra coccígea en el perro. Carece de función y solo la observamos en el 5% de los machos, aunque está presente en la histología de la mayoría de ellos. Puede colaborar en el reconocimiento olfatorio de las especies (Scott et al., 2001).

Cicatrización de Heridas Cutáneas

Introducción a las heridas cutáneas

Una herida cutánea la podemos definir como la pérdida o rotura de la continuidad normal anatómica y celular de la estructura de la piel, con extensión, forma y profundidad variable (Lazarus et al., 1994). La tolerancia a la lesión varía en función del tipo de tejido. La tolerancia a lesiones cutáneas en perros y gatos es excelente gracias a su capacidad de vascularización y elasticidad. Los tratamientos de éstas heridas variarán en función del tipo de herida cutánea (Waldron and Zimmerman-Pope, 2003).

La causa de la herida habitualmente nos determina la extensión del daño tisular, dos ejemplos claros serían los siguientes: una lesión cutánea con un objeto punzante causaría una herida sin pérdida de tejido, en cambio, una avulsión de la piel de las extremidades a consecuencia de un atropello, resultará en una pérdida de tejido circundante importante. Éstos dos heridas también presentarán un grado de contaminación diferente (White, 1999; Waldron and Zimmerman-Pope, 2003; Theoret, 2009).

Las heridas son resultado de la absorción de energía transferida al cuerpo, independientemente de su origen. La gravedad de la herida va a depender de la fuerza de la energía, de como esta energía se disperse por el cuerpo y del tipo de tejidos que la absorban. Son múltiples las causas que pueden dar lugar a heridas, incluyendo mordeduras, accidentes de tráfico, laceraciones con objetos punzantes, heridas quirúrgicas, patologías endocrinas (Theoret, 2009; Pavletic M, 2010a).

Denominamos erosión a aquellas heridas que alteran la integridad de la piel, pero el defecto epidérmico no traspasa la membrana basal, y estas erosiones curan sin dejar cicatriz. Cuando existe una pérdida de continuidad de la epidermis y exposición de la dermis, esta lesión se denomina úlcera y cura dejando cicatriz. Por lo que es muy importante evaluar el tipo de herida ante la que nos encontramos, y con ello poder elegir un tratamiento adecuado (Amat et al., 2009).

Clasificación de Heridas

Inicialmente las heridas pueden ser abiertas o cerradas. En el caso de las heridas abiertas, pueden ser clasificadas más en detalle según su profundidad, duración y etiología. La clasificación junto con la etiología de la herida nos aporta las directrices generales para el tratamiento de las heridas abiertas (Waldron and Zimmerman-Pope, 2003; Pavletic M, 2010b).

Según su profundidad

Con respecto a la profundidad de la herida, la podemos clasificar en los siguientes tipos (Kolata et al., 1974; White, 1999; Pavletic M, 2010a):

- **Erosión:** La herida solo afecta a la epidermis.
- **Abrasión:** Se trata de heridas cutáneas producidas por mecanismos de fricción, con afección tanto de la epidermis como de la dermis. Se comportan como quemaduras.
- **Avulsión o Heridas por arrancamiento:** En éste caso el agente traumático actúa arrancando los tejidos de forma parcial o completa.
- **Incisión:** Heridas producidas por instrumentos de hoja afilada y cortante. La gravedad de la herida depende de la longitud y profundidad del corte, aunque suele tratarse de heridas con bordes limpios y sin contornos tortuosos.
- **Laceración:** Formada por una herida irregular producida por un desgarramiento de tejido. El daño al tejido superficial y profundo es variable.

- **Herida punzante:** Producidas por agentes traumáticos puntiagudos, suelen crear una solución de continuidad externa mínima, y en ocasiones puntiforme, mientras que la profundidad que alcanzan suele ser mayor.
- **Contusión:** Lesión traumática de la piel, en la que ésta conserva su integridad, pero existe una rotura de vasos sanguíneos. Clínicamente cursa con dolor, inflamación y hematoma.

Según la duración y grado de contaminación

Según la duración de la herida y el grado de contaminación de la misma, la podremos clasificar en tres tipos, atendiendo a la relación entre tiempo de exposición de la herida y contaminación bacteriana como se expone a continuación en la tabla 1 (White, 1999; Hosgood, 2003):

Tabla 1: Clasificación de las heridas según el tiempo de exposición de la herida y la contaminación bacteriana.

Tipo 1	Laceraciones limpias con duración de entre 0 y 6 horas y con mínima contaminación bacteriana
Tipo 2	Laceraciones con duración de entre 6 y 12 horas y con moderada contaminación bacteriana
Tipo 3	Heridas de más de 12 horas de duración, y con contaminación bacteriana grave

En función del grado de contaminación también las podemos clasificar en limpias, limpias-contaminadas, contaminadas e infectadas y sucias (Waldron and Zimmerman-Pope, 2003; Pavletic M, 2010b) tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Clasificación de las heridas en función de la duración y nivel de contaminación (Rubio et al., 2009).

Clasificación de la herida	Grado de contaminación	Duración de la contaminación	Ejemplos de tipos de heridas
Limpia	Mínimo	0-6 horas	Heridas asépticas quirúrgicas
Limpia-contaminada	Mínimo	0-6 horas	Heridas quirúrgicas contaminadas
Contaminada	Significativo	6-12 horas	Heridas traumáticas abiertas
Sucia-infectada	Grande	+ 12 horas	Heridas infectadas/crónicas

Una herida limpia es una herida no traumática, no infectada y en la que no se afectan cavidades (orofaríngea, digestiva, respiratoria o urogenital). Estas heridas se realizan en

condiciones de esterilidad y normalmente cierran por primera intención. Las heridas limpias-contaminadas son heridas en las que están implicados los sistemas orofaríngeo, digestivo, respiratorio o urogenital, las heridas con una contaminación mínima se incluyen en éste grupo. Las heridas contaminadas incluyen aquellas heridas traumáticas abiertas y, por último, las heridas infectadas y sucias son aquellas heridas traumáticas y crónicas que incluyen una infección clínica o por perforación de vísceras y tienen una concentración superior a 100,000 organismos antes de proceder a realizar la operación, o bien se trata de heridas contaminadas con pus (Hunt and Williams, 1997; Pavletic M, 2010b).

Según su persistencia

Según el grado de persistencia, podemos hablar de heridas agudas o crónicas. Las heridas agudas se caracterizan por obtener la curación completa en el tiempo y de la manera esperada. Se considera úlcera crónica aquellas heridas con pérdida de sustancia de la epidermis, dermis y en ocasiones planos más profundos que persisten sin cicatrizar más de 6 semanas (Zielins et al., 2014). Las heridas crónicas son aquellas que no cicatrizan debido a una amplia superficie de tejido lesionado y no reparado o por alguna otra afección patológica subyacente (Demidova-Rice et al., 2012a; Markova and Mostow, 2012).

Según su etiología

Tal y como hemos comentado con anterioridad el origen de las heridas cutáneas puede ser muy diverso: mordeduras, quemaduras, heridas quirúrgicas, accidentes de tráfico, enfermedades endocrinas, armas de fuego, etc. En la tabla 3 aparece la clasificación de las quemaduras según su profundidad.

Tabla 3: Clasificación de las quemaduras según su profundidad (Rubio et al., 2009).

Primer Grado	Segundo Grado	Tercer Grado
Superficiales Destrucción epidermis Eritema Dolor Origen: radiación	Destrucción epidermis y parte de dermis Eritema + ampollas Dolor	Destrucción total espesor piel Aspecto pálido Bordes necróticos/irregulares Indoloras

Según la solución de continuidad de la piel

Hablamos de heridas abiertas cuando observamos la separación de los tejidos blandos. Tal y como su propio nombre indica, al ser abiertas son más susceptibles a la contaminación. Por lo

contrario en las heridas cerradas no observamos la separación de los tejidos, habitualmente su origen suelen ser por golpes romos o contusos (Foster and Foil, 2003; Grey et al., 2006).

Según su complejidad

Dependiendo de la complejidad de las heridas las podemos clasificar en heridas simples o complicadas (Grey et al., 2006; Theoret, 2009).

Heridas simples

Las heridas simples se definen como aquellas en las que solo existe una afección de la piel o del músculo, sin presentar una mayor profundidad. Un claro ejemplo de una herida simple sería un corte superficial o arañazo sin ocasionar daños en órganos importantes (White, 1999; Rubio et al., 2009).

Heridas complicadas

Sin embargo, las heridas complicadas son heridas más profundas y más extensas, habitualmente causan lesión muscular, tendinosa, nerviosa o incluso de órganos internos, ocasionando abundante hemorragia. Estas heridas complicadas pueden ser de dos tipos, penetrantes o transfixiantes, éstas últimas además de afectar el músculo, lo perfora, comunicando dos cavidades distintas (White, 1999; Rubio et al., 2009).

Proceso de Cicatrización Cutánea

La cicatrización cutánea es un proceso que comienza inmediatamente tras la lesión y que consigue restaurar la continuidad tisular tras la lesión. Se trata de un proceso biológico en el que intervienen factores físicos, químicos y celulares con el objetivo de restaurar la herida o en su defecto reemplazarla por colágeno (Singer and Clark, 1999; Cheryl S, 2009).

Las heridas cutáneas pueden cicatrizar mediante dos procesos distintos, por reparación o regeneración, existiendo una clara e importante diferencia entre ambos. La reparación del tejido logra un tejido que tiene unas características inferiores al del tejido original. Mientras que la regeneración consigue un tejido con las mismas características que el tejido original, con el objetivo de activar la biología del paciente y conseguir una restauración de tejido dañado tanto morfológica como funcional. Es de gran importancia destacar que la piel adulta no es capaz de regenerarse de forma espontánea, sino que cicatriza con la formación de cicatriz (Dudas et al., 2008; Gurtner et al., 2008; Borena et al., 2015).

El proceso de cicatrización cutánea engloba cuatro fases bien diferenciadas: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. La cicatrización es un proceso dinámico lo que permite que las distintas fases se desarrollen de forma simultánea (Gurtner et al., 2008; Cheryl S, 2009; Ackermann, 2011; Zielins et al., 2014).

Cada una de éstas fases está regulada en gran parte por citoquinas, que pueden actuar sobre las células responsables de su liberación, células vecinas o células distantes (Gurtner et al., 2008; Pavletic M, 2010a).

Hemostasis

La hemostasia se produce inmediatamente tras el daño tisular, excepto en los casos en los que exista un trastorno de la coagulación. La vasoconstricción de los vasos sanguíneos periféricos es el método inicial empleado tras la lesión cutánea para controlar la hemostasis. Ésta vasoconstricción es temporal, por lo que la herida cutánea continuará sangrando si las plaquetas no intervienen rápidamente. Durante éste periodo inicial de vasoconstricción, las plaquetas se agregan y se adhieren al colágeno, formando un coágulo (Clark, 1996; Baum and Arpey, 2005). A continuación éstas plaquetas secretan sustancias vasoconstrictoras para conseguir los siguientes objetivos (Gurtner et al., 2008):

- Mantener la vasoconstricción de los vasos sanguíneos que han sido dañados.
- Dar lugar al inicio del proceso de trombogénesis para parar el sangrado y evitar que éste continúe.
- Promover la angiogénesis: cicatrización del vaso sanguíneo.

Exactamente el mismo proceso ocurre con vasos de gran calibre, aunque también intervienen otros procesos fisiológicos como la bajada de la presión arterial (Gurtner et al., 2008; Ackermann, 2011).

Fase Inflamatoria

La fase inflamatoria comienza 24 horas tras el daño vascular, la podemos definir como una inflamación aguda, y que puede durar hasta 96 horas o incluso más cuando el proceso de cicatrización se ve interrumpido por la presencia de infección, traumatismos o cualquier otro proceso (Clark, 1996; Theoret, 2009; Ackermann, 2011). Ésta fase se caracteriza por un aumento de la permeabilidad vascular, liberación de citoquinas y factores de crecimiento, quimiotaxis de células inflamatorias, y de activación celular (macrófagos, neutrófilos, linfocitos y fibroblastos) (Bao et al., 2009; Cheryl S, 2009).

La presente fase inflamatoria suele durar aproximadamente 5 días en heridas experimentales (Pavletic M, 2010a).

Los signos cardinales de la inflamación aparecen durante ésta fase y son los siguientes: calor, dolor, rubor, tumor y perturbación de la función (Broughton et al., 2006; Ackermann, 2011).

Las primeras células inmunológicas que llegan al lugar dañado son los neutrófilos, consiguiendo una mayor concentración de éstos durante el primer y segundo día después de la lesión cutánea. La función principal de éstos neutrófilos es la de prevenir la infección bacteriana de la herida, además de activar los queratinocitos, los fibroblastos y células inmunológicas con lo que acelera la llegada de estas células en pocas horas al lugar de la lesión (Eming et al., 2007; Zielins et al., 2014).

Los monocitos se diferencian en macrófagos y llegan al lugar de la lesión en aproximadamente 2-3 días. Durante ésta primera parte de la fase inflamatoria los macrófagos junto con los neutrófilos previenen el desarrollo de infecciones y actúan desbridando la herida de organismos y detritus mediante un proceso de fagocitosis (Cheryl S, 2009; Ackermann, 2011; Koh and DiPietro, 2011; Zielins et al., 2014). Los neutrófilos degenerados liberan enzimas y radicales libres que destruyen las bacterias, el tejido necrótico y sustancias extracelulares, y adicionalmente estimulan a los monocitos. Los monocitos juegan un papel esencial para la cicatrización de las heridas, por lo que podemos decir que los monocitos son esenciales y necesarios para la cicatrización mientras que los neutrófilos no. Los monocitos sintetizan factores de crecimiento que participan en la formación de tejido y en el remodelado de la herida (Eming et al., 2007; Cheryl S, 2009). El excesivo infiltrado de células inflamatorias va a afectar negativamente el proceso de cicatrización de las heridas (Ackermann, 2011).

Los factores de crecimiento que intervienen durante el proceso de cicatrización, los cuales detallaremos en mayor profundidad más adelante, pueden iniciar, mantener y coordinar la formación de tejido de granulación (Lynch et al., 1989; Martin, 1997; Cheryl S, 2009).

El proceso inflamatorio está controlado por el sistema inmune, consiguiendo evitar una respuesta exagerada o incluso perjudicial. Muchos de los mediadores que producen la activación, al variar su concentración o actuar sobre distintos receptores, van a producir inhibición, consiguiendo de esta forma un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria. A continuación detallamos los factores que intervienen en la presente regulación (Gallin, 1989; Male et al., 1991; Roit et al., 1992) :

- **Prostaglandina (PGE):** Inhibe la liberación de mediadores por parte de los mastocitos y basófilos y previene la proliferación y diferenciación de los linfocitos.

- **Histamina.** Actúa sobre los receptores H₂ (histamina 2), induce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, la quimiotaxis y activa las células T supresoras.
- **Agonistas autónomos.** El mastocito y basófilo parecen presentar receptores α y β -adrenérgicos y ζ -colinérgicos que sugieren que la liberación de mediadores podría estar sometida a una regulación autónoma. La activación del receptor β -adrenérgico produce una inhibición, mientras que la activación del α -adrenérgico y ζ -colinérgico inducen la estimulación.
- **Heparina.** Actúa inhibiendo la coagulación y la activación de los factores del complemento.
- **Eosinófilo.** El eosinófilo es atraído al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la inflamación, la histaminasa que actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el factor activador de las plaquetas (PAF).

Fase de proliferación

La fase de reparación o proliferación comienza de 3 a 5 días tras la lesión y se caracteriza por la estimulación de la proliferación de fibroblastos y de ácido desoxirribonucleico (ADN) por parte de las citoquinas liberadas por los macrófagos hacia la herida. Los fibroblastos son estimulados por el TGF- β para que produzcan fibronectina, la cual facilita la unión células y el movimiento de los fibroblastos. La presión de oxígeno tisular junto con la ligera acidez de la zona también ayudan a estimular la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno (Balbino et al., 2005; Bauer et al., 2005).

Esta fase puede llegar a durar hasta 3-4 semanas, dependiendo del tamaño de la herida (Ackermann, 2011). Los cuatro procesos clave asociados con la fase de proliferación son los siguientes (Raja et al., 2007; Pavletic M, 2010a; Ackermann, 2011):

- **Angiogénesis / Neovascularización:** Formación de un nuevo endotelio.
- **Fibroplasia:** Formación de tejido conectivo.
- **Epitelización:** Formación de un nuevo epitelio.
- **Contracción de la herida.**

Las fases anteriormente mencionadas permitirán la restauración funcional y estructural del tejido dañado. La cicatrización de la piel en quemaduras de tercer grado o en ulceraciones graves sería el perfecto ejemplo de éste proceso (Ackermann, 2011).

Neovascularización/Angiogénesis

La neovascularización es un proceso clave en la cicatrización de heridas, se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso también denominado angiogénesis. Sin una circulación adecuada, los fibroblastos no pueden sobrevivir en el entorno de la herida, por lo que si no tenemos fibroblastos no tendrá lugar la formación de colágeno. La epitelización también depende de una buena vascularización de la matriz extracelular (Martin, 1997; Singer and Clark, 1999).

Los siguientes factores promueven y potencian la angiogénesis: factores de crecimiento, factores quimiotácticos, el propio medio de la herida, las bajas concentraciones de oxígeno y el incremento en la concentración de ácido láctico (Klagsbrun and D'Amore, 1996; Pavletic M, 2010a).

El nacimiento de capilares se origina a partir de vasos existentes, por medio de células endoteliales que migran hacia el lugar de la lesión y se unen con otros capilares incipientes o vasos lesionados. La formación de nuevos capilares aumenta la tensión de oxígeno en las heridas, incrementando así la fibroplasia (Cheryl S, 2009).

Fibroplasia

Consiste en la formación del tejido de granulación, formado por fibroblastos y matriz extracelular (ECM). Los fibroblastos son formados por los tejidos de alrededor de la herida y por células madre que son capaces de diferenciarse en fibroblastos. Las citoquinas estimulan la proliferación de fibroblastos y migran hacia el lugar de la lesión (Martin, 1997; Li et al., 2007; Pavletic M, 2010a).

La combinación de nuevos capilares, fibroblastos y tejido fibroso consigue formar un tejido de granulación carnoso, con un color rojo vivo, en apenas 3-5 días tras la lesión (Hoosgood, 2003; Hinz, 2007).

La velocidad de crecimiento del tejido de granulación en cada borde de la herida es de 0,4-1 mm/día. Cuando nos encontramos ante un tejido de granulación enfermo, observamos un aspecto blanquecino, con un elevado contenido en tejido fibroso y escasa concentración de capilares. Éste tejido de granulación, está formado por fibroblastos específicos (miofibroblastos), y su función es la de rellenar los defectos de la herida además de protegerla. Los miofibroblastos tienen una importante función en la contracción de la herida y se cree que contienen proteínas como la actina y la miosina (Hinz, 2007; Cheryl S, 2009; Kawasumi et al., 2013).

Inicialmente, los fibroblastos segregan grandes cantidades de fibronectina formando ECM más frágil y temporal, ésta se sustituye gradualmente por una estructura permanente y estable

formada por colágeno. El colágeno es una glicoproteína formada por tres cadenas alfa espirales compuesta en un 33% por glicina, 33% prolina y el restante 33% por aminoácidos. El colágeno es directamente responsable de la fuerza tensil de la herida, de manera que una ausencia de colágeno o su formación no estructurada puede provocar la dehiscencia de la herida (Clark, 1996; Pavletic M, 2010a; Demidova-Rice et al., 2012a).

Mientras que la deposición de colágeno tiene lugar por parte de los fibroblastos, la fibrina va siendo eliminada. La síntesis de colágeno incrementa de 4 a 5 semanas después del proceso de cicatrización, y esto es debido a un mayor número de fibroblastos y a una mayor cantidad de colágeno depositado por cada célula. La actividad de las enzimas colagenasa es importante para el control de la deposición de colágeno (Gurtner et al., 2008; Pavletic M, 2010a).

El colágeno depositado al inicio de la fase de proliferación o reparación es colágeno inmaduro tipo III, mientras que en piel normal o cicatrices ya maduras encontramos colágeno tipo I, ésta es una buena forma de diferenciar microscópicamente una herida inmadura de una herida madura. Aproximadamente 3 semanas tras la lesión se alcanzan los niveles más altos de colágeno y luego ya tendría lugar la fase de remodelado (Baum and Arpey, 2005; Zielins et al., 2014).

Epitelización

La epitelización tiene lugar gracias a la proliferación de células epiteliales en la zona basal, que van rellenando el defecto de la herida. Éstas células epiteliales liberan enzimas proteolíticas al medio externo, como la colagenasa, con el objetivo de pavimentar de nuevo la superficie tisular viable (Jacinto et al., 2001; Bao et al., 2009).

En heridas suturadas con una buena aposición de bordes, la epitelización comienza casi inmediatamente, en apenas 24-48 horas, ya que no hay defecto que deba ser cubierto por tejido de granulación. Sin embargo, la epitelización en heridas abiertas comienza cuando se ha formado un tejido de granulación adecuado (aproximadamente a los 4-5 días). La migración epitelial es aleatoria, pero está guiada por las fibras de colágeno. En un inicio el nuevo epitelio está compuesto de una sola capa de células, pero éste se va engrosando progresivamente al formarse capas adicionales. Durante este proceso pueden regenerarse algunos folículos pilosos e incluso glándulas sudoríparas dependiendo siempre de la profundidad de la herida. Cuatro o cinco días tras la lesión solemos ver la formación del nuevo epitelio. La epitelización va a ser siempre más rápida en medio húmedo que en medio seco (Clark, 1996; Balbino et al., 2005; Cheryl S, 2009).

Contracción de la herida

El proceso de contracción de la herida abarca tanto a la fase de proliferación como a la fase de remodelación. Se basa en la reducción del tamaño de la herida gracias a la acción de los fibroblastos, tiene lugar a la vez que la epitelización y la formación de tejido de granulación y reduce notablemente el tamaño de la herida entre 5 y 9 días tras la lesión. La velocidad aproximada a la que progresa la herida es de 0,6-0,8mm/día, y al mismo tiempo la piel alrededor de la herida también se estira. Dicha contracción cesa cuando los bordes de la herida se ponen en contacto, cuando la tensión es excesiva o cuando los miofibroblastos no son adecuados. Esta fase también se ve afectada, y por lo tanto parcialmente inhibida, mediante el empleo de antiinflamatorios esteroideos, relajantes musculares o fármacos antineoplásicos (Cheryl S, 2009; Demidova-Rice et al., 2012a).

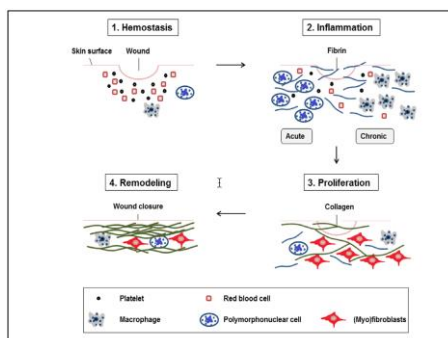
Fase de remodelación

La fase de remodelación, también llamada fase de maduración, comienza aproximadamente a las 3 o 4 semanas tras la lesión, pero solo tiene lugar una vez que las fases de inflamación y proliferación han sido completadas. Esta fase incluye la remodelación del tejido de granulación y la conversión del tejido conectivo inmaduro en tejido conectivo maduro a través de la formación de colágeno extracelular. Se trata de una fase que puede durar hasta más de dos años (Baum and Arpey, 2005; Ackermann, 2011; Wynn and Ramalingam, 2012).

Esta fase comienza cuando el colágeno se ha depositado correctamente en la herida. Las fibras de colágeno se remodelan, alterando su orientación y aumentando su entrecruzamiento, lo que supone un aumento en la resistencia de la herida. El colágeno tipo III disminuye progresivamente, mientras que el tipo I aumenta. El mayor incremento en la resistencia de la herida se produce entre los 7 y 14 días tras la lesión. Durante las primeras tres semanas se recupera un 20% de la resistencia final, luego progresivamente esta va aumentando, pero nunca llega a recuperar la del tejido normal, alcanzando tan solo un 80% de su resistencia original. Al disminuir el número de capilares en la zona, el aspecto macroscópico de la herida se vuelve más pálido y durante la maduración del proceso de cicatrización de heridas, las cicatrices se vuelven más planas, más blandas y menos celulares (Cheryl S, 2009; Tziotzios et al., 2012; Zielins et al., 2014).

La figura 2 representa esquemáticamente las cuatro fases que tienen lugar durante la cicatrización de tejidos.

Figura 2: Representación esquemática de las cuatro fases que tienen lugar durante la cicatrización cutánea (Borena et al., 2015).



Tipos de cicatrización

Distinguimos principalmente dos tipos de cicatrización, la cicatrización por primera intención y la cicatrización por segunda intención. La cicatrización por primera intención tiene lugar cuando los bordes de la herida están directamente aposicionados y cicatrizan rápidamente. Aquellas heridas con una mayor destrucción de células y tejido presentan un proceso de reparación más complicado en la que es necesario la formación de tejido de granulación. En el tipo de herida más simple como puede ser un corte limpio o una incisión realizada por un cirujano, existe una hemorragia inicial causada por el daño de la vascularización y una retracción y vasoconstricción de los vasos sanguíneos. En el área de la herida se deposita fibrina, proteínas plasmáticas, un coágulo, la agregación plaquetaria y una infiltración neutrofílica. Dependiendo de la proximidad entre los bordes de la herida, de la presencia o ausencia de cuerpos extraños o agentes infecciosos, y de la capacidad propia del animal para regenerar heridas, nos encontraremos ante un tipo de reparación u otra. En los casos en los que el proceso de cicatrización de la herida se ve interrumpido por cualquier factor, el tipo de reparación de la herida pasará a ser por segunda intención (Singer and Clark, 1999; Theoret, 2009).

Cicatrización por primera intención

La cicatrización por primera intención tiene lugar en 2-3 días cuando los bordes de la herida están aposicionados por suturas o vendajes. Las consecuencias de este tipo de reparación en la herida son mínimas, tan solo causando una leve fibrosis en la dermis superficial y la pérdida de anejos cutáneos como folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. En ésta ocasión la fuerza tensil es prácticamente la misma que la del tejido adyacente (Ackermann, 2011; Zielins et al., 2014).

Cicatrización por segunda intención

La cicatrización de una herida por segunda intención se basa en la formación de tejido de granulación, contracción de la herida y en el proceso de epitelización para conseguir el cierre de la misma (Waldron and Zimmerman-Pope, 2003; Enoch and Leaper, 2007).

Este tipo de cicatrización tiene lugar cuando los bordes de la herida no están bien aposicionados. Dichas heridas presentan un tejido conectivo dispuesto de forma aleatoria y con muy poca o incluso ninguna organización en el proceso de cicatrización, aún así, el tejido conectivo fibroso rellena el defecto en la dermis superficial y profunda. Igual que en el caso anterior, la formación de éste nuevo tejido conectivo fibroso carece de anejos cutáneos como folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. La fuerza tensil del tejido de granulación se encuentra disminuida y las lesiones pueden desgarrarse. Durante la cicatrización por segunda intención, el lugar de la lesión puede permanecer ulcerado, con ausencia de pelo y en ocasiones incluso el tejido conectivo puede sufrir un proceso de proliferación continuo y protuir de la superficie de la piel dando lugar a una cicatriz hipertrófica (Hoosgood, 2003; Gurtner et al., 2008; Ackermann, 2011).

Factores que afectan a la cicatrización cutánea

Como ya se ha comentado anteriormente, el objetivo principal del proceso de cicatrización va a ser el conseguir una cicatriz rápida, mínima y funcional. Sin embargo, van a existir diversos factores tanto internos como externos que afecten el proceso de cicatrización de dichas heridas.

Factores internos del hospedador

La edad del individuo va a afectar el proceso de cicatrización. Los animales mayores tienden a presentar un proceso de cicatrización más lento, debido a la presencia de patologías o debilitación general (Clark, 1996).

Animales nutridos de forma deficitaria o con una concentración de proteínas séricas inferior a 1,5-2 g/dl, presentarán una cicatrización ralentizada y una menor resistencia de la herida. En humana, los individuos obesos presentan una mayor incidencia a padecer infecciones de heridas quirúrgicas (Crane, 1989; Cheryl S, 2009).

Patologías como la diabetes mellitus retrasan la cicatrización de forma importante y además aumentan la predisposición a infecciones de la herida. El hiperadrenocorticismismo o “síndrome de Cushing” cursa con un retraso marcado en el proceso de cicatrización de heridas, debido al incremento en los niveles de glucemia y de corticoides que causa dicha enfermedad. Las

enfermedades hepáticas pueden llegar a provocar deficiencias en los factores de coagulación y por lo tanto repercuten en el proceso de cicatrización (Vileikyte, 2001; Wu et al., 2010).

Cuanto mayor es el tiempo de anestesia, mayor es el riesgo de infecciones postquirúrgicas en perros y gatos (Beal et al., 2000). En la especie felina, las heridas suturadas tienen la mitad de fuerza a los 7 días de cicatrización que en los perros, además, las que cicatrizan por segunda intención curan más lentamente, forman menos tejido de granulación, y curan más por contracción de los bordes de la herida en comparación con los perros (Bohling et al., 2004).

La presencia de hipovolemia, shock o vasoconstricción también va a afectar el proceso de curación de las heridas, ya que éstos procesos disminuyen el riego sanguíneo de la zona lesionada. Otros factores generales que van a entorpecer la cicatrización de las heridas son la disminución de Fe, Cu, S y de vitamina C ya que hacen que disminuya la síntesis de colágeno. La uremia y el déficit de vitamina B disminuyen el metabolismo celular (Sopena et al., 2009a).

Factores externos

El uso de esteroides afecta notablemente la cicatrización de las heridas, ya que disminuye la neoformación de capilares, estabiliza las membranas de los lisosomas, provoca un incremento de la fase inflamatoria, disminuye la mitosis celular, incrementa la fase de reparación y disminuye la síntesis de colágeno. Además aumentan el riesgo de infecciones y retrasan todas las fases de la cicatrización cutánea (Singer and Clark, 1999).

La presión sobre la zona de la herida va a provocar una disminución del riego sanguíneo y puede ocasionar la dehiscencia, una movilidad excesiva en la zona va a disminuir la migración de fibroblastos y el riego sanguíneo, la mala coaptación de los bordes de la herida va a disminuir la migración de fibroblastos y el uso de fármacos citostáticos disminuye la migración y replicación de fibroblastos (Sopena et al., 2009a).

La radioterapia ralentiza la cicatrización, los antiinflamatorios suprimen la fase de inflamación, la aspirina pueden retrasar el proceso de coagulación sanguínea, gran parte de los quimioterápicos inhiben completamente la cicatrización de heridas, por éste motivo deberíamos de evitar el uso de quimioterapia o radioterapia durante las dos semanas previas a una intervención quirúrgica (Cheryl S, 2009).

Factores propios de la herida

Todas aquellas superficies intactas como puede ser el periostio, tendón, fascia y vaina nerviosa, no sostienen el tejido de granulación, por lo que todas aquellas heridas con exposición de alguna de estas superficies van a ralentizar la cicatrización (Balbino et al., 2005).

La presencia de cuerpos extraños en las heridas (como suturas, implantes, etc.) desencadena una reacción inflamatoria intensa que afecta negativamente a la cicatrización fisiológica de la herida, la liberación de las enzimas necesarias para degradar estos cuerpos extraños provoca una destrucción de la matriz de la herida, prolongación de la fase inflamatoria y retraso de la fase fibroblástica. El uso de antisépticos en la zona de la herida la predispone a infecciones secundarias además de enlentecer la cicatrización de la misma (Broughton et al., 2006).

La perforación de orificios corticales en huesos favorece el proceso de cicatrización, gracias a la liberación de diversos factores entre ellos osteogénicos. Y la La aportación de calor (30º) en la herida acelera su cicatrización, al igual que una herida húmeda cicatriza más rápidamente que una seca (Clark, 1996; Cheryl S, 2009).

Toda aquella herida realizada con instrumentos quirúrgicos afilados cura antes y con menos necrosis en los bordes que aquellas heridas realizadas con tijera, bisturí eléctrico o láser. La disminución o compromiso de la vascularización por el uso de vendajes compresivos retrasan la cicatrización. Mientras que los exudados de las heridas pueden llegar a producir necrosis (Cheryl S, 2009).

Por todo esto, será muy importante considerar todos éstos factores e intentar minimizar al máximo sus efectos, para poder conseguir unas condiciones ideales de cicatrización, y conseguir unos buenos resultados.

Complicaciones en la cicatrización cutánea

A pesar de poder influir en la cicatrización y prevenir problemas de contaminación cutánea y cicatrización incompleta o excesiva, siempre que se rompe la integridad del tejido del paciente es más vulnerable a padecer infecciones y complicaciones. Por éste motivo, es de vital importancia el evitar cualquier factor que afecte negativamente a la cicatrización cutánea, como hemos visto con anterioridad (hiperglicemia, malnutrición, obesida, etc.). A continuación en la tabla 4 se detallan las principales complicaciones asociadas a la cicatrización cutánea.

Tabla 4: Principales complicaciones en la cicatrización de heridas (Rubio et al., 2009).

Complicaciones	Comentarios
Seroma	Acumulación de líquido o suero linfático. 2 orígenes: Sección vasos linfáticos / Necrosis de grasa
Hematoma	Acumulación sangre coagulada
Absceso	Colección de pus
Infección	Retrasa la cicatrización
Celulitis	Infección tejido subcutáneo
Gangrena gaseosa	Toxemia intensa muscular
Dehiscencia	Separación planos anatómicos

Una de las complicaciones más frecuentes en la cicatrización son los seromas, la forma de evitar su aparición es realizar una buena sutura de la herida o en su defecto, realizar una correcta compresión de la zona intervenida para no dejar espacios muertos, y otra opción sería la de colocar drenajes para favorecer la eliminación del líquido producido (Foster and Foil, 2003).

La formación de un hematoma supone ya una complicación fisiológica inicial de la herida, ya que representa un caldo de cultivo para infecciones (Enoch and Leaper, 2007; Rubio et al., 2009).

Respecto a la presencia de infección en las heridas, las bacterias, los granulocitos y las colagenasas de los macrófagos degradan el colágeno, disminuyendo la fuerza de la herida. En medicina humana es muy frecuente en pacientes quirúrgicos las infecciones por *Staphilococcus aureus* resistente a la meticiclina (SARM) (Rubio et al., 2009).

Cicatrización cutánea patológica

Ciertas condiciones patofisiológicas y metabólicas pueden alterar el curso normal de los procesos provocando una cicatrización retardada y como resultado, heridas crónicas que no acaban de cicatrizar (Marston and Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study, 2006; Mustoe et al., 2006; Wu et al., 2010).

Una cicatrización cutánea patológica, independientemente de su origen, va a dar lugar a trastornos fibroproliferativos (cicatrización aberrante) o a úlceras (escasa cicatrización).

Desórdenes fibroproliferativos

Son el resultado de una cicatrización cutánea prolongada y aberrante, que da lugar a una deposición excesiva de colágeno y a una proliferación exagerada de fibroblastos (Al-Attar et al., 2006; Ackermann, 2011; Huang et al., 2013a).

La formación de cicatrices hipertróficas está relacionada con el mecanismo de la lesión, ya que normalmente se forman tras quemaduras u otros daños de la dermis profunda (Zhu et al., 2013b). Sin embargo, la formación de queloides está determinada por factores genéticos y ambientales, observándose más frecuentemente en pieles oscuras (Al-Attar et al., 2006; Halim et al., 2012; Berman et al., 2016). Clínicamente tanto los queloides como las CH se muestran como masas pruríticas, eritematosas, de consistencia dura y con prominencia (Zielins et al., 2014; Berman et al., 2016).

Este tipo de cicatrices tienen solo un 70% de la fuerza tensil de la piel normal (Miller and Nanchahal, 2005). Las CH se revierten parcialmente porque entran en la fase de remodelación, mientras que los queloides nunca revierten (Al-Attar et al., 2006; Zielins et al., 2014).

Durante el proceso fisiológico de cicatrización cutánea, la fase inflamatoria tiene lugar rápidamente tras la lesión, en ella, se forma un coágulo de fibrina que libera factores quimiotácticos responsables de la migración de leucocitos a la zona de la herida. Seguidamente se produce una infiltración de neutrófilos en la herida, que son reemplazados por macrófagos, esto marca el final de la fase inflamatoria inicial y el comienzo de la fase final inflamatoria comenzando a continuación la fase de proliferación (Baum and Arpey, 2005; Huang et al., 2013a).

En el caso de cicatrizaciones cutáneas patológicas, los macrófagos de la zona de la herida liberan de forma inapropiada citoquinas durante el periodo de transición entre la fase inflamatoria tardía y la fase proliferativa. Dicho suceso prolonga la fase inflamatoria y por lo tanto, retrasa la cicatrización, resultando en la formación de queloides y cicatrices hipertróficas (CH) (Huang et al., 2014; Zielins et al., 2014; Berman et al., 2016).

Úlceras cutáneas

Las úlceras o también llamadas heridas crónicas son aquellas heridas que no terminan de cicatrizar y persisten durante más de 6 semanas (Markova and Mostow, 2012). Las podemos clasificar principalmente en tres grandes grupos: úlceras vasculares, úlceras diabéticas o úlceras por presión o por decúbito (Demidova-Rice et al., 2012a; Zielins et al., 2014). Independientemente de su etiología, todas muestran un incremento de la inflamación de la zona, hipoxia y hasta cierto grado presencia de infección o contaminación bacteriana (Zielins et al., 2014). La tabla 5 detalla la clasificación de las úlceras más comunes en medicina veterinaria, las úlceras por de decúbito.

Tabla 5: Clasificación de las úlceras de decúbito en función de su grado (Sopena et al., 2009a).

Grado	Síntomas
Grado 1	Eritema, dolor/escozor, piel edematosa, piel fría o caliente
Grado 2	Pérdida parcial de piel (epidermis, dermis o ambas), elevado riesgo infección, aspecto cráter
Grado 3	Afección tejido subcutáneo, aspecto cráter profundo
Grado 4	Extensa destrucción, lesión en músculo/hueso/estructuras de sostén y necrosis tejido

Las úlceras de decúbito o por presión son cada vez más frecuentes en medicina veterinaria, se tratan de lesiones provocadas por presión continua sobre estructuras corporales. Los puntos más frecuentes de aparición de éstas úlceras son los salientes óseos, en especial el trocánter mayor del fémur, tubérculo mayor del húmero, calcáneo, cóndilos femorales y humerales, y olécranon entre otras estructuras anatómicas. La presión prolongada dificulta o interrumpe el aporte sanguíneo local provocando la muerte tisular, a continuación, se formará la úlcera en pocos días al desprenderse el tejido desvitalizado, permitiendo la contaminación bacteriana secundaria (Sopena et al., 2009a).

En medicina humana, durante los últimos años el problema de las úlceras cutáneas está siendo cada vez más importante y más frecuente, particularmente por el incremento en la población anciana. Las úlceras cutáneas constituyen un problema de asistencia serio y creciente, y son frecuentemente difíciles de tratar. Según la asociación italiana de úlceras cutáneas (AIUC), éstas cuestan al Servicio Nacional de Sanidad Italiana sobre un 10.000 millones de euros cada año (Bernuzzi et al., 2010). En Estados Unidos, el tratamiento de éstas úlceras cuesta en torno a entre 6 y 15 billones de dólares anualmente en tratamientos tanto médicos como quirúrgicos (Markova and Mostow, 2012).

Las úlceras de pie en pacientes diabéticos afectan a un 25% de los mismos y suponen sobre un 20% del total de los gastos sanitarios, por lo que suponen un impacto significativo en la calidad de vida y mortalidad de los pacientes (Boulton et al., 2005; Reiber and Raugi, 2005; Bernuzzi et al., 2010). Se estima que aproximadamente 1,7 millones de pacientes en el mundo padecen diabetes (Brem and Tomic-Canic, 2007). Las heridas en pacientes diabéticos presentan un proceso de angiogénesis retardado, un bajo nivel de factores de crecimiento y una limitada habilidad para reclutar células inflamatorias en la herida. La pobre vascularización de la herida, junto con el continuo estado de inflamación crónica de la misma limitan su capacidad de cicatrización (Ansurudeen et al., 2012; Lian et al., 2014).

Las causas de las úlceras son muy diversas, entre ellas cabe destacar los desórdenes vasculares (venosos, arteriales, linfáticos, vasculitis), el origen neuropático (diabetes), los

traumatismos, alteraciones metabólicas, patologías de tejido conectivo (lupus eritematoso sistémico), pioderma gangrenosa, patologías hematológicas (leucemia), disproteinemias, inmunodeficiencias, neoplasias, infecciones, paniculitis y origen iatrogénico (Grey et al., 2006).

Independientemente del origen, las úlceras cutáneas se caracterizan por pérdida de tejido, incluyendo la epidermis, dermis y, en ocasiones, tejido adiposo y capas musculares, y por falta de reparación espontánea, probablemente debido al envejecimiento (cese de la proliferación) de la población de células madre mesenquimales o a la incapacidad para reclutar células precursoras circulantes (Vande Berg and Robson, 2003; Boulton et al., 2005; Reiber and Raugi, 2005; Bernuzzi et al., 2010).

Algunas de las complicaciones que las heridas crónicas pueden llegar a desencadenar son las siguientes: la aparición de fístulas, osteomielitis, contracturas y deformidades de las articulaciones cercanas, amiloidosis sistémica, calcificaciones, anemia, septicemia, etc. (Grey et al., 2006).

Tratamiento de las heridas cutáneas

Tradicionalmente se pensaba que la mejor manera de curar una herida era mantenerla seca. Tras varios estudios realizados se ha visto que la curación de las heridas es más rápida en un ambiente húmedo, frente a curas secas con formación de costra (Finnie, 2002; Sopena et al., 2009b).

La cura en ambiente húmedo, fue descrita por primera vez por Winter en 1962 de forma experimental, demostrando que las lesiones cutáneas cubiertas por una lámina impermeable polimérica, presentaban una curación dos veces más rápidas que las que eran expuestas al aire (cura seca). Este efecto es debido a que previene la deshidratación tisular y la muerte celular, se promueve la angiogénesis, se estimula la eliminación de fibrina y de tejido desvitalizado y permite la interacción celular y la liberación de factores de crecimiento para la cicatrización (Winter, 1962).

Los ambientes secos conducen a la deshidratación de la herida y a la muerte celular, provocando una reducción en la proliferación epitelial lo que puede incrementar la fase inflamatoria. El uso de apósitos semipermeables en una herida aporta humedad a la misma y se comporta como una barrera para el agua, los microorganismos, el trauma químico y mecánico. Adicionalmente, estimula la proliferación epitelial. Por lo que un aspecto importante en la elección de un apósito es la capacidad de mantener la humedad del lecho de la herida (Sopena et al., 2009b; Wu et al., 2010).

En un artículo publicado por Parnham se concluye que la retención de humedad en la superficie de las heridas agudas potencia el movimiento epidérmico; no obstante, todavía existe poca evidencia de que esto mismo sea aplicable en heridas crónicas (Parnham, 2002).

Las heridas crónicas presentan una mayor complejidad y pueden requerir de diferentes tipos de tratamiento. En general, el ambiente húmedo en la herida será favorable para la producción, el crecimiento y la migración celular (Sopena et al., 2009b).

Existen principalmente dos tipos de abordajes terapéuticos para el tratamiento de las heridas cutáneas. Los mismos se pueden dividir en tratamientos farmacológicos y no farmacológicos, los cuales serán detallados a continuación.

Tratamientos no farmacológicos

Limpieza de la herida

En primer lugar debemos realizar el lavado de la herida con agua o suero templado, es de vital importancia evitar la pérdida térmica de la herida, ya que puede significar un retraso de 4 a 6 horas en la reanudación de la mitosis, con lo cual retrasaríamos la cicatrización (Clark, 1996; Robson et al., 2001; Sopena et al., 2009b).

Desbridamiento de la herida

En el caso de úlceras o heridas crónicas es preferente realizar un desbridado enzimático o mecánico con Suero Salino Fisiológico (SSF) a presión. Se debe de usar la mínima fuerza mecánica para la limpieza de las heridas así como para su secado posterior. La presión del lavado ha de ser efectiva para facilitar el arrastre del detritus, bacterias y resto de curas anteriores pero, sin capacidad para producir traumatismos en el tejido sano. La utilización prolongada de antisépticos locales (povidona yodada, clorhexidina, etc.) para el lavado de las lesiones está demostrado que puede retrasar la cicatrización y crear resistencias, al ser productos químicos citotóxicos para el nuevo tejido. Está contraindicado el realizar un desbridamiento quirúrgico hasta que haya mejorado el aporte vascular a la zona (Attinger et al., 2006; Broughton et al., 2006; Sopena et al., 2009a).

Apósitos

Tras haber realizado la limpieza de la herida, colocaremos un apósito para la protección de la cura y la estimulación de la cicatrización. Existen un gran número de apósitos en el mercado los cuales deben proporcionar un ambiente húmedo, controlar el exudado, permitir el intercambio gaseoso, mantener constante la temperatura, proporcionar protección frente a

microorganismos y traumatismos y no adherirse a la herida. A continuación, en la tabla 6 podemos ver un resumen de alguno de ellos (Horn, 2012; Murphy and Evans, 2012):

Tabla 6: Clasificación de los apósitos en función del tipo de herida (Sopena et al., 2009b).

Tipo de Herida	Tipo de Apósito
Aguda, leve	Hidrogel, Hidrocoloide Alginato
Aguda, grave	Hidrogel Esponja poliuretano
Profunda	Hidrogel Esponja poliuretano Alginato
Necrótica	Hidrogel Alginato Esponja poliuretano
Granulación	Hidrogel Película poliuretano Hidrocoloide
Quirúrgica	Película poliuretano Gasa no adherente

Los hidrogeles tienen un gran contenido de agua (70-90%) por lo que aportan líquido a los tejidos y los hidratan, favoreciendo así la cicatrización. Las esponjas de poliuretano tienen una gran capacidad de absorción, y los apósitos que contienen plata, poseen un efecto bactericida potente, con pocos efectos secundarios (Sopena et al., 2009b). Los alginatos se presentan en placa o en cinta y poseen una capacidad de absorción de hasta 20 veces su peso, siendo muy útiles en heridas exudativas. Los poliuretanos actúan como barrera semipermeable y repelen agentes contaminantes y los hidrocoloides favorecen el desbridamiento autolítico y la granulación (Jones et al., 2006; Murphy and Evans, 2012).

Vendajes

Los vendajes compresivos se emplean frecuentemente en medicina humana para tratar úlceras secundarias a insuficiencia venosa y linfedema en las piernas (Enoch et al., 2006a).

Los vendajes aportan limpieza, control del medio, limitan la hemorragia, reducen los espacios muertos y reducen el movimiento de la herida y con ello promueven la formación de una menor cicatriz. Además, mantienen una temperatura adecuada de la herida, lo cuál mejora la cicatrización y facilita la disociación del oxígeno de la hemoglobina, existiendo una mayor disponibilidad de éste para las heridas (Clark, 1996; Sopena et al., 2009a).

Otras terapias

Entre otro tipo de terapias cabe destacar el uso del láser, terapias con ultrasonidos, hidroterapia, electroterapia, terapia electromagnética, y el uso de oxígeno hiperbárico, entre otras (Enoch et al., 2006a). También podemos estimular localmente la vascularización mediante la realización de masajes suaves en úlceras de grado 1 y 2, o con el uso de otras terapias incluso como la acupuntura (Sopena et al., 2009a).

También es importante destacar el uso de miel como terapia alternativa para la curación de heridas crónicas ya que son múltiples los estudios que certifican la eficacia de la miel como tratamiento en heridas. La miel posee un efecto antibacteriano y mejora la cicatrización de las heridas acelerándola (Grego et al., 2016; Medeiros Vde et al., 2016; Takzaree et al., 2016). En un estudio sobre abrasiones corneales donde empleaban el uso de miel, se observó que existía una aceleración de proceso de cicatrización en las heridas tratadas con miel (Ker-Woon et al., 2015). Otro estudio utilizó miel para el tratamiento de úlceras de pie en personas diabéticas y observaron que existía una mejor cicatrización de dicha úlcera, reduciendo así notablemente la incidencia de amputaciones en pacientes que padecían éste tipo de patologías (Surahio et al., 2014).

Tratamientos farmacológicos

El control de la flora bacteriana es de vital importancia en heridas complicadas. Todas las heridas no quirúrgicas contienen bacterias, pero no todas están infectadas. Las características que vamos a observar a nivel macroscópico en heridas infectadas son las siguientes: dolor, sangrado, elevado exudado, enrojecimiento y cicatrización de la herida ralentizada. Como tratamientos farmacológicos para controlar la sobrepoblación bacteriana emplearemos: antibióticos locales o sistémicos, además del control del exudado, desbridamiento y curas. Los antibióticos más comúnmente empleados son: la neomicina, la sulfadiacina, las cefalosporinas, bacitracina y la polimixina (Foster and Foil, 2003; Sopena et al., 2009a; Wu et al., 2010).

También es importante el control del dolor y la inflamación asociada. Se emplean corticoides intravenosos para tratar úlceras secundarias a patologías de tejido conectivo (como la artritis reumatoide en humana), además es frecuente el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) tanto en medicina humana como en veterinaria. El uso de analgésicos para el control del dolor asociado a algunas úlceras o grandes lesiones cutáneas puede variar desde analgésicos simples hasta opiáceos para aquellos pacientes que presentan un dolor grave (Foster and Foil, 2003; Enoch et al., 2006a; Cheryl S, 2009).

Tratamientos quirúrgicos

Colgajos cutáneos

Un colgajo cutáneo es una porción de piel y tejido conjuntivo subcutáneo parcialmente separada de su lecho, que mantiene su vascularización y es transferida a una zona próxima para poder cubrir un defecto grave. Nos permiten una cobertura completa e inmediata de la lesión evitando así otros tratamientos más prolongados que requieren una cicatrización de la herida por segunda intención. La clasificación de los colgajos más comúnmente empleada es la que hace referencia a su vascularización y a la forma en la que se mueve el segmento de piel en veterinaria. Con lo que nos encontramos ante colgajos axiales y colgajos de plexo subdérmico (Cheryl S, 2009; Whyte and Sanchez, 2009a; Hunt, 2012).

Injertos cutáneos

El uso de injertos en medicina veterinaria está poco extendido, su uso está indicado en todas aquellas lesiones cutáneas en las que no podemos realizar colgajos cutáneos por la amplitud de la pérdida de tejido o bien por las características de la zona, sobretodo en las zonas distales de las extremidades. Sin embargo, en medicina humana, los injertos cutáneos son empleados con frecuencia (Whyte and Sanchez, 2009b).

Podemos definir un injerto como una parte de tejido que se separa de su ubicación anatómica natural (donante), privándolo completamente de su aporte sanguíneo, para transferirlo a su lecho receptor, del cuál se deberá de nutrir. Los injertos los podemos clasificar en función de su procedencia, composición y de su espesor (Cheryl S, 2009; Whyte and Sanchez, 2009b).

Terapias regenerativas

La medicina regenerativa se define como un campo de la investigación biomédica novedoso y creciente cuyo objetivo principal es el de reemplazar, restaurar y regenerar células, tejidos y órganos dañados (Greenwood et al., 2006; Dieckmann et al., 2010).

El uso de las terapias regenerativas en el campo de la dermatología incluye diferentes abordajes tecnológicos, como moléculas solubles, tratamientos con células madre, reprogramación celular, ingeniería tisular y factores de crecimiento (Greenwood et al., 2006; Dieckmann et al., 2010; Dhillon et al., 2012).

Existe una gran necesidad de desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos para úlceras y heridas cutáneas complicadas, y éstos deben ser económicos y aplicables a gran escala. Uno de los abordajes más interesantes es el que trataremos en el presente proyecto, el uso del plasma rico en factores de crecimiento y de células madre mesenquimales de grasa.

A continuación discutiremos brevemente el uso de factores de crecimiento (FC) , PRGF y células madre en heridas cutáneas que son los tratamientos empleados en la presente tesis doctoral.

Factores de crecimiento (FC)

Los Factores de crecimiento (FC) son un grupo de sustancias de naturaleza polipeptídica, solubles y difusibles, que tienen la capacidad de regular el crecimiento, diferenciación y fenotipo de numerosos tipos de células. Los FC provocan una serie de cambios intracelulares que afectan a la expresión de genes que codifican funciones metabólicas, como la división celular o la síntesis de determinadas proteínas. Adicionalmente, los factores de crecimiento inducen la migración de células al lugar de la lesión, células como los leucocitos o los fibroblastos, siendo tipos celulares de vital importancia para los procesos de reparación tisular (Canalis, 1992; Lind, 1996; Koveker, 2000).

Los FC han sido empleados clínicamente para promover la cicatrización cutánea desde los años 40, donde los clínicos comenzaron aplicando extractos embrionicos que demostraron promover el crecimiento celular *in vitro*, para la cicatrización de heridas (Waugh, 1940). Actualmente, los FC pueden ser aplicados en las heridas por diferentes métodos, desde la forma más tradicional a nivel tópico o administración intralesional hasta métodos más complejos como la utilización de terapia genética o con “scaffolds” especiales (Zielins et al., 2014).

Se ha comprobado que el uso de factores de crecimiento afecta el proceso de cicatrización cutánea (Steed, 1995; Werner and Grose, 2003). Diferentes estudios en pacientes humanos han confirmado que los factores de crecimiento como el PDGF promueve la cicatrización cutánea en heridas agudas e incluso produce una cicatrización completa en heridas crónicas (Robson et al., 1992a; Robson et al., 1992b; Mandracchia et al., 2001).

A principios de los 90 se observó como la presencia de factores plaquetarios autólogos en úlceras recalcitrantes inducía la formación de un tejido de granulación temprano (Atri et al., 1990). Existen numerosos son los estudios que demuestran su eficacia en el tratamiento de lesiones en pacientes diabéticos (Gilsanz et al., 2001; Margolis et al., 2001; Tarroni et al., 2002; Saaristo et al., 2006).

Los principales factores de crecimiento que intervienen en el proceso de cicatrización cutánea son los siguientes: PDGF, EGF, FGF, VEGF, TGF- β , KGF, IGF-1 y IGF-2 (Factor de Crecimiento Insulínico) (Grazul-Bilska et al., 2003; Zielins et al., 2014).

Plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) o Plasma rico en plaquetas (PRP)

El plasma rico en plaquetas (PRP) se define como el volumen de plasma autólogo que tiene una concentración plaquetaria por encima de la línea basal (Marx, 2001; Grageda et al., 2005; Pietrzak and Eppley, 2005).

La elevada casuística de lesiones dérmicas traumáticas, ya sean debidas por traumatismos externos o postquirúrgicos, nos hace inclinarnos hacia el tratamiento de éstas heridas con PRGF. La obtención de factores de crecimiento es sencilla. Tras la obtención de sangre del paciente, procedemos a la centrifugación de la misma para posteriormente separar las dos fracciones del plasma en función de su concentración en factores de crecimiento (PRGF y PPGF), a continuación se activa el plasma mediante la adición de cloruro cálcico (ClCa) y se procede a su inoculación (Sopena et al., 2009b).

La concentración de plaquetas que encontramos en el PRP es aproximadamente de 2 a 4 veces superior a la concentración sérica normal de plaquetas (Fortier and Smith, 2008). Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariocitos de médula ósea que contienen diversos factores de crecimiento y citoquinas que estimulan el proceso de cicatrización cutánea (Borena et al., 2015).

La utilización de PRP acelera la cicatrización de las heridas debido a su capacidad de aumentar la angiogénesis, estimulando la síntesis y diferenciación de células precursoras y liberando factores que estimulan la reproducción celular (fibroblastos y células endoteliales) (Bennett and Schultz, 1993a, b).

En el campo de la dermatología es muy importante destacar el uso de PRP en la aceleración de la cicatrización de las úlceras cutáneas crónicas. Anitua y colaboradores demostraron como tras 8 semanas de tratamiento de este tipo de heridas, el porcentaje de superficie curada en pacientes sometidos a PRP fue significativamente mayor que en el grupo control (Anitua et al., 2008). Las úlceras cutáneas son muy frecuentes en pacientes con patologías como la diabetes, los cuales acaban teniendo complicaciones vasculares y neuropatías periféricas. El empleo de PRP ha hecho que muchas de estas úlceras se puedan resolver disminuyendo el riesgo de complicaciones, el tiempo de curación y las posibilidades de infección (Gilsanz et al., 2001; Tarroni et al., 2002; Pietrzak and Eppley, 2005; Salemi et al., 2008).

Células madre (CM)

En los últimos años, se han abierto nuevas perspectivas de gran interés en el campo de la terapia celular. Las células madre son células indiferenciadas capaces de llevar a cabo la

proliferación, autorrenovación y producción de un amplio número de células diferenciadas así como la regeneración de células madre tisulares (Peng and Huard, 2003).

En los últimos años las CM han generado enormes expectativas y se han convertido en una gran esperanza para el desarrollo de nuevas terapias celulares en el contexto de una medicina regenerativa (Fortier and Travis, 2011; Diekman and Guilak, 2013).

Las células madre se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación o según su origen. En función de la capacidad de diferenciación pueden ser: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, oligopotenciales o unipotenciales. Dependiendo del origen, las clasificamos en: embrionarias, germinales, fetales, o adultas (Kolios and Moodley, 2013; Borena et al., 2015).

En medicina humana se han empleado para tratar defectos en tejidos blandos, lesiones en quemados, cicatrices y para regenerar diferentes tejidos dañados (Teng et al., 2014).

En medicina veterinaria a nivel experimental y clínico se han empleado para acelerar la cicatrización de heridas. En el estudio de Griffeth y colaboradores, empleaban el uso de células madre mesenquimales de grasa y Plasma Rico en Plaquetas (en asociación o de forma individual) para el tratamiento de heridas en piel de delfines (Griffeth et al., 2014). Luo y colaboradores inyectaban MSC derivadas de cordón umbilical en defectos completos realizados en piel de ratones, y mostraron una mejora significativa de la cicatrización dando lugar a una curación más rápida (Luo et al., 2010).

Factores de Crecimiento

Introducción

Los factores de crecimiento son proteínas de señalización (hormonas tisulares) que influyen en el metabolismo de otras células (Fortier and Smith, 2008). Canalis en 1988 clasificó los factores de crecimiento por primera vez, y se definieron como un grupo de sustancias polipeptídicas solubles y difusibles que actúan como agentes reguladores del crecimiento, diferenciación, proliferación y metabolismo celular de numerosos tipos de células (Canalis et al., 1988; Vega et al., 2000).

Estas sustancias son capaces de Inducir la migración de otros tipos celulares hasta el lugar de la lesión, de forma que desencadenan un efecto quimiotáctico sobre células como los fibroblastos y los leucocitos, que intervienen de forma vital en el proceso de reparación y regeneración tisular (Canalis, 1992; Lind, 1996).

Con referencia a la síntesis de los factores de crecimiento, pueden ser producidos por una gran variedad de tipos celulares, y pueden actuar sobre las mismas células que los sintetizan

(factores autocrinos) o sobre otras células dentro del tejido (factores paracrinos). En el torrente sanguíneo los podemos encontrar libres, unidos a proteínas o en el interior de los gránulos alfa de las plaquetas (Canalis, 1992; Grageda et al., 2005).

Es importante destacar que el efecto de los factores de crecimiento no será el mismo en todos los tejidos y también variará dependiendo de la situación (Stone, 1998). Estas proteínas actuarán uniéndose a receptores específicos de las membranas celulares, pudiendo potenciarse o inhibirse entre ellos mismos (Chopra and Anastassiades, 1998).

Los factores de crecimiento liberados tras la degranulación de las plaquetas en el lugar de la lesión proporcionan las señales iniciales para la activación de las células integrantes de los tejidos que rodean la zona. Como respuesta a estas señales, las células locales y las infiltradas sufren cambios en la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas con distintas funciones biológicas. Todos estos fenómenos en conjunto, definen el proceso que se conoce como activación celular (Reed et al., 2000). Además ejercen múltiples efectos sobre los fenómenos de remodelación celular (Barnes et al., 1999; Marx and Garg, 2005), permitiendo que interactúen recíprocamente con los leucocitos y con las células endoteliales para modular la reacción inflamatoria en los procesos de cicatrización y de regeneración tisular (Bazzoni et al., 1991; Ouyang and Qiao, 2006).

La secreción activa de los factores de crecimiento por parte de las plaquetas comienza a los 10 minutos de la activación celular y más del 95% de los factores de crecimiento son liberados en una hora (Marx, 2001).

Los principales factores de crecimiento (Tabla 7) liberados tras la activación plaquetaria son los siguientes: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) que incluye las isoformas AA, AB, BB, CC y DD, factor de crecimiento B transformante (TGF-B) con sus isoformas B1, B2 y B3, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento ácido y básico (aFGF y bFGF), factor de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento hepatocitario (HGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento queratinocítico (KGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y factor de crecimiento estimulador de colonias (CSF) entre otros (Hoosgood, 2003; Anitua et al., 2004; Marx, 2004; Enoch et al., 2006b; Reed, 2007).

Tabla 7: Factores de crecimiento que intervienen en el proceso de cicatrización cutánea y el origen de cada uno de ellos (Hoosgood, 2003).

FACTOR DE CRECIMIENTO	ORIGEN
PDGF	Plaquetas, macrófagos, Células endoteliales, queratinocitos, cél. musculares lisas
TGF-B	Plaquetas, linfocitos T, macrófagos, cél.endoteliales, queratinocitos, fibroblastos , cél.musculares lisas
EGF	Plaquetas, macrófagos, saliva, orina, leche, plasma
FGF	Macrófagos, linfocitos T, mastocitos, cél.endoteliales, fibroblastos, diferentes tejidos
KGF	Fibroblastos
IGF-1	Macrófagos, fibroblastos, hígado y otros tejidos
CTGF	Cél.endoteliales y fibroblastos
VEGF	Queratinocitos
TNF	Macrófagos, mastocitos, linfocitos T
CSF	Diversas células
NGF	Glía y neuronas
HGF	Cél.mesenquimales

PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas), TGF-B (Factor de crecimiento transformante B), EGF (Factor de crecimiento epidérmico), FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), KGF (Factor de crecimiento queratinocítico), IGF-1 (Factor de crecimiento insulínico tipo 1), CTGF (Factor de crecimiento de tejido conectivo), VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular), TNF (Factor de necrosis tumoral), CSF (Factor de crecimiento estimulador de colonias), NGF (Factor de crecimiento nervioso), HGF (Factor de Crecimiento Hepatocítico).

Algunos de estos factores son clave en la reparación de determinadas patologías como la cicatrización de heridas y úlceras, úlceras corneales, fracturas óseas, lesiones ligamentosas y tendinosas, entre otras (Cullinane et al., 2002; Molloy et al., 2003; Anitua et al., 2004; Southwood et al., 2004; Abegao et al., 2015).

El uso de factores de crecimiento y citoquinas para promover la cicatrización cutánea ha existido desde los años 40, dónde los clínicos comenzaron a utilizarlos a través de extractos embrionícos que aplicaban en las heridas cutáneas (Zielins et al., 2014). Los factores de crecimiento se liberan en la zona de la lesión cutánea y son necesarios para la comunicación entre diversos tipos celulares como los fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, queratinocitos y células inmunitarias. Se ha comprobado que la aplicación exógena de factores de crecimiento afecta el proceso de cicatrización cutánea, mejorando la misma en el tiempo (Steed, 1995; Werner and Grose, 2003).

En el proceso de cicatrización cutánea intervienen una serie de factores de crecimiento principales, entre los cuales se encuentran los siguientes: PDGF, EGF, FGF, IGF-1/2, VEGF, TGF-B, KGF (Koveker, 2000; Grazul-Bilska et al., 2003; Jeffcoate et al., 2004). Hasta el momento solo el

PDGF ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentación de Estados Unidos (FDA) y por las Autoridades Europeas (EMA) para la aplicación clínica en pacientes (Papanas and Maltezos, 2007; Murphy and Evans, 2012).

Cada factor de crecimiento tiene más de un efecto sobre el proceso de cicatrización de heridas. Estos efectos celulares incluyen favorecer la quimiotaxis, promover la mitosis (propiedades mitogénicas), estimulación y activación celular y propiedades reguladoras sobre diferentes componentes del proceso de cicatrización (Pavletic M, 2010a).

Estos factores de crecimiento no solo regulan la migración y proliferación celular, sino que también remodelan la matriz extracelular y promueven la angiogénesis, creando un ambiente ideal que favorece el proceso de cicatrización cutánea (Demidova-Rice et al., 2012b).

Principales factores de crecimiento

Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF)

El PDGF es una proteína catiónica de 31-Kda compuesta por dos cadenas peptídicas que se identifican como A y B, unidas por puentes disulfuro en tres formas diméricas: AA, AB y BB. Existen dos tipos de receptores para el PDGF, el α y β (Westermarck, 1990).

Todos los PDGF'S comparten los mismos receptores tirosín-kinasa; el receptor del Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas alpha (PDGFR α) y beta (PDGFR β). El PDGFR α reconoce tanto a PDGF-A como a PDGF-B, de forma que puede unirse con PDGF-AA, BB y AB. En cambio, el PDGFR β solo reconoce a la subunidad PDGF-B, y como resultado tendrá afinidad por PDGF-BB, se unirá a PDGF-AB con baja afinidad y no se unirá a PDGF-AA (Bennett and Schultz, 1993a). Al mismo tiempo ambos receptores se pueden combinar para formar homodímeros o heterodímeros, dando lugar a tres posibles combinaciones (PDGFR- $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$) teniendo cada uno de ellos una afinidad variable por los distintos PDGF'S (Reigstad et al., 2005).

Dicho factor fué aislado por primera vez en el interior de las plaquetas, de aquí viene su nombre (Antoniades et al., 1975). Lo producen las plaquetas, las células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y células musculares lisas (Lynch et al., 1987; Hoosgood, 2003). Se trata de un potente agente quimiotáctico y mitogénico de los fibroblastos, células musculares lisas, y células inflamatorias. El PDGF trabaja junto con el TGF-B, EGF y IGF-1, los cuales actúan más adelante en el ciclo celular y estimulan la actividad mitogénica de las células mesenquimales (Huang et al., 1984). La actividad mitogénica del PDGF por los fibroblastos es gracias a su habilidad para inducir la síntesis de IGF-1, que actúa como un factor autocrino. Aunque las

células endoteliales sintetizan PDGF no responden a él, sino que trabajan de una forma paracrina estimulando las células musculares lisas adyacentes, estas mismas células musculares lisas también actúan de forma autocrina y sintetizan PDGF (Hoosgood, 2003).

El PDGF no se detecta en la circulación, por lo que aparentemente parece ser un factor que se sintetiza y actúa localmente. La unión de este factor a proteínas plasmáticas y proteínas de la matriz extracelular, incluyendo la $\alpha 2$ macroglobulina, puede modular su actividad biológica (Scher et al., 1979).

Es un potente activador de las células de origen mesenquimal (Pierce et al., 1991). Estimula la síntesis de diversos componentes de la matriz extracelular del tejido conectivo como glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) o proteoglicanos (Hsu and Chang, 2004). Además el PDGF también modula importantes procesos relacionados con la remodelación tisular, como la endocitosis o la migración tisular (Kiritsy et al., 1993). Durante el proceso de reparación de los tejidos, el PDGF es uno de los primeros factores de crecimiento detectables en el foco de lesión tras el daño tisular (Hsu and Chang, 2004).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El PDGF es uno de los primeros factores secretado tras una lesión y promueve las reacciones celulares durante todas las fases del proceso de cicatrización cutánea (Kiritsy et al., 1993). Dicho factor es secretado en el área de la lesión cutánea principalmente por los gránulos alpha de las plaquetas (Papanas and Maltezos, 2007), pero también es sintetizado por diferentes células presentes al inicio del lugar de la lesión, como macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos (Werner and Grose, 2003; Papanas and Maltezos, 2007). De forma similar al FGF-2, el PDGF estimula la proliferación y migración de células endoteliales (Heldin and Westermark, 1999).

La plaqueta es la primera célula en llegar a la zona de la herida y la que encontramos en mayor concentración. Los monocitos circulantes son atraídos a la zona de la herida y se convierten a macrófagos. Estas células también pueden sintetizar PDGF, tal y como los fibroblastos que son atraídos a la zona de la lesión por dicho factor. Los macrófagos y los fibroblastos se activan por el PDGF, y por lo tanto hay una función autocrina de este factor hacia estas células (Hoosgood, 2003).

El PDGF sintetiza fibronectina y hialuronano, componentes importantes para la matriz extracelular. Además de colagenasa, vital para la remodelación de la herida. En principio este factor no estimula directamente la producción de colágeno por parte de los fibroblastos, sino que estimula la producción de TGF-B, cuyo factor inicia la síntesis de colágeno (Hoosgood, 2003).

Además del fuerte efecto quimiotáctico por monocitos, fibroblastos, neutrófilos y células musculares lisas y de sus propiedades mitogénicas, promoviendo la mitosis de fibroblastos, células endoteliales y de músculo liso, también estimula la angiogénesis, la contracción de la herida, la formación de tejido de granulación, y la remodelación de la herida. Además inhibe la agregación plaquetaria y regula la expresión de integrinas (Pavletic M, 2010a).

Las terapias con PDGF sobre la cicatrización cutánea de heridas se basan mayoritariamente en estudios experimentales en modelos de animales diabéticos. En uno de los estudios se observó un incremento en la proliferación de fibroblastos y de la densidad vascular, consiguiendo así una cicatrización cutánea más rápida (Greenhalgh et al., 1990). El uso de PDGF recombinante humano ha demostrado resultados satisfactorios en el tratamiento de úlceras de pie en diabéticos, aunque solo se ha aprobado una terapia tópica por la FDA para su uso en pacientes, llamada Regranex[®] (Smith and Nephew, INC., London, UK) (Steed, 2006).

Se ha demostrado que los niveles de PDGF son bajos en ratas diabéticas y de avanzada edad, lo que desencadena un retraso en la respuesta al daño cutáneo (Werner and Grose, 2003). Al igual que en el estudio anterior, los niveles de PDGF también los encontraron bajos en úlceras que no cicatrizaban en humanos (Pierce et al., 1995), probablemente debido a una menor producción o a una mayor concentración de proteasas. Como resultado, el tratamiento con PDGF exógeno ha sido estudiado en mayor profundidad y se ha encontrado que es beneficioso para el tratamiento de pacientes con heridas crónicas, y tras su aprobación por la FDA, está siendo ampliamente empleada en humana para su tratamiento en úlceras diabéticas (Brown et al., 1994; Leahy and Lawrence, 2007).

Ante la inhibición a nivel experimental del PDGF-B en heridas de 4mm de grosor completo en ratas, se observó un retraso significativo en la cicatrización de las heridas, con una notable reducción del cierre cutáneo, de la concentración de miofibroblastos, de colágeno tipo 1 y de la expresión de fibronectina. La inhibición del PDGF-B también inhibe la proliferación y migración de pericitos, junto con la activación de fibroblastos y por lo tanto afecta la angiogénesis y la neoformación de vasos sanguíneos durante el proceso de cicatrización cutánea (Rajkumar et al., 2006).

Efecto sobre la cicatrización de otros tejidos

Se ha demostrado que el PDGF juega un papel importante en el sistema nervioso central, particularmente en la supervivencia y regeneración neuronal y en la mediación de la proliferación, diferenciación y migración de células gliales (Wolswijk, 2002; Milenkovic et al., 2003).

En el proceso de cicatrización tendinosa también interviene de forma activa. En el estudio experimental de Duffy y cols en 1995 (Duffy et al., 1995), se observaron elevados niveles de PDGF durante el proceso de reparación de este tejido. El PDGF estimula la síntesis de colágeno y de otras proteínas de la matriz extracelular tendinosa de manera dosis dependiente (Molloy et al., 2003).

La aplicación de PDGF en lesiones ligamentosas ha demostrado una mejoría de los parámetros biomecánicos (Letson and Dahners, 1994), pero no se observó un efecto sinérgico en los casos en los que se combinaron los diferentes factores de crecimiento.

A nivel articular, los condrocitos expresan receptores para el PDGF. Se ha visto que tras la administración intraarticular de PDGF-BB en ratas se obtuvo un incremento transitorio y precoz de la actividad osteogénica en las capas más profundas del cartílago articular (Hulth et al., 1996).

La aplicación de PDGF sobre modelos experimentales de osteotomía de tibia en conejos ha demostrado efectos beneficiosos sobre la cicatrización ósea, además, dicho factor parece que estimula la resorción ósea mediante el incremento en el número de osteoclastos, que son las células clave en el proceso de remodelación ósea (Nash et al., 1994)

Factor de Crecimiento Transformante B (TGF-B)

El TGF- β es una proteína multifuncional con tres isoformas distintas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 en mamíferos (Hoosgood, 2003; Zielins et al., 2014). La isoforma TGF- β 1 es la más abundante de las tres, estando presente en líquido amniótico, saliva, leche y humor acuoso y vítreo del ojo. El TGF- β 3 también ha sido aislado en humana del cordón umbilical (Attisano et al., 1994; Hoosgood, 2003).

El TGF- β una estructura dimérica formada por 2 subunidades de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro, con un peso molecular total de 25000 daltons (Assoian and Sporn, 1986; Centrella et al., 1986). Fue identificado por primera vez en tejidos transformados (sarcomas), y de aquí su nombre (Burgess, 1989).

Tras la síntesis del TGF- β , es secretado al exterior como un complejo inactivo que está formado de un dímero TGF- β , su pro péptido LAP (“latency associated peptide”) y LTBP (“latent TGF- β binding proteins”) (Hoosgood, 2003; Todorovic et al., 2005). Como resultado, el TGF- β necesitará ser activado antes de poder unirse al receptor, este proceso se llama “latent TGF- β activation” o “TGF- β formation” (Gleizes et al., 1997). Con este estado de latencia se consigue controlar su actividad, regulando así su biodisponibilidad y limitando su difusión desde las células que lo secretan, matizando así las acciones autocrinas y paracrinas del TGF-B (Arrick et

al., 1992). Los péptidos latentes pueden ser activados por proteasas como la plasmina y la trombina o a través de interacciones físicas con proteínas como la trombospondina-1 o las integrinas. Por otra parte, el óxido nítrico (NO) también provoca la activación del TGF- β (Blobe et al., 2000; Todorovic et al., 2005).

El mayor reservorio de TGF- β son los gránulos alfa de las plaquetas, donde lo encontramos en concentraciones de 40 a 100 veces superiores a otros tejidos (Assoian and Sporn, 1986). También encontramos concentraciones elevadas de este factor en el hueso, sobretodo en el interior de los osteoblastos (Robey et al., 1987; Lind, 1996). El TGF- β también puede ser secretado por otras células, como hemos visto con anterioridad en la tabla 7, como los linfocitos, los macrófagos, fibroblastos, entre otras (Hoosgood, 2003).

Las propiedades quimiotácticas del TGF- β son similares a las del PDGF. Tiene un potente efecto mitogénico sobre los macrófagos, células musculares lisas, y osteoblastos. Al igual que el PDGF, estimula la angiogénesis y la fibroplasia, pero también la migración de queratinocitos. Posee un efecto inhibitorio sobre la producción de metaloproteinasas de matriz, proliferación de queratinocitos y crecimiento de células endoteliales, linfocitos y células epiteliales (Pavletic M, 2010a).

Con referencia a las funciones biológicas de este factor, regula la proliferación, migración y metabolismo celular puede tanto estimular como inhibir la diferenciación y la proliferación celular, en función de su concentración, del ambiente en el que se encuentra y por último del tipo celular al que es expuesto (Kiritsy et al., 1993). A nivel general, estimula las células de origen mesenquimal, e inhibe las de origen ectodérmico, además participa en la respuesta inflamatoria y en el proceso de reparación tisular (Lind, 1996; Clark and Coker, 1998). También es importante destacar su papel sobre el sistema inmune, ya que interviene en la apoptosis, selección y activación de células T (Huang and Huang, 2005).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 presentan diferentes funciones pero a la vez superpuestas durante el proceso de cicatrización cutánea. Tanto la TGF- β 1 como la TGF- β 2 inducen la diferenciación de fibroblastos y miofibroblastos, la deposición de matriz extracelular, la contracción cutánea y la formación de cicatriz, mientras que la TGF- β 3 tiene la habilidad de reducir la formación de cicatriz y de promover la angiogénesis. La isoforma TGF- β 1 es la que predomina en la cicatrización de heridas cutáneas (Barrientos et al., 2008).

Se ha visto que trastornos en las concentraciones de TGF- β 1 pueden dar lugar a desórdenes fibroproliferativos, como la formación de queloides o la cicatrización hipertrófica (Penn et al.,

2012). Debido a su importante función en el proceso de fibrosis, existen múltiples estudios que investigan los efectos de la modulación del TGF- β en heridas. En el año 2012 se realizó un estudio en el que se comprobó que el factor TGF- β 3 era necesario para la reepitelización de heridas excisionales, ya que afecta a la actividad de los queratinocitos mediante efectos paracrinos (Le et al., 2012).

Como hemos podido percibir, el TGF- β juega un papel muy importante en la cicatrización de heridas, su efecto quimiotáctico sobre las células inflamatorias, su efecto sobre el estímulo de la angiogénesis y sobre la formación de matriz extracelular, son tres características vitales en el proceso de cicatrización cutánea (Bennett and Schultz, 1993a). El tratamiento de heridas cutáneas en modelos experimentales con el factor TGF-B, ha demostrado una reversión de factores negativos para la cicatrización, como pueden ser la edad o los glucocorticoides (Beck et al., 1991). Por otra parte, a pesar de su efecto procicatrizante, hay autores que describen efectos de fibrosis excesiva en heridas cutáneas, resultando en la deposición exagerada y desordenada de colágeno (Border and Ruoslahti, 1992).

La mayoría de la información que conocemos sobre la acción del TGF- β sobre la cicatrización cutánea se ha obtenido a través de estudios en animales con modelos de herida incisional o excisional (Finnsen et al., 2013). Estudios preclínicos demuestran una reducción significativa de la formación de cicatriz y una mejora considerable de la arquitectura cutánea tras la administración intradérmica de avotermin (TGF-B3) en ratas adultas (Shah et al., 1994, 1995). Además estudios experimentales de fase 2 han demostrado que administraciones intradérmicas de avotermin en revisiones de cirugía de cicatrices (So et al., 2011) y heridas bilaterales en piernas (McCollum et al., 2011) son bien tolerados y resultan en una mejora significativa del aspecto externo de la cicatriz comparado con el placebo.

El TGF-B junto con otros factores de crecimiento interviene en la fase inflamatoria y en la fase de proliferación del proceso de cicatrización de heridas, mediante la atracción de fibroblastos a la zona de la lesión. El TGF- β 1 ha demostrado acelerar la cicatrización de heridas en modelos experimentales animales mientras que el TGF- β 2 ha mostrado su eficacia tras su aplicación tópica en úlceras de pie de personas diabéticas. Durante la fase de proliferación y remodelación, el TGF- β 3 reduce la deposición de colágeno y, por lo tanto, reduce la formación de cicatriz en la herida (Enoch et al., 2006b).

Efecto sobre la cicatrización de otros tejidos

El TGF- β fomenta la formación de tejido óseo a través de varios mecanismos, como incrementando el número de células capaces de expresar el genotipo de los osteoblastos,

actuando directamente sobre los osteoblastos diferenciados para la síntesis de colágeno en la matriz ósea. También puede inhibir la acción de los osteoclastos o disminuir su formación y con ello disminuir la resorción ósea (Bonewald and Mundy, 1990; Mohan and Baylink, 1991; Grageda et al., 2005).

En diversos estudios experimentales se ha observado que el tratamiento de fracturas con TGF- β , resulta en un incremento del tamaño del callo óseo y mejora en los parámetros biomecánicos (Lind et al., 1993). Las propiedades osteoinductoras del TGF- β fueron demostradas una vez más en un estudio experimental de defecto óseo in vivo, en los que el factor fue aplicado sobre matriz ósea demineralizada (Kibblewhite et al., 1993). Adicionalmente se ha demostrado su poder osteointegrador y de fijación mecánica de implantes insertados en hueso de perro adulto (Lind, 1996).

El TGF- β 1 también tiene efecto sobre el tejido cartilaginoso, ya que aumenta la síntesis de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, el colágeno tipo I y el biglicano, y disminuye el catabolismo de esta matriz cartilaginosa (Gleizes et al., 1997). Se puede concluir que el TGF- β 1 es un factor de crecimiento anabólico expresado en altos niveles en el cartílago sano, pero se encuentra prácticamente ausente en cartílago afectado por osteoartritis (Davidson et al., 2006).

Con referencia a su uso en tendón, resaltar que dicho factor interviene en todas las fases de la cicatrización tendinosa promoviendo la reparación tisular a través del estímulo de la migración de células extrínsecas, regulación de la actividad de las proteasas, de la producción de colágeno y del cese de la proliferación tisular (Molloy et al., 2003). Estudios experimentales in vitro han demostrado que las tres isoformas del TGF- β incrementan de forma significativa la producción de colágeno tipo I y tipo II que son los más abundantes en el tendón, además de incrementar la viabilidad celular (Klein et al., 2002). En cambio, también se ha estudiado su uso a dosis elevadas, observándose que puede llegar a producir efectos negativos sobre la reparación del tendón, como fibrosis o formación de adherencias, desencadenando por lo tanto una reducción de la movilidad tendinosa (Molloy et al., 2003).

Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El EGF es un polipéptido con peso molecular de 130 KDa en su síntesis, este peso molecular luego desciende a 6 KDa una vez es activado y contiene 53 aminoácidos (Hoosgood, 2003). Fue descrito por primera vez por Cohen en 1962 (Cohen, 1962) a partir de la glándula submaxilar del ratón. Presenta una homología de entre un 30% y un 40% en aminoácidos con el TGF- α , por lo que comparten actividades y características. Ambos son agentes quimiotácticos y mitogénicos

de los queratinocitos y los fibroblastos (Buckley et al., 1987). El EGF es producido principalmente por las plaquetas y lo encontramos a elevadas dosis al inicio del proceso de cicatrización tisular. También podemos encontrarlo en orina, saliva, y lágrimas (Hoosgood, 2003), además de en líquido amniótico y cerebroespinal (Arnás et al., 2002).

Como células diana del EGF podríamos referirnos a aquellas derivadas del ectodermo, como la córnea, epidermis, hígado, páncreas, etc. Los receptores para EGF se han detectado en diferentes estirpes celulares y poseen actividad tirosín-kinasa (Bennett and Schultz, 1993a).

Posee un efecto estimulante de la mitogénesis, incrementando la síntesis de ADN, ARN y de proteínas, tanto en fibroblastos como en células endoteliales, además promueve la neovascularización, la migración de células epiteliales, el crecimiento y la diferenciación de queratinocitos (Kiritsy et al., 1993).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El EGF juega un importante papel sobre la homeostasis tisular por la influencia de la proliferación de células epiteliales, su crecimiento y migración. También aporta soporte nutricional mediante la estimulación de la angiogénesis y, como resultado, se le considera clave en el proceso de cicatrización cutánea y regeneración de tejidos (Girdler et al., 1995). Dicho factor es liberado por las plaquetas durante las fases tempranas de la cicatrización de las heridas. Estudios experimentales en animales han demostrado que el tratamiento de heridas con EGF exógeno acelera las fases del proceso de cicatrización en diferentes tipos de herida. Promueve la cicatrización de estas heridas mediante la estimulación de la migración y división de las células epiteliales. El estudio histológico de las heridas que fueron tratadas con el EGF muestra un incremento en el número de fibroblastos, aunque el propio factor no los aumenta por sí solo directamente sino que lo hace mediante un efecto mitogénico y quimiotáctico consiguiendo una mayor producción de colágeno (Bennett and Schultz, 1993b).

Es importante destacar el importante y vital papel que el EGF desempeña en la diferenciación, proliferación, migración y adhesión de los queratinocitos. La aplicación tópica del EGF recombinante es efectiva induciendo la epitelización de quemaduras de grosor parcial y en heridas superficiales en proceso de granulación (Enoch et al., 2006b). En el tratamiento de células epiteliales cultivadas con EGF, se observó una estimulación de la migración de colonias de queratinocitos, así como de la división de queratinocitos y la regeneración in vitro y in vivo de células epiteliales (Barrandon and Green, 1987).

Kim y colaboradores estudiaron el efecto de EGF en la formación de la cicatrices cutáneas en heridas de grosor completo de ratón, concluyendo que la aplicación local de EGF mejoraba la

cicatrización cutánea y reducía la formación de cicatriz (Kim et al., 2010), y justificando estos efectos con los siguientes argumentos: supresión de la respuesta inflamatoria, disminución de la expresión de TGF- β 1 y mediación en la síntesis de colágeno. En otro estudio se trataron quemaduras producidas por láser con EGF y observaron una mejoría significativa de la cicatrización cutánea en aquellas heridas tratadas con EGF (Lee et al., 2013).

En estudios clínicos de humana se ha demostrado una regeneración epidérmica acelerada de heridas de grosor parcial y de quemaduras de segundo grado tras el tratamiento de las mismas con EGF tópico (Brown et al., 1989). En otro estudio, trataron heridas crónicas que no respondían a tratamientos conservadores con EGF de forma tópica, y se observó una aceleración en la cicatrización de las heridas tratadas con dicho factor en 8 de 9 de los pacientes (Brown et al., 1991). Además de su extendido uso en heridas cutáneas, también se emplea como terapia para el cáncer y para vacunas, basándose en las propiedades reguladoras sobre la proliferación celular que posee (Oldoos et al., 2013).

Efecto sobre otros tejidos

En las lesiones tendinosas el EGF juega un papel importante durante la fase temprana de la cicatrización, aunque no se expresa en los tenocitos de la zona de reparación sí está presente en las células inflamatorias de los alrededores (Tsubone et al., 2004).

El EGF también interviene de forma positiva en la curación de heridas corneales, donde los receptores de este polipéptido son expresados por muchos tipos de células como fibroblastos, queratocitos, células endoteliales vasculares y epiteliales. Puede sintetizarse en células involucradas en la curación de heridas, incluyendo plaquetas, queratocitos y macrófagos activados. Este mecanismo de aceleración de la curación del epitelio corneal ha sido registrado en humanos, cuyos análisis en la fase S del ciclo celular durante la reparación indican que el tratamiento con EGF induce una tasa elevada de replicación epitelial, particularmente cerca de la región limbar, en el intervalo de 12 a 24 horas después de las heridas (Kitazawa et al., 1990).

Con referencia a su uso en traumatología, el EGF aumenta la proliferación de osteoblastos, aunque inhibe la síntesis de matriz osteoide (Arnas et al., 2002). A nivel de los condrocitos, se ha observado que aumenta la síntesis de ADN in vitro de forma edad-dependiente (Ribault et al., 1997).

Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)

La familia de los EGF se compone de un gran número de proteínas que van desde el FGF-I hasta FGF-23, y también son conocidos como los “factores de crecimiento ligados a la heparina”

(Olsen et al., 2003). Encontramos dos tipos de FGF: el FGF-1 o aFGF (ácido) y el FGF-2 o bFGF (básico), ambos tienen una homología entre amino ácidos del 50%, además se encuentran los dos en la matriz extracelular, unidos generalmente a heparina lo que les protege de la degradación enzimática (Hoosgood, 2003). Sus nombres hacen referencia a sus diferentes puntos isoeléctricos, con un pH de 5,6 para el aFGF y un pH de 9,6 para el bFGF. Tanto un factor como el otro poseen un peso molecular que oscila alrededor de los 17KDa. Los FGF'S han sido aislados de diversas sustancias como el suero sanguíneo y de diversos tejidos como la hipófisis, cerebro, retina, ovario, hueso y corteza adrenal (Canalis, 1992; Bennett and Schultz, 1993a; Lind, 1996).

Las células del endotelio vascular, los macrófagos y las plaquetas son las principales fuentes de bFGF (Kiritsy et al., 1993). En general, el EGF es producido por fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas y condrocitos. Dicho factor posee un potente efecto mitogénico por las células mesenquimales (como los fibroblastos, condrocitos y mioblastos) y por las células de origen neuroectodérmico. También son potentes mitógenos para las células endoteliales, la angiogénesis y pueden estimular a los queratinocitos (Nimni, 1997). Fueron aislados por primera vez en los años 70 a partir de extractos de cerebro bovino, basándose en su carácter mitogénico y angiogénico. Son producidos en algún momento durante el desarrollo de tejidos tales como epitelial, muscular, conectivo y nervioso. Debido a que los FGFs han perdido la secuencia del péptido señal, el cual determina en otros factores de crecimiento su secreción extracelular vía retículo endoplásmico rugoso/aparato de Golgi, se ha sugerido que su liberación fuera de la célula puede darse siguiendo una ruta exocítica independiente (Mignatti and Rifkin, 1991).

Se han aislado un mínimo de cuatro receptores diferentes para el FGF, y son los siguientes: FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4 (Bennett and Schultz, 1993a).

Tanto la forma ácida como la básica de FGF poseen un marcado efecto mitogénico sobre células de origen mesodérmico y neuroectodérmico, siendo la bFGF más potente que la aFGF (Canalis et al., 1991; Lind, 1996). La forma básica del FGF es un factor de crecimiento multifuncional que ejerce una profunda influencia en la fisiología de la cicatrización de los tejidos. Su modo de acción incluye la modulación de poblaciones de células madre, así como de la expresión de genes específicos que codifican para las proteínas de la ECM, receptores celulares, proteasas de MEC e inhibidores de las mismas (Gospodarowicz et al., 1987). El FGF-2 se degrada rápidamente cuando se inyecta o es ingerido, llegando a perder hasta un 99% de su actividad mitogénica en poco tiempo. A pesar de su gran potencia angiogénica y mitogénica (Edelman et al., 1991).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

Tanto el aFGF como el bFGF contribuyen en reepitelización, angiogénesis y formación de tejido de granulación (Werner and Grose, 2003). Adicionalmente a su intervención directa en el proceso de cicatrización cutánea, el FGF-7 y el 10 también estimulan la producción de TGF- α gracias a los queratinocitos y, por lo tanto, indirectamente apoyan y refuerzan el proceso de epitelización (Niu et al., 2007)

Estudios en animales han demostrado la eficacia del FGF-2 exógeno al favorecer la cicatrización de las heridas, lo que ha llevado también a su utilización clínica. En éste caso ha sido empleado en heridas quirúrgicas cotidianas, para el tratamiento de úlceras (de piel y digestivas) y quemaduras en pacientes diabéticos, cuya velocidad de cicatrización se ve reducida a la mitad (Gospodarowicz et al., 1987) En un modelo experimental de porcino de herida cutánea de espesor parcial, la administración exógeno de bFGF, desencadenó una aceleración de la reepitelización cutánea (Hebda et al., 1990).

Se ha demostrado que existe un expresión anormal de FGF-1, -2, y -7 en heridas de animales diabéticos con elevada edad (Komi-Kuramochi et al., 2005). Sin embargo, tras la aplicación de FGF en heridas cutáneas experimentales se observa una mejoría significativa del proceso de cicatrización de la misma, además de una aceleración del proceso en ratas diabéticas (Bing et al., 2007). Otro estudio demostró que el bFGF regula la síntesis y degradación de la matriz extracelular a través de la regulación de la distribución del colágeno, de las fibras alpha del músculo liso y de la expresión de TGF- β 1. Además, tras su aplicación se produjo una reducción en la formación de cicatriz y una inducción del proceso de cicatrización gracias a la inhibición de TGF- β 1. Como resultado de este estudio se ha sugerido que el uso de bFGF afecta de forma positiva la formación de cicatrices hipertróficas tanto in vitro como in vivo (Shi et al., 2013).

El FGF junto con el VEGF están activos durante la fase de proliferación. El FGF promueve la proliferación de fibroblastos y la acumulación de colágeno, además de acelerar la formación de tejido de granulación. También se ha visto en estudios de experimentales que FGF acelera la regeneración epitelial junto con la formación de tejido de granulación en heridas isquémicas inducidas en modelos animales (Enoch et al., 2006b).

En medicina humana también se han desarrollado estudios clínicos, en los cuales se vió que al aplicar FGF-1 y FGF-2 en el tratamiento de quemaduras producía una mejoría en el proceso de cicatrización (Barrientos et al., 2008). Este dato se corroboró en otro estudio donde el uso de FGF-1 recombinante en quemaduras de espesor parcial en humanos, también aceleró proceso de cicatrización cutánea (Ma et al., 2007).

Efecto sobre otros tejidos

Durante la reparación tendinosa, el bFGF produce una proliferación de los fibroblastos del tendón. Durante las primeras 8 semanas tras el daño tendinoso, el bFGF se encuentra incrementado, en mayores concentraciones en los tenocitos del epitendón y en las células inflamatorias y fibroblastos de la vaina tendinosa. Tras una lesión este factor está implicado en la respuesta proliferativa y angiogénica del tendón así como en la síntesis de colágeno (Hsu and Chang, 2004). En un modelo experimental de daño tendinoso en rata se mostró que la aplicación de bFGF provocaba un incremento en la proliferación celular y en la síntesis de colágeno tipo III (Chan et al., 2000).

En el campo de la traumatología, se han realizado estudios sobre hueso y cartílago. En el caso de la aplicación de bFGF sobre huesos fracturados, se ha visto que actúa sobre los osteoblastos, ejerce un efecto proliferativo sobre ellos, por lo que incrementan la formación de hueso a través de un aumento de células con capacidad osteogénica. En un modelo experimental de fracturas óseas en ratas, la cicatrización del hueso se vio acelerada tras la administración de bFGF, consiguiendo un incremento en la producción de callo óseo y de contenido mineral del hueso (Lind, 1996). El uso de bFGF en cartílago promueve la diferenciación y proliferación de los condrocitos tanto en estudios in vivo como in vitro (Gaissmaier et al., 2008).

Este factor se ha empleado en otros campos, como a nivel gastrointestinal, donde se ha visto que acelera la cicatrización en úlceras duodenales (Szabo et al., 1994) y, en cardiología, para mejorar la circulación colateral y función miocárdica tras un infarto (Hughes et al., 2004).

Factor de Crecimiento Queratinocítico (KGF)

El KGF está muy relacionado con el FGF, ya que comparten cierta homología en su secuencia de aminoácidos, tiene un peso molecular de 28 KDa y presenta un efecto mitogénico muy específico por los queratinocitos. Es producido por las células mesenquimales, principalmente por los fibroblastos, pero también por las células endoteliales y células musculares lisas. La expresión del KGF no se ha visto en las células epiteliales, aunque estas si expresan el receptor FGFR2 que es el único receptor que posee una elevada afinidad por el KGF, por ello, podríamos concluir con que el KGF actúa mayoritariamente de forma paracrina (Werner, 1998).

Este factor de crecimiento como ya hemos comentado, tiene un potente efecto mitogénico en los queratinocitos, pudiendo también estimular la proliferación y diferenciación de células progenitoras tempranas en el folículo piloso y en las glándulas sebáceas (Pierce et al., 1994). Además del efecto antigénico, ejerce una estimulación sobre la migración de los queratinocitos a través del incremento de la actividad del activador de plasminógeno y la expresión de

metaloproteinasas de matriz que disocian las células de la matriz extracelular (Putnins et al., 1995).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El KFG induce la proliferación y migración de los queratinocitos durante el proceso de cicatrización cutánea, principalmente sobre la fase de remodelación. El KFG-2 recombinante humano induce la proliferación de células epiteliales y se ha demostrado que favorece la cicatrización de úlceras de origen venoso en pacientes diabéticos (Enoch et al., 2006b).

Efecto sobre otros tejidos

Se ha comprobado a través de estudios experimentales que dicho factor previene la caída de pelo, y por lo tanto es de gran ayuda en el tratamiento del cáncer ya que previene la caída del pelo durante la quimioterapia o radioterapia recibida por el paciente. Adicionalmente estimula el crecimiento del folículo piloso (Jang, 2005; Braun et al., 2006).

Factor de Crecimiento Insulínico (IGF)

Los factores de crecimiento similares a la insulina también son llamados somatomedinas, están compuestos de proteínas con una homología del 50% en sus aminoácidos. Tienen una actividad similar a la de la insulina o actúan como factores pro-insulínicos. Encontramos dos tipos, el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF-2). El IGF-1 es idéntico a la somatomedina C, mientras que el IGF-2 es idéntico a la somatomedina (Steed, 1998). El IGF-1 se encuentra en el corazón, hígado, pulmón, páncreas, cerebro y músculo, mientras que el IGF-2 se encuentra principalmente durante el desarrollo embrionario, donde juega un papel vital en el desarrollo del embrión (Hoosgood, 2003). En la mayoría de las especies animales, el IGF-1 es más común, mientras que en humana, es el tipo II el que aparece en mayor concentración. Sin embargo, se ha referenciado como el tipo I tiene un efecto tres veces mayor sobre determinados tejidos (Grageda, 2004).

Una vez sintetizado el IGF se libera al torrente sanguíneo, y es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para posteriormente ser almacenado por los gránulos alfa de las plaquetas (Duan, 2002). El IGF-I o somatomedina C fue aislado por primera vez de suero humano en 1976. Es un polipéptido de 70 aminoácidos con un peso molecular de 7,6 kDa (Shavlakadze et al., 2005).

El IGF-1 desencadena la proliferación, diferenciación e hipertrofia de múltiples líneas celulares, en particular, del músculo esquelético (Philippou et al., 2007). Aproximadamente el 5% del IGF-1 circula libre en suero. La mayor parte del IGF-1 en suero (95%) circula ligado a

proteínas de unión de IGF específicas, de las que se conocen 6 clases (IGFBP 1-6), siendo la principal proteína de unión del IGF-1, la BP3 (Holt and Sonksen, 2008). La vida media del IGF-1 libre es de escasos minutos, mientras que la vida media del complejo IGF-1/IGFBP-3 es de 12-15 horas (Guler et al., 1989). Cuando se administra IGF-1 vía subcutánea, la máxima concentración se alcanza a las 7 horas y la vida media es de unas 20 horas (Grahnen et al., 1993).

Los principales tejidos diana afectados por el IGF-1, en combinación con la hormona de crecimiento, son: músculos, cartílagos, huesos, nervios, piel, hígado, riñones y pulmones (Trejo et al., 2007).

Con referencia a sus efectos biológicos, cabe destacar que a corto plazo provoca hipoglucemia y un aumento en la filtración glomerular y, a largo plazo, incrementa la síntesis de proteínas y de ARN, coopera con el PDGF para aumentar la síntesis de ADN por parte de las células, disminuye la degradación de proteínas, disminuye la lipólisis pero aumenta la lipogénesis, y incrementa la proliferación y diferenciación celular (Langford and Miell, 1993).

Las IGF'S son proteínas anabólicas con una amplia variedad de funciones, entre ellas destacaremos la replicación celular, la síntesis de glucógeno, proteínas y glicosaminoglicanos, y el transporte de glucosa y de aminoácidos a través de la membrana celular (Kiritsy et al., 1993).

Adicionalmente se trata de un potente agente quimiotáctico para las células del endotelio vascular. El IGF-1 liberado por las plaquetas o bien producido por los fibroblastos, estimula la migración de las células del endotelio vascular hacia la zona del daño tisular, consiguiendo aumentar la tasa de neovascularización en la zona del daño (Bennett and Schultz, 1993a).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El IGF interviene de forma activa en el proceso de curación de heridas cutáneas, particularmente sobre las fases de inflamación y proliferación (Gartner et al., 1992). Los fibroblastos existentes en la zona de la herida sintetizan IGF-1, dicho factor ejerce un efecto autocrino sobre ellos mismos. Tanto la IGF-1 como la IGF-2 actúan de manera sinérgica con PDGF, incrementando el proceso de cicatrización cutánea (Kiritsy et al., 1993). La aplicación tópica de IGF-1 en modelo de herida de grosor parcial experimental en porcino produjo efectos mínimos sobre la cicatrización de la herida, sin embargo, la combinación con PDGF-BB se tradujo en un incremento significativo en la cicatrización cutánea (Lynch et al., 1989). Además, se han hallado niveles de IGF-1 bajos en heridas crónicas de pacientes diabéticos (Yu et al., 2007).

Existen diversos estudios que muestran cómo el tratamiento sobre heridas de IGF-1 exógeno acelera el proceso de cicatrización cutánea en ratas diabéticas, ratas sanas y conejos (Tsuboi et al., 1995; Brown et al., 1997; Yu et al., 2007). En otro estudio *in vivo*, se observó una mejora en

el proceso de cicatrización de heridas tratadas con IGF-2 y PDGF en ratas diabéticas, una vez más con un efecto sinérgico entre ambos factores (Greenhalgh et al., 1993). Como resultado de todas estas publicaciones podemos pensar que el IGF posee un efecto más fuerte cuando se usa en combinación con otros factores de crecimiento que cuando se aplica individualmente.

Efecto sobre otros tejidos

El tratamiento con IGF-1, favorece el crecimiento óseo, la masa muscular y el peso de las vísceras (bazo, corazón, hígado, riñón, testículos), aumenta el peso corporal, sin producir cambios en la grasa corporal, disminuye los niveles de glucosa en sangre, aumenta la síntesis de proteínas y disminuye los niveles séricos de ácidos grasos libres (Dercole, 1991).

Durante la reparación tendinosa, su papel primario es el de estimular la proliferación y migración de fibroblastos y de otras células al lugar de la lesión, y así incrementar la producción de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular durante la fase de remodelación (Molloy et al., 2003). En un estudio experimental en el que se aplicó IGF-1 de forma perilesional en un modelo experimental de rotura de tendón de Aquiles, se observó una reducción del déficit funcional y se aceleró la recuperación funcional del tendón lesionado, sin afectar las propiedades biomecánicas de mismo, éstos mismos autores propusieron que el IGF-1 posee cierto efecto antiinflamatorio a nivel del área de la cicatrización tendinosa (Kurtz et al., 1999).

La hormona de crecimiento (GH) es responsable del control del crecimiento longitudinal del hueso mediante el estímulo de la producción de IGF por parte de los condrocitos, posteriormente el IGF regula el crecimiento y el metabolismo condroblástico (Lind, 1996). El IGF-1 favorece la síntesis de proteoglicanos y de colágeno tipo II, al mismo tiempo inhibe la destrucción de la matriz extracelular (Verschure et al., 1996).

Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF)

Se trata de un factor de crecimiento mitogénico, rico en cisteína, que se une a la heparina y es sintetizado por fibroblastos tras su activación con TGF- β . El CTGF tiene una función importante durante la embriogénesis, pero en el animal adulto es un mediador de la actividad del TGF- β en las células del tejido conectivo y, por lo tanto, es un estimulador indirecto de la proliferación celular y de la acumulación de matriz extracelular (Hoosgood, 2003).

Posee propiedades quimiotácticas y mitogénicas para diversas células de tejido conectivo (Pavletic M, 2010a).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El factor de crecimiento del tejido conectivo es un miembro más de una familia de proteínas que, junto con el cysteine-rich 61, actúan en el proceso de reparación de las heridas (Torrecillas Ramos, 2013). Su función es la estimulación y proliferación de fibroblastos y el aumento de la quimiotaxis (Bradham et al., 1991). Además es un importante inductor de la matriz extracelular, aumentando el colágeno tipo y la la fibronectina, y actúa como mediador del TGF- β 1 en el proceso de cicatrización (Kothapalli et al., 1997).

Por otro lado, dicho factor también promueve la angiogénesis y por lo tanto el aporte de nuevos vasos sanguíneos a la zona dañada, además de la fibrosis y la adhesión plaquetaria (De La Mata, 2013).

Efecto sobre otros tejidos

El CTGF ha sido considerado como un mediador de las respuestas fibróticas inducidas por otros factores como el TGF- β , aunque estudios más recientes sugieren que el CTGF podría tener también un importante rol en la activación de la respuesta inflamatoria. A nivel cardiovascular se ha descrito un aumento en la expresión tisular del mismo en diversas patologías, incluidas la arteriosclerosis o la fibrosis cardiaca (Rodriguez Diez, 2015). Dicho factor de crecimiento también participa en el inicio y progresión del daño renal al ser capaz de inducir una respuesta inflamatoria y promover la fibrosis, señalándole como una posible diana terapéutica en el tratamiento de las patologías renales (Sanchez-Lopez et al., 2009).

En el caso de los problemas articulares, destacar que también promueve la regeneración condral (De La Mata, 2013).

Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El VEGF es una molécula grande, de elevado peso molecular (oscila entre 34 y 42 KDa) y está unida a la heparina, entre la que existen diversas formas (Klagsbrun and D'Amore, 1996). Se aisló en los años 70 identificándose como mediador de la permeabilidad vascular. Actúa sobre receptores tirosina quinasa situados en las células endoteliales, teniendo un efecto mitógeno y quimiotáctico sobre éstas (Southwood et al., 2004). Cuando fue descubierto se le llamó "vascular permeability factor", se trataba de una sustancia secretada por células tumorales que incrementaba la permeabilidad vascular y clínicamente desencadenaba el acúmulo de líquido ascítico (Senger et al., 1983).

El VEGF presenta una homología del 24% en sus aminoácidos con el PDGF- β . Su forma activa está compuesta por 2 subunidades idénticas. La unión a su receptor está mediada por el

homodímero a través de la unión del núcleo de la proteína; la modulación de la actividad del VEGF está dada por la unión a heparina, que resulta en una mayor eficiencia de la actividad de quinasa en la superficie celular (Goodsell, 2003).

Se conoce al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las células endoteliales vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Ferrara, 2002). La síntesis de dicho factor no solo se lleva a cabo a través de las células neoplásicas, sino que numerosos tipos celulares lo sintetizan, como las plaquetas, los neutrófilos, las células del endotelio vascular, los queratinocitos, tenocitos y astrocitos (Hsu and Chang, 2004).

Con referencia a las funciones biológicas del VEGF cabe destacar su participación en los procesos normales de la angiogénesis, además de en los estados patológicos como el crecimiento celular (Kim et al., 1993).

Tras la lesión tisular, el VEGF libera enzimas como la colagenasa, que ayudan a romper la membrana vascular, también se induce la expresión de α integrinas que son fundamentales en los procesos de neovascularización y se acaba desencadenando una vasodilatación y un aumento de la permeabilidad vascular, seguida de una migración de células endoteliales junto con monocitos (Hsu and Chang, 2004).

El presente factor de crecimiento desempeña un papel fundamental en la fase de migración y proliferación celular, se trata de el factor más activo durante la fase inflamatoria, siendo determinante en las fases proliferativas y de remodelado, donde actúa estimulando la angiogénesis (Molloy et al., 2003).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El VEGF ejerce un efecto paracrino sobre las células endoteliales, induciendo y apoyando a la vez la angiogénesis en el lugar de la herida, siendo responsable del inicio de los procesos de angiogénesis en el tejido de granulación (Werner and Grose, 2003; Hsu and Chang, 2004).

A través de su administración tópica en heridas, ha demostrado que mejora la cicatrización en heridas isquémicas (Corral et al., 1999). En un estudio en ratas diabéticas, su aplicación tópica aceleró la cicatrización de las heridas, incrementando la epitelización, la angiogénesis, la deposición de tejido de granulación y la formación mínima de cicatriz (Galiano et al., 2004). En otro estudio se inhibió la angiogénesis mediante el uso de una endostatina en un modelo de herida cutánea realizada con laser, y tras el tratamiento a nivel tópico de las heridas con VEGF, éste efecto se revirtió completamente, confirmando así la fuerte capacidad angiogénica del presente factor de crecimiento (Delgado et al., 2005).

El uso tópico de VEGF recombinante humano en pacientes diabéticos con úlceras crónicas en pie, obtuvo resultados positivos, con una buena tolerancia y una cicatrización temprana de dichas úlceras (Hanft et al., 2008).

El VEGF juega un papel importante y está activo durante la fase de proliferación, jugando un papel crucial en la angiogénesis. Su uso por transferencia genética intramuscular ha mostrado una mejoría en la circulación colateral en pacientes con enfermedad vascular periférica, dando lugar a la cicatrización de úlceras isquémicas (Enoch et al., 2006b).

En pacientes diabéticos el proceso de cicatrización de una herida se ve afectado por una serie de acontecimientos: se produce un retraso en la función celular inflamatoria, una síntesis disminuida de citoquinas y factores de crecimiento y una fase inflamatoria prolongada (Wetzler et al., 2000) y de aquí la importancia en el desarrollo de nuevos abordajes para el tratamiento de estos tipos de herida. En heridas experimentales de espesor completo en ratas diabéticas se empleó VEGF-C, y se observó un estímulo en la angiogénesis y linfagiogénesis, además de una aceleración significativa del proceso de cicatrización en las heridas tratadas con el factor en comparación a las heridas placebo. VEGF también reclutaba células inflamatorias (Saaristo et al., 2006). Adicionalmente a su efecto angiogénico, también se ha demostrado la capacidad del VEGF de estimular la proliferación de queratinocitos (Wilgus et al., 2005).

El VEGF-A es el factor vascular más potente y específico y un regulador clave en los procesos de remodelación angiogénica tanto fisiológicos como patológicos (Ferrara et al., 2003).

Efecto sobre otros tejidos

El tendón de Aquiles posee niveles de VEGF prácticamente inapreciables, en cambio sus niveles incrementan tras la ruptura del mismo (Pufe et al., 2001), esto se traduce en que existe un crecimiento vascular bien definido desde los vasos sanguíneos de la periferia del tendón hasta el foco de la lesión. La presente neovascularización proviene de la superficie del epitendón y proporcionan nutrientes, células extrínsecas y factores de crecimiento al área de la lesión (Molloy et al., 2003). El VEGF promueve la cicatrización tendinosa mediante la aceleración de la angiogénesis (Hsu and Chang, 2004).

Además dicho factor de crecimiento mantiene la formación de hueso subcondral en el cartílago de la placa de crecimiento (Gaissmaier et al., 2008). Juega un importante papel en la formación de hueso endocondral y como resultado, su ausencia se relaciona con defectos en el crecimiento esquelético (Nimni, 1997).

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

El TNF originalmente se definió como una causa de necrosis tumoral. Desempeña sus funciones sobre la angiogénesis, inflamación y fibrosis. Encontramos dos tipos TNF- α y TNF- β . El TNF- α es secretado por los monocitos y los macrófagos y promueve la quimiotaxis y la proliferación de células endoteliales. Parece ser que este factor tiene un efecto distinto dependiendo de donde es secretado. Cuando se libera a nivel intravascular promueve la coagulación, la hemorragia y la necrosis temporal, sin embargo, cuando es secretado en el exterior del vaso sanguíneo desencadena la migración de células endoteliales y la formación de nuevos capilares (Folkman and Klagsbrun, 1987). Tanto el TNF- α como el TNF- β poseen un efecto sobre la remodelación del colágeno, mediante la estimulación de la producción de colagenasa (Seyer and Ragho, 1992).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El TNF- α y el TNF- β que derivan de los macrófagos, monocitos, mastocitos y linfocito T, activan los macrófagos, estimulan la angiogénesis y la mitosis de los fibroblastos, pero también tienen efectos regulatorios sobre otras citoquinas. Además, juega un papel vital en el remodelado del colágeno mediante el estímulo de la producción de colagenasa (Pavletic M, 2010a).

Efecto sobre otros tejidos

El TNF- α juega un papel importante en el campo de la traumatología, ya que estimula la reabsorción ósea y la replicación de células del hueso. Las células que se replican son capaces de sintetizar colágeno, lo que indica que el TNF- α afecta a las células del linaje osteoblástico (Canalis et al., 1988).

Factor de Crecimiento Estimulador de Colonias (CSF)

Son glicoproteínas específicas responsables de la diferenciación de células hematopoyéticas, de células madre a células progenitoras y por último, también son responsables de la maduración de los granulocitos, monocitos, macrófagos y linfocitos. Adicionalmente, modulan el efecto de las células inflamatorias y, por lo tanto, van a jugar un papel importante en el proceso de reparación cutánea. Se han identificado cuatro tipos de CSF, factor de crecimiento estimulador de granulocitos, factor de crecimiento estimulador de macrófagos, factor de crecimiento estimulador de macrófagos-granulocitos y factor de crecimiento estimulador de colonias multilínea (Metcalf, 1985).

Los monocitos sintetizan el CSF de granulocitos, de macrófagos y granulocitos, pudiendo llevar a cabo una función autocrina o paracrina. El CSF de granulocitos induce la proliferación de células madre y la diferenciación de células madre en neutrófilos. El CSF de monocitos tiene funciones similares, pero además, incrementa la producción de macrófagos, prostaglandina E (PGE), interleuquina 1 (IL-1) y TNF. El CSF de granulocitos-macrófagos promueve la formación de neutrófilos, eosinófilos y progenitores de eritrocitos (Metcalf, 1985).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El CSF de granulocitos (CSF-G) promueve la fase inflamatoria, induce la diferenciación y la síntesis de neutrófilos desde la médula ósea, promueve la función de los neutrófilos y los macrófagos y la proliferación de los queratinocitos. CSF-G recombinante humano inyectado de forma subcutánea ha demostrado estimular la cicatrización de heridas infectadas en pacientes diabéticos con úlceras en los pies. Además CSF de granulocitos y macrófagos (CSF-GM) secretado por los queratinocitos poco después de la lesión, estimula la proliferación de células epidermales de forma autocrina. El uso tópico de CSF-GM recombinante humano es efectivo en el tratamiento de úlceras venosas en piernas, ya que estimula la proliferación de células epidérmicas (Enoch et al., 2006b).

Efecto sobre otros tejidos

Son diversas sus aplicaciones clínicas en el ámbito de la medicina. Se utiliza para el tratamiento y prevención de la toxicidad hematológica de la quimioterapia. Tanto el factor de colonias estimulador de colonias de granulocitos como el de macrófagos actúan directamente sobre los progenitores hematopoyéticos estimulando la síntesis de células polimorfonucleares, monocitos y eosinófilos (Balaguer and Berrocal, 1999).

Factor de Crecimiento Nervioso (NGF)

Pertenece a la familia de las neurotrofinas y destaca por su capacidad para regular el crecimiento y la diferenciación del tejido nervioso durante el desarrollo embrionario (Nico et al., 2008). Este factor de crecimiento está formado por tres subunidades (alpha, beta y gamma), encontrando la bioactividad del NGF en la subunidad beta (Nimni, 1997).

Además de ejercer sus efectos sobre las células nerviosas, el NGF también posee efectos sobre otros tipos celulares, como las células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) o fibroblastos y células endoteliales, todas éstas células son importantes en el proceso de reparación tisular (Kawamoto and Matsuda, 2004). Estimula la migración y la proliferación de las

células endoteliales, remodela la matriz extracelular y promueve la maduración de los vasos neoformados, con lo que juega un papel crucial en el proceso de angiogénesis (Nico et al., 2008).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

El NGF en la piel es sintetizado por diversas células como los fibroblastos, los queratinocitos y los mastocitos. El uso tópico de NGF sobre heridas acelera la cicatrización, tanto en animales diabéticos como en animales sanos. Esta aceleración se consigue mediante la modulación de las fases de la inflamación, de migración, reepitelización, granulación, angiogénesis y remodelación tisular (Kawamoto and Matsuda, 2004).

Efecto sobre otros tejidos

En el cartílago, el NGF aumenta la síntesis de glucosaminoglicanos. Respecto a su efecto en hueso, en un estudio experimental se demostró que existía un incremento de dicho factor durante el proceso de cicatrización ósea tras fracturas de hueso (Kawamura and Urist, 1988).

Factor de Crecimiento Hepatocítico (HGF)

El HGF es secretado por diversas células mesenquimales y se conoce por su capacidad de regular el crecimiento celular, la motilidad y la morfogénesis en diversos tipos celulares, incluyendo las células epiteliales y endoteliales, con lo que contribuye de forma activa en la reparación epitelial y en la neovascularización (Matsumoto and Nakamura, 1997; Conway et al., 2006).

Este péptido posee un intenso efecto angiogénico ya que incrementa la expresión de VEGF. Tanto el HGF como el VEGF muestran una acción sinérgica sobre las células endoteliales, se trata de una respuesta más acentuada que con cualquiera de los dos factores de crecimiento por separado (Anitua et al., 2005).

Efecto sobre la cicatrización cutánea

Existen pocos estudios in vivo sobre la aplicación de HGF en piel. Un estudio experimental en ratas demostró que cuando se neutralizaba el efecto del HGF en heridas de espesor completo, la cantidad de capilares y la expansión del tejido de granulación decrecía, produciendo un retraso de la cicatrización de dichas heridas (Yoshida et al., 2003), con lo que se puede concluir que el HGF es un factor clave para la cicatrización de heridas ya que promueve la neovascularización, la formación de tejido de granulación y la reepitelización.

Efecto sobre otros tejidos

El HGF es un factor de crecimiento que demuestra capacidad y habilidad para promover la reparación del tejido y la regeneración de varios órganos tras un daño, por tanto posee un potencial clínico importante para el tratamiento de varias enfermedades (Madonna et al., 2012).

La tabla 8 muestra los tipos de factores de crecimiento que encontramos en cada una de las fases del proceso de cicatrización cutánea.

Tabla 8. Intervención de los distintos factores de crecimiento en función de la fase del proceso de cicatrización cutánea.

Fase	Factor de Crecimiento
Fase Inflamatoria	G-CSF, TGF-B1, TGF-B2
Fase de Proliferación	PDGF, FGF, VEGF
Epitelización	EGF, KGF, GM-CSF
Fase de Remodelación	TGF-B3

PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas), *TGF-B* (Factor de crecimiento transformante B), *EGF* (Factor de crecimiento epidérmico), *FGF* (Factor de crecimiento fibroblástico), *KGF* (Factor de crecimiento queratinocítico), *IGF-1* (Factor de crecimiento insulínico tipo 1), *CTGF* (Factor de crecimiento de tejido conectivo), *VEGF* (Factor de crecimiento del endotelio vascular), *TNF* (Factor de necrosis tumoral), *CSF* (Factor de crecimiento estimulador de colonias), *NGF* (Factor de crecimiento nervioso), *HGF* (Factor de Crecimiento Hepatocítico).

Posibles riesgos asociados al uso de factores de crecimiento

Se ha demostrado que el uso de los factores de crecimiento recombinantes en heridas crónicas los somete a una degradación enzimática rápida. Los factores de crecimiento que son aplicados de forma exógena sobre las heridas presentan una baja biodisponibilidad y bioactividad porque normalmente las heridas son bastante grandes y penetran lentamente al tejido adyacente. Son necesarias administraciones repetidas de concentraciones elevadas no fisiológicas para promover la cicatrización, sin embargo, una concentración excesiva de factores de crecimiento puede dar lugar a una toxicidad local, generando diversos efectos adversos (Andree et al., 1994; Chen et al., 2010; Bodnar, 2013), llegando a incluso incrementar el riesgo de cáncer (Vasquez et al., 2004).

Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) – Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

Introducción

El Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una fuente autóloga de diversos factores de crecimiento y sustancias, sobretodo del PDGF y del TGF-B. También se puede definir como el volumen de plasma autólogo que queda de la concentración de plaquetas, por encima de la fase blanca (Grageda, 2004). La concentración de plaquetas en el PRP es generalmente de dos a cuatro veces superior a la concentración de plaquetas en plasma normal (Fortier and Smith, 2008). Las plaquetas contenidas en esta fracción de plasma pueden ser activadas artificialmente para que liberen el contenido interior de sus gránulos, dónde se encuentran diversos factores de crecimiento. El PRP contiene un pH que oscila entre 6,5 y 6,7 (Marx et al., 1998; Anitua, 1999).

A principios de los años 90, comenzaron a desarrollarse los preparados plasmáticos enriquecidos en plaquetas, aplicándose por primera vez en cirugías cardíacas (Ferrari et al., 1987), seguido de su uso en cirugía bucal (Whitman et al., 1997). Desde entonces, se comenzó a

emplear en diversos campos, como las úlceras cutáneas, cirugía plástica, neurocirugía, cirugía vascular, oftalmología, cirugía maxilofacial y traumatología, entre otras disciplinas (Floryan and Berghoff, 2004; Sampson et al., 2008).

Además de los factores de crecimiento, el PRP contiene proteínas en suspensión que juegan un papel importante en el proceso de reparación/regeneración tisular, entre las que destacan el fibrinógeno, la fibronectina y la vitronectina, las cuales ayudan a la adhesión de células y de otras moléculas útiles para la conducción celular (Okuda et al., 2003; Kawase et al., 2005).

Nomenclatura de PRP vs PRGF

En los últimos años ha surgido una enorme controversia con respecto a la nomenclatura y definición del PRP (Marx, 2001; Everts et al., 2008; Anitua et al., 2009). De acuerdo con Anitua y colaboradores (2008), el término “Plasma Rico en Plaquetas” es un término vago y poco preciso (Anitua et al., 2008). Dentro de éste término se engloban un gran número de preparados sanguíneos autólogos que difieren en el protocolo de procesado y preparado y, por tanto, en las características cuantitativas y cualitativas del preparado y procesado del PRP (concentración plaquetaria, tipo de anticoagulante empleado, número de centrifugaciones y velocidad de las mismas, tipo de activador plaquetario empleado, presencia o ausencia de leucocitos) (Anitua et al., 2009).

El término Plasma Rico en Factores de crecimiento o en inglés, Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), fué acuñado por Anitua y sus colaboradores en 2007, y hace referencia a un producto completamente autólogo y biocompatible, elaborado a partir de la sangre del paciente tras una única centrifugación y mediante el empleo de citrato sódico como anticoagulante y cloruro cálcico como activador plaquetario. El PRGF es un tipo de PRP que presenta una concentración moderada de plaquetas (de 2 a 3 veces por encima de niveles basales), y se caracteriza por no contener células de la serie blanca ni eritrocitos (Anitua et al., 2007).

El PRGF System[®], se comercializa por BTI system, es un medicamento que está autorizado para su uso en Europa y su aplicación en diversas especialidades médicas cumpliendo con la misma. En USA se comercializa con la denominación ENDORET, la tecnología PRGF[®]-Endoret[®] es pionera en el desarrollo de protocolos específicos para la regeneración tisular y la primera técnica 100% autóloga del mercado. Dicha técnica posee las siguientes ventajas, el PRGF obtenido es un producto con propiedades bacteriostáticas, no posee leucocitos y por lo tanto evita su actividad proinflamatoria, se trata de un producto biocompatible, versátil y seguro, no presenta efectos secundarios lo cual le permite ser aplicado en una gran variedad de disciplinas y posee un gran

potencial terapéutico en la regeneración tisular, además tan solo se centrifuga en una ocasión durante 8 minutos (Anitua et al., 2007).

A nivel comercial también encontramos otros sistemas para la obtención de PRP, entre los que podemos destacar los citados en la tabla 9 (Mishra and Pavelko, 2006; Sanchez et al., 2009):

Tabla 9: Sistemas comerciales alternativos para la obtención de PRP.

Sistema	Comentarios
Autologous Conditioned plasma-Arthrex [®]	9cc de sangre venosa 1500 rpm durante 5min Aplicación 2-3 cc de plasma
Fibrinet Cascade [®] -Biotec	Formación de una Matriz de Fibrina Rica en Plaquetas (PRFM) autóloga
GPS [®] III system-Biomet	Sistema de émbolos dentro de un cilindro 3200 rpm durante 15min Contiene el 90% plaquetas disponibles
SmartPRep [®] -Harvest Technologies	Doble centrifugación con decantación automática (2400 rpm, 15min) Obtención de 45 a 60 ml sangre, 5-6 ml de PRP

Rpm: Revoluciones por minuto. Min: minutos.

El papel de las plaquetas en el proceso de reparación/cicatrización

Introducción y fisiología plaquetaria

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos sanguíneos que derivan de megacariocitos en la médula ósea y contienen diferentes tipos de factores de crecimiento y citoquinas que estimulan la cicatrización cutánea (Sandoval et al., 2013). Posee forma discoidea y no tiene núcleo. Su función principal es ayudar a mantener la integridad vascular, modular la respuesta inflamatoria y potenciar la curación de heridas tras una lesión tisular (Sink and Feldman, 2009).

Tienen un diámetro de 2 a 4 μm , están presentes en el plasma sanguíneo y su concentración normal en sangre oscila entre 150.000 y 300.000 unidades por microlitro (Anitua and Andia, 2000; Marx and Garg, 2005). La vida media útil de las plaquetas en humana es de 8 a 12 días, una vez pasado este tiempo, son eliminadas por el sistema de macrófagos tisulares (Guyton and Hall, 2001).

Son responsables de la activación del proceso inflamatorio mediante la liberación de citoquinas, tal y como la interleuquina 1α (IL-1), 1β y -6 y el TNF- α , también estimulan la producción de colágeno (mediante la liberación de FGF-2, IGF-1 y TGF- β), promueven la transformación de fibroblastos en miofibroblastos (TGF- β), inician la angiogénesis (EGF-2, VEGF-A, TGF-B), y finalmente promueven la epitelización (EGF, FGF-2, IGF-1, TGF- β) (Bennett and Schultz, 1993b; Werner and Grose, 2003; Li et al., 2007).

Adicionalmente a las cualidades hemostáticas, las plaquetas también poseen una importante actividad pro-inflamatoria, reguladora y regenerativa ya que es capaz de interactuar con otros tipos celulares como pueden ser las células endoteliales o los neutrófilos, y mediante la liberación de factores de crecimiento y citoquinas (Hartwig and Italiano, 2003; Anitua et al., 2004).

Ontogenia plaquetaria

Los megacariocitos son las células precursoras de las plaquetas, y representan entre un 0,1 y un 0,5% de las células nucleadas en la médula ósea. Dichos megacariocitos emiten unas prolongaciones citoplasmáticas, a las cuales denominamos proplaquetas, que están en contacto con la sangre y que son liberadas por el megacariocito al torrente sanguíneo formando las plaquetas (Hartwig and Italiano, 2003).

Concentración de plaquetas

Si comparamos un coágulo de sangre normal con uno de PRP, podemos ser capaces de entender las diferencias vitales que existen entre ambos y de aquí su importancia en el proceso de cicatrización tisular. Un coágulo de sangre normal contiene 93% de células rojas, 6% de plaquetas y en algunos casos menos de un 1% de células blancas. Sin embargo, un coágulo de PRP contiene un 94% de plaquetas, sólo un 5% de células rojas y un 1% de células blancas (Anitua, 2001; Marx, 2004; Sampson et al., 2008).

En el PRP existe una concentración de aproximada de 1 millón de plaquetas/ μ l o de 4 a 7 veces sobre su concentración habitual (Marx et al., 1998; Marx, 2001; Marx and Garg, 2005). Con referencia a la concentración de FC en PRP, son superiores a las del plasma normal entre 5 y 25 veces, aunque es importante tener en cuenta que no siempre una mayor concentración y mayor número de FC van a suponer un mayor efecto (Weibrich et al., 2002; Kevy and Jacobson, 2004).

Membrana y citoplasma plaquetario

La membrana plaquetaria está compuesta por el glicocáliz, la capa fosfolipídica y la capa submembranosa, siendo la más externa el glicocáliz, que actúa en la activación y adhesión de las plaquetas. En la zona intermedia encontramos la bicapa fosfolipídica con propiedades anticoagulantes principalmente, y en la capa más interna la submembranosa que sería la que conforma el citoesqueleto de la plaqueta (Tablin, 2000). En el citoplasma de las plaquetas encontramos exactamente las mismas proteínas que existen en los megacariocitos, los gránulos

plaquetarios y las mitocondrias que se sostienen en una estructura de filamentos de actina (Hartwig and Italiano, 2003).

Gránulos plaquetarios

Dentro del citoplasma de las plaquetas podemos distinguir claramente entre tres tipos de gránulos plaquetarios, encontramos los gránulos alfa, los gránulos densos y los gránulos lisosomales. Todos ellos son liberados al medio extracelular tras la activación plaquetaria, presentando cada uno de ellos una función y estructura distinta (Rendu and B., 2001; Hartwig and Italiano, 2003; Anitua et al., 2004).

Gránulos alfa (α)

Los gránulos alfa presentan una estructura y composición muy heterogénea, la forma externa de dichos gránulos es esférica/ovoide y miden aproximadamente entre 200-400 nm de diámetro, además de representar el 15% del total de éstas células (Harrison and Cramer, 1993). En el interior de los gránulos alfa encontramos una gran variedad de sustancias que llevan a cabo importantes funciones en el organismo.

Estas sustancias liberadas por los gránulos alfa de las plaquetas se clasifican en función de su funcionalidad (Tabla 10). Las proteínas adhesivas intervienen en las fases iniciales del crecimiento del trombo sanguíneo durante la fase de hemostasia. La fibronectina y la vitronectina participan en la reparación de las heridas (Lariviere et al., 2003). Las plaquetas son una fuente rica en citoquinas, las cuales llevan a cabo un fuerte efecto quimiotáctico sobre los leucocitos. También encontramos determinados factores de coagulación, sustancias fibrinolíticas y proteolíticas. Tanto las sustancias fibrinolíticas como las proteolíticas desempeñan un papel crucial en los procesos de remodelación vascular y angiogénesis (Reed, 2007).

Dichos gránulos también contienen sustancias como el condroitín sulfato, la albúmina, las inmunoglobulinas y las trombocidinas, las cuales poseen efectos fungicidas y bactericidas (Anitua et al., 2004). Por último encontraremos diversos factores de crecimiento dentro de los gránulos alfa como hemos detallado en la tabla 10. Estos juegan un papel crucial en el proceso de reparación tisular (Marx, 2004; Reed, 2007).

Tabla 10: Clasificación del contenido de los gránulos alfa de las plaquetas (García and Coma 2000).

Contenido Gránulos	Factores
Proteasas y antiproteasas	Inhibidor plaquetario del factor IX, antitripsina A1...
Sustancias fibrinolíticas	Plasminógeno, macroglobulina-A2, osteonectina, glicoproteína rica en histidina...
Factores de coagulación	Factor de von willebrand, gactor XI, multimerina...
Citoquinas	Tromboglobulina-B, entre otras
Proteínas de adhesión	Fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondina-1, factor de von willebrand
Factores de crecimiento	PDGF, TGF-B, VEGF, BFGF, EGF, IGF-1, HGF, NGF
Otras sustancias	Condroitín-sulfato, albúmina, trombocidinas...

PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas), *TGF-B* (Factor de crecimiento transformante B), *EGF* (Factor de crecimiento epidérmico), *IGF-1* (Factor de crecimiento insulínico tipo 1), *VEGF* (Factor de crecimiento del endotelio vascular), *NGF* (Factor de crecimiento nervioso), *HGF* (Factor de Crecimiento Hepatocítico).

Gránulos densos

Los gránulos densos son los más pequeños que encontramos dentro de las plaquetas, pero a su vez son los que más densidad electrónica poseen. Presentan un elevado contenido en calcio, el cual representa el 50% del total y en fósforo (García and Coma, 2000).

Estos gránulos se forman en los megacariocitos, y son sacos en los que se van depositando sustancias como: el adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), calcio, magnesio, serotonina (5HT), epinefrina, norepinefrina y dopamina (Anitua et al., 2004). El calcio es necesario para la agregación plaquetaria y para la formación de fibrina. Además, es un regulador central potencial en la cicatrización de las heridas. La histamina puede desencadenar tanto un efecto antiinflamatorio como proinflamatorio y la serotonina provoca vasoconstricción e incremento de la permeabilidad capilar (Lansdown, 2002).

Gránulos lisosomales

Los gránulos lisosomales poseen un tamaño intermedio entre los dos tipos anteriores de gránulos, miden entre 175-250 nm de diámetro. En su interior encontramos proteasas, hidrolasas, glucosidasas, y proteínas catiónicas con actividad bactericida (Rendu and B., 2001).

Respuesta de las plaquetas ante el daño tisular

Ante el desgarro de un vaso sanguíneo se producen una serie de cambios morfológicos y estructurales en las plaquetas que dan lugar a la formación de un tapón hemostático y la retracción del coágulo (Tablin, 2000). Se forma una agregación plaquetaria en el lugar del daño vascular, donde el fibrinógeno junto con el factor de von willebrand producidos por las propias plaquetas, mantienen el tapón plaquetario unido (Anitua et al., 2004).

Tras la activación plaquetaria se lleva a cabo la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios mediante un proceso de exocitosis. Para que la activación plaquetaria se lleve a cabo, un agonista como la trombina, ADP, colágeno, o tromboxano debe unirse a ciertos receptores glicoproteicos de la membrana plaquetaria, dando lugar a una señal de transducción que pone en marcha el proceso de activación. A continuación tiene lugar la reacción de liberación, proceso en el cual el calcio es liberado al citoplasma, provocando el movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática, cuando ésta entra en contacto con la membrana del gránulo, se fusionan ambas y se produce el vaciado del contenido de los gránulos al espacio extracelular (Reed, 2007).

La liberación del contenido de los gránulos plaquetarios se produce en el siguiente orden: en primer lugar se libera el contenido de los gránulos alfa, seguido por la liberación del contenido de los gránulos densos y por último se liberan las sustancias proteolíticas que se albergan en el interior de los gránulos lisosomales (Tablin, 2000).

Procedimiento para la obtención de preparados ricos en plaquetas

En el año 1997 se describe el primer uso de un concentrado autólogo de plaquetas para la inducción del proceso de cicatrización tisular (Whitman et al., 1997). Estudios posteriores y siguiendo esa misma tendencia, emplearon pegamento de fibrina autólogo para reconstrucciones maxilofaciales, y se descubrió que esta red de fibrina además de poseer propiedades osteoinductoras, contenían una gran variedad de factores de crecimiento, los cuales podían suponer una herramienta interesante terapéutica para promover los procesos de cicatrización (Anitua, 1999).

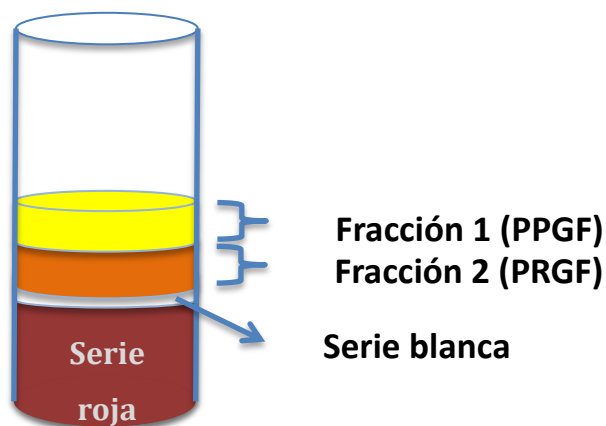
La obtención de PRP se debe de realizar ante condiciones de máxima asepsia produciendo el mínimo traumatismo al paciente para la obtención de una muestra de sangre que oscila entre los 10 y los 60ml en función de la extensión del daño, de ésta forma deberíamos de obtener un producto autólogo, completamente estéril y no contaminado (Anitua and Andia, 2000; Marx, 2004).

Independientemente de la forma que sea obtenido el PRP, debe contener una concentración aproximada de 1.000.000 plaquetas/ μ l, teniendo en cuenta que la sangre entera contiene aproximadamente 200.000 \pm 75.000 plaquetas/ μ l. Existe una diversidad de opiniones con respecto a lo que se entiende por PRP, algunos autores afirman que el PRP terapéutico es el que tiene un promedio de aproximadamente un 400% de aumento en el conteo plaquetario con respecto a la sangre entera (Marx, 2004), mientras otros consideran que el PRGF es aquel que

posee una concentración de plaquetas 1,5 veces la concentración en sangre entera (Anitua et al., 2004).

Una vez se obtiene la muestra sanguínea, se introduce en tubos de ensayo que contienen citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, para captar los iones calcio que se encuentran en la sangre y neutralizarlos formando quelato, evitando así la coagulación sanguínea. La proporción de anticoagulante y sangre sería 1 ml de anticoagulante por cada 5 ml de sangre (Anitua and Andia, 2000; Marx, 2001; Marx and Garg, 2005). A continuación se procede a la centrifugación de las muestras, para obtener varias fases bien diferenciadas. La serie roja se queda en el fondo del tubo, y la amarilla se divide a su vez en dos fracciones, la fracción 1 (superior) corresponde al Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PPGF), y la fracción 2 (inferior) corresponde al Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF), ésta última fase la encontramos justo por encima de la serie blanca, y se trata de la fracción con un elevado contenido en plaquetas (Anitua et al., 2007). Dichas fracciones se muestran en la figura 3.

Figura 3: Fracciones tras la centrifugación de plaquetas (PPGF: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento, PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento).



Por último, se procesa a llevar a cabo el pipeteado del PRGF, que se coloca en un tubo estéril hasta su activación. No es aconsejable almacenar este concentrado durante más de 8 horas, ya que su viabilidad no se ha probado en horarios extendidos a este tiempo y la congelación puede lesionar o romper las membranas de las plaquetas (Marx and Garg, 2005).

Existen diferentes métodos para obtener concentrados plasmáticos de plaquetas. Estos se pueden dividir en métodos manuales, en los que procedemos nosotros mismos al pipeteado para la extracción de éstas fracciones, y por otro lado encontramos los kits semiautomáticos

comerciales, los cuales consiguen el concentrado de forma automática y por lo tanto mediante menos manipulación.

Métodos manuales

Sistemas de centrifugación simple

Son aquellos sistemas que tan solo emplean una centrifugación para la obtención del PRP. Entre ellos cabe destacar la importancia del PRGF System[®] por su uso en la presente tesis doctoral.

PRGF System[®] (BTI Biotechnology Institute, Vitoria, Spain)

Anitua descubrió un método sencillo para la preparación de PRGF. Utilizaba de 10 a 20 ml de sangre del propio paciente en tubos de 5ml con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante y en condiciones estériles. A continuación, se centrifugan los tubos a 460G durante 8 minutos. Tras la centrifugación se obtenían tres fases: los eritrocitos se quedan en el fondo del tubo, el PRGF en la fase intermedia y el PPGF queda por encima del PRGF. Seguidamente de cada tubo se elimina un mililitro de la fracción más superficial. El resto del plasma, evitando los glóbulos rojos y el "Buffy coat" se pipetea, y corresponde al PRGF. Esta última fracción pipeteada se activa mediante la adición de cloruro cálcico al 10% justo antes de su inoculación (Anitua, 1999).

El mismo Anitua describió un método más refinado para la obtención de PRGF a partir de una pequeña muestra de sangre del paciente. Se trata de un proceso rápido (20-25 minutos), sencillo y con nulo efecto antigénico y nula presencia de leucocitos. El PRGF System[®] se compone de: una centrífuga de laboratorio con rotor oscilante, tubos de vidrio para la extracción sanguínea de 5ml que contengan 0,5 ml de citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, y los cuales son llenados con 4,5 ml de sangre, otros tubos de extracción sanguínea de 5ml pero sin anticoagulante, pipetas de 100-1000ul y de 20-200ul, y puntas desechables de pipeta con filtro de 100ul y de 500ul. Para conseguir el PRGF, se obtienen cuatro tubos de sangre de 5ml con citrato sódico del paciente, se centrifugan los mismos a 460G durante 8 minutos, a continuación se obtienen separadas las distintas fases del plasma y se procede al pipeteado en una cámara de flujo laminar para evitar cualquier contaminación bacteriana. Se procede a destapar el tubo con cuidado y se desecha 1ml del plasma más superficial. Los 50ul situados por encima de la capa leucocitaria corresponden al PRGF. El PRGF debe ser aspirado con precisión y es transferido a los tubos de cristal sin anticoagulante (Anitua, 1999).

Como ya se ha comentado con anterioridad, el PRGF System® es un sistema autorizado para la obtención de PRGF en Europa, certificado por las autoridades sanitarias europeas y para su aplicación en diferentes disciplinas médicas y veterinarias.

Sistemas de centrifugación doble

Son aquellos sistemas que para la obtención de preparados plasmáticos ricos en plaquetas emplean dos centrifugaciones en su proceso de preparado.

Método de Landesberg

Se basa en someter a la sangre a una doble centrifugación, obteniéndose de esta manera una concentración plaquetaria entre 550.000 y 900.000 plaquetas/ μ l. Fué descrita por Landesberg y colaboradores en el año 2000, y consistía en la extracción de sangre del paciente en tubos de 5ml con citrato sódico como anticoagulante. A continuación, esta sangre se somete a dos centrifugaciones, la primera se lleva a cabo a 200G durante 10 minutos, tras la cual se recoge el plasma sobrenadante y se almacena en un tubo sin anticoagulante, y la segunda centrifugación también se somete a 200G durante 10 minutos, al final de esta segunda centrifugación podremos observar en el fondo del tubo un sedimento plaquetario, que tras ser resuspendido en un volumen determinado de plasma residual, constituirá el PRP (Landesberg et al., 2000).

Método Curasan PRP® (Fa.Cubasan, Kleinostheim, Germany)

Se emplean unos tubos comerciales de 8,5 ml para la extracción de sangre con nombre Monovette (Sarstedt®), los cuales contienen citrato sódico como anticoagulante. Se centrifuga la sangre a 2400 rpm durante 10 minutos, lo que fracciona la sangre en plasma, capa leucocitaria y eritrocitos. A continuación se traslada el plasma sobrenadante a otro tubo, y este mismo se vuelve a centrifugar a 3600 rpm durante 15 minutos con el objetivo de generar un sedimento con plaquetas, el sobrenadante de ésta segunda centrifugación (PPGF) se extrae hasta dejar unos 0,5ml, y este mismo se emplea para resuspender el sedimento de plaquetas que corresponderá al PRP. Con el presente protocolo conseguimos una concentración plaquetaria que se encuentra entre 1.000.000 y 2.500.000/ μ l, y concentración de leucocitos de 14.800 hasta 33.100/ μ l (Weibrich and Kleis, 2002; Weibrich et al., 2002).

Friadent-Schutze PRP® (Friadent-Schutze, Vienna, Austria)

Para la obtención de sangre con este método, se emplean tubos de ensayo de vidrio de 8,5ml con la cara interna siliconada y se someten a una centrifugación a 2400rpm durante 10 minutos, a continuación se extrae el plasma mediante el uso de una cánula Monovette y se somete a una segunda centrifugación a 3600rpm durante 15 minutos, para agrupar una elevada concentración

de plaquetas en el sedimento de los dos tubos, se extrae el plasma sobrenadante (PPGF) y el volumen residual de aproximadamente 0,8ml se emplea para resuspender el sedimento plaquetario y obtener el PRP. Con dicho sistema se logra una concentración plaquetaria de 1.440.000 plaquetas/ μ L y una concentración leucocitaria de aproximadamente 21.700/ μ L (Weibrich et al., 2003).

Métodos semiautomáticos comerciales

Tras la publicación por parte de Anitua su método manual para la obtención de PRGF, han ido apareciendo distintos métodos semiautomáticos para acelerar el proceso, facilitando la obtención del concentrado plaquetario y minimizando los riesgos de contaminación bacteriana del producto (Vasconcelos et al., 2003).

Platelet Concentrate Collection System (PCCS[®] Kit) (3i-Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL, USA)

El proceso completo dura unos 30 minutos y permite una concentración plaquetaria de entre 1.100.000 y 2.200.000/ μ L, con una eficiencia de extracción plaquetaria que ronda el 50% y una concentración leucocitaria de entre 5.500 y 14.800/ μ L. El presente sistema se realiza mediante la extracción de 60 ml de sangre entera con anticoagulante (ACD-A9), la cual se somete a dos centrifugaciones. Se centrifuga una primera vez durante 3 minutos y 45 segundos a 3.000 rpm, y a continuación, tiene lugar una segunda centrifugación durante 13 minutos a 3.000 rpm, con el objetivo de sedimentar las plaquetas (Appel et al., 2002; Weibrich and Kleis, 2002).

Gravitational Platelet Separation (GPS[®] System) (Biomet Merck Biomaterials, Darmstadt, Germany)

Para este método se utiliza una jeringa de 60 mL, en la cual 6 mL son anticoagulante (ACD-A) y 54 mL de sangre del paciente. La sangre con el anticoagulante se vierte en los tubos GPS[®], que son centrifugados a 3.200 rpm durante 12 minutos. Se alcanza una concentración plaquetaria aproximada de 1.600.000/ μ L y unos niveles leucocitarios de 31.100/ μ L (Eppley et al., 2004; Marlovits et al., 2004).

Smart PReP[®] System (Harvest Technologies Corporation, Munich, Germany)

La cantidad de sangre que se necesita con este protocolo va a depender del sexo, en mujeres se extrae 52 mL de sangre, y en hombres 48ml, se realiza una doble centrifugación de la sangre durante 12 minutos, obteniendo un PRP con una concentración plaquetaria cercana a 1.250.000/ μ L y una concentración leucocitaria de 19.261/ μ L (Weibrich et al., 2003).

Plateltex® (Plateltex, Bratislava, Slovakia)

La concentración plaquetaria que se obtiene con este método es de 1.600.000/ μ L aproximadamente y se lleva a cabo mediante una doble centrifugación. La sangre se obtiene en tubos de ensayo de 8.0 mL, que contienen ACD-A como anticoagulante, y se somete a una primera centrifugación suave a 180 G durante 10 minutos. Tras aspirar el plasma sobrenadante, se procede a un segundo centrifugado, a 1000 G durante 10 minutos (Mazzucco et al., 2008).

Arthrex ACP® System (Arthrex Bio Systems, Autologous Conditioned Plasma (ACP), Naples, FL, USA)

Se realiza una única centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos de la sangre, el PRP autólogo que se obtiene mediante este método se denomina “plasma autólogo acondicionado” (ACP). El ACP que se obtiene posee una concentración plaquetaria de aproximadamente 550.000/ μ L sin la presencia de leucocitos (<http://secure.cdn.arthrex.com>, 2012).

Obtención de PRP por aféresis

Mediante este método se necesitan 450 ml de sangre del propio paciente, que se recolecta en una bolsa que contiene citrato-fosfato-dextrosa como anticoagulante. Un aparato de aféresis centrifuga la sangre a 5.600 rpm separándola en sus tres componentes básicos, situándose por densidad los eritrocitos en el nivel más bajo, en un nivel intermedio la capa leucocitaria y la más superficial la ocuparían los PPGF. Una vez retirados los PPGF se vuelven a centrifugar los otros dos componentes a 2,400 rpm, obteniendo un volumen de plasma donde se concentra la capa leucocitaria y las plaquetas, considerada como PRP. Las plaquetas se activan mediante la adición de cloruro cálcico al 10% y trombina bovina. Con este método el recuento plaquetario del plasma obtenido es de aproximadamente 750.000/ μ L (Whitman et al., 1997).

La tabla 11 muestra de forma esquemática diversos métodos empleados para la obtención de PRP y sus características.

Tabla 11: Metodología para la obtención de PRP, y características básicas de cada uno de ellos.

MÉTODO	PLAQUETAS ($\times 10^3$ /mL)	LEUCOCITOS ($\times 10^3$ /mL)	VOLUMEN SANGRE (mL)
AFÉRESIS	750 - 1500	0.16 – 0.18	> 450
PRGF - ENDORET [®]	500	≈ 0	10 – 20
LANDESBURG	550 - 900	N/D	5
PCSS [®]	1100-2200	5.5 – 14.8	54
CURASAN PRP [®]	1000 -2500	14.8 – 33.1	8.5
GPS [®] SYSTEM	1600	31.1	54
SMART PREP [®] SYSTEM	1250	19.2	52
FRIADENT-SCHÜTZE PRP [®]	1440	21.7	8.5
PLATELTEX [®]	1600	N/D	N/D
SECQUIRE PRP [®] SYSTEM	N/D	N/D	N/D
ARTHREX ACP [®]	550	≈ 0	9
VIVOSTAT [®]	N/D	N/D	120
FIBRINET [®]	346	N/D	8
REGEN PRP [®]	430	N/D	10

(N/D: No determinado, ML: Mililitro)

Aplicaciones del PRP-PRGF en piel

La regeneración de heridas cutáneas normalmente comienza con la formación de un coágulo y la degranulación de las plaquetas, lo que da lugar a liberación de diversas citoquinas y factores de coagulación. Estos factores ejercen un efecto modulador importante sobre la respuesta inflamatoria. Hasta el momento se han detectado en el interior de las plaquetas más de 30 citoquinas diferentes, entre ellas numerosos factores de crecimiento como el PDGF, TGF, VEGF, EGF e IGF y han demostrado estimular la migración, proliferación celular y la angiogénesis en procesos de cicatrización cutánea (Weibric et al., 2002).

Los factores de crecimiento PDGF, TGF- β , VEGF y EGF se encuentran en concentraciones de 3 a 7 veces superiores en los PRP autólogos (Eppley et al., 2004). Además, los concentrados de plaquetas contienen potentes factores de crecimiento mitogénicos y quimiotácticos, que regulan las fases clave que tienen lugar durante el proceso de cicatrización cutánea (Seppa et al., 1982).

El PRP se ha empleado en piel desde 1985 (Driver et al., 2006) y desde entonces hasta este momento se han publicado numerosos estudios experimentales y clínicos que emplean el PRP como terapia en heridas cutáneas. Con respecto al uso tópico de PRP, se ha publicado recientemente un estudio experimental en conejos, en los que se aplicó gel de PRP de forma tópica en heridas cutáneas de 3 cm espesor completo realizadas quirúrgicamente en la zona dorsolateral del tórax. Tras el tratamiento con PRP se observó una aceleración de la cicatrización de las mismas, además de la formación de un tejido de granulación adecuado comparado con las heridas placebo. En las heridas tratadas con PRP se vió la presencia de un incremento

significativo de fibras de colágeno nuevas y una mayor formación de epitelio en la histopatología. Adicionalmente, se apreció una estimulación del proceso de angiogénesis en los estadios tempranos del proceso de reparación, basándose en un incremento significativo de la densidad vascular (Ostvar et al., 2015). Estos mismos resultados se han observado en otro estudio como el de Lee y colaboradores que observaron un incremento del proceso de epitelización y de la concentración de vasos sanguíneos junto con una regresión del proceso inflamatorio agudo en heridas de espesor completo en piel de conejos tratadas con PRP durante la primera semana postquirúrgica comparada con la segunda semana postquirúrgica. Además de la aceleración del proceso de cicatrización y de la angiogénesis de las heridas tratadas con PRP en la semana uno, también se observó un efecto positivo con respecto a la formación de tejido de granulación y en el volumen de fibroblastos depositados en el lugar de la lesión (Lee et al., 2008).

Cuando el PRP se aplica localmente en heridas crónicas, las plaquetas aceleran el proceso normal de cicatrización de dichas heridas (Knox et al., 2006).

Siguiendo el protocolo descrito por Anitua en el año 1999 para la obtención de PRGF (BTI PRGF System®), Francesco Molina-Miñano y colaboradores en el año 2009 llevaron a cabo un estudio experimental en conejos en los que tras el tratamiento con PRGF de heridas de espesor completo creadas con punch de biopsia muestran una aceleración significativa del proceso de reepitelización, además de una reducción también estadísticamente significativa de la inflamación en la zona comparados con las heridas control a día 7 de estudio, mientras que a día 28 del estudio no se observaron cambios (Molina-Miñano et al., 2009b). Si analizamos los resultados de este estudio junto con el de Lee y colaboradores del 2008, podríamos concluir que se obtienen mejores resultados en los tiempos tempranos de la cicatrización (Lee et al., 2008).

El tratamiento de las heridas en medicina veterinaria ha tenido un importante avance con la aparición de las nuevas terapias regenerativas, como en este caso son el uso del PRP. Hay diversos estudios en caballos sobre el uso de dichas terapias en heridas cutáneas. Los estudios de Carter y colaboradores y De Rossi y colaboradores en caballos muestran resultados positivos tras el tratamiento de heridas quirúrgicas con gel de PRP, promoviendo la diferenciación epitelial y la regeneración del tejido dañado, además de observarse una buena organización de las fibras de colágeno comparada con las heridas control, también observaron un proceso inflamatorio más intenso en las heridas control comparadas con las tratadas con PRP (Carter et al., 2003; DeRossi et al., 2009). En la misma especie se muestra un caso clínico publicado por Lacopetti y colaboradores en el que trata heridas cutáneas grandes mediante la aplicación tópica de PRP autólogo, dando lugar a una mejoría en dicha cicatrización (Lacopetti et al., 2012).

Por otro lado, encontramos numerosos estudios publicados en perros, como por ejemplo el de Kim y colaboradores que estudiaron el efecto curativo del PRP autólogo en lesiones grandes de piel en el que mostraron la efectividad del uso de PRP en heridas con baja vascularización de grandes dimensiones situada en la cola (Kim et al., 2009a).

La cicatrización de heridas por segunda intención tiene lugar cuando los bordes de la herida no se encuentran aproximados, y por otro tipo de factores como pueden ser el poco aporte vascular, el tamaño del defecto, la presencia de infección, enfermedades sistémicas adyacentes como la diabetes, la administración de drogas (corticosteroides) y la malnutrición (Schreml et al., 2010). En un estudio desarrollado en el año 2015, se evaluó el efecto del uso de PRP localmente inyectado de forma perilesional en heridas de espesor completo sometidas a una cicatrización por segunda intención en la zona del dorso de perros. Una de las primeras conclusiones que sacaron del estudio fue que la forma de administración intralesional del PRP ofrece la ventaja de prevenir la pérdida de PRP, principalmente por la absorción por parte de los vendajes. Tras la evaluación macro y microscópica de las heridas se observó un incremento en la perfusión tisular de forma significativa en las heridas tratadas con PRP, lo que favorece la formación de tejido de granulación y en general el proceso de cicatrización por la atracción de nutrientes y oxígeno a la zona de la lesión cutánea. En segundo lugar también se observó una mejor arquitectura de las fibras de colágeno depositadas y una mayor densidad de las mismas lo que es característico de un tejido de granulación maduro con un incremento de la fuerza tensil de la herida (Karayannopoulou et al., 2015).

Tras el daño tisular, las plaquetas activadas además de jugar un papel central en la hemostasis contribuyen de forma significativa en otros procesos de reparación cutánea, como en la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos a la zona de la herida, la fibroplasia, la angiogénesis y la epitelización, mediante la liberación de mediadores pro-inflamatorios, citoquinas y factores de crecimiento por parte de los gránulos alfa de las plaquetas (Lacci and Dardik, 2010). En la especie canina se llevó a cabo un estudio para evaluar la eficacia del PRP sobre la cicatrización de heridas en perros tratados con dexametasona (considerado un factor negativo para la reparación de heridas) en el cual se concluyó que existía una aceleración de las heridas tratadas con PRP (Sardari et al., 2011). El uso de PRP en gel también se ha aplicado en úlceras de decúbito crónicas en perros resultando también en una aceleración en comparación con las úlceras no tratadas (Tambella et al., 2014).

Los colgajos de piel tanto en medicina veterinaria como en medicina humana se emplean para el cierre de heridas agudas y crónicas que resultan de traumatismos o de excisiones tumorales. En perros se utilizan frecuentemente los colgajos del plexo subdérmico (Hunt, 2012). En este

campo, encontramos estudios que evalúan el efecto de los PRP en colgajos cutáneos en la especie canina, el motivo de estos estudios es evitar una de las mayores complicaciones de los colgajos de piel que es la necrosis de los mismos por un déficit de vascularización provocando un aporte vascular inadecuado. Con el objetivo de mejorar la vascularización de estos colgajos Karayannopoulou y colaboradores llevaron a cabo un estudio en beagles a los que les practicaron colgajos de plexo subdérmico en la zona abdominal, tratando algunos de ellos de forma perilesional con infiltración de PRP. Tanto la supervivencia de estos colgajos como la perfusión tisular mejoraron en aquellos colgajos tratados con PRP, histológicamente se observó menos edema y un incremento de la neovascularización en los colgajos tratados.

Son escasos los estudios en perros y gatos sobre el uso de PRP alogénico para el tratamiento de heridas cutáneas y regeneración tisular. Es importante destacar un caso clínico publicado por Tae-ho Chung y colaboradores que describe el uso de PRP alogénico, obtenido de otro perro donante, en el tratamiento de una herida cutánea extensa en la zona lumbo-sacra de un perro de raza toy secundaria a una pancreatitis aguda desencadenada por una coagulación intravascular diseminada. Los resultados obtenidos fueron una mejoría del color y apariencia macroscópica de la herida, regresión temprana del tamaño de la herida y una completa cicatrización de la misma al cabo de 3 semanas (Chung et al., 2015).

Pía López-Jornet y colaboradores realizaron un estudio en conejos en el cual creaban heridas quirúrgicas en la lengua, y concluyeron que la aplicación de PRGF acelera la epitelización y reduce la inflamación, debido a la estimulación angiogénica, epitelización y maduración tisular (Lopez-Jornet et al., 2009).

El PRP heterólogo es otra alternativa válida aunque poco empleada en el tratamiento de heridas cutáneas. En el año 2015 se llevó a cabo un estudio experimental en conejos (Abegao et al., 2015), en el que se realizaban dos heridas cutáneas de espesor completo (sin afección de músculo) en la zona dorsal con punch de biopsia de 8mm, y una de ellas era infiltrada con PRP heterólogo, el cual era obtenido de otra especie animal (perro). Este PRP era administrado a las heridas tratadas en forma de gel, tras la evaluación macro y microscópica de las heridas se evidenció que existía una disminución significativa de la inflamación que se correspondía con una disminución del dolor, una aceleración de la epitelización en aquellas heridas tratadas con PRP y, por último, la ausencia de efectos adversos. En ningún caso se desarrollaron indicios de infección gracias a la actividad antimicrobiana de los PRP y se demostró la eficacia del PRP heterólogo (Mehta and Watson, 2008).

Como ya hemos expuesto, la utilización de PRP en heridas acelera la cicatrización debido a su capacidad de aumentar la angiogénesis, estimulando la síntesis y diferenciación de células precursoras y liberando factores que estimulan la reproducción celular (fibroblastos y células endoteliales) (Bennett and Schultz, 1993b). Se ha demostrado que el tratamiento con PRP en heridas infectadas tras cirugía maxilofacial y cirugía vascular, favorece y acelera la curación de dichas heridas, a pesar de existir implantes exógenos bajo las mismas (Whitman et al., 1997).

En medicina humana, el PRP se ha empleado como terapia médica en numerosas patologías y lesiones, incluyendo las heridas cutáneas (Borena et al., 2015). El uso de PRP en este ámbito recibe especial importancia debido a su uso en el tratamiento de lesiones deportivas en atletas profesionales (Hall et al., 2009). Un estudio de Man y colaboradores demostró una mejoría cuantitativa del proceso de cicatrización cutánea en colgajos de piel en personas tras la aplicación tópica de PRP autólogo (Man et al., 2001). En estudios realizados en pacientes humanos con heridas crónicas de diferentes etiologías tratados con PRP en gel también mostraron una mejora en el proceso de cicatrización, reflejado mediante la reducción de la zona lesionada, volumen y cierre de la herida (Mazzucco et al., 2004; Frykberg et al., 2010).

Dentro del campo de la dermatología humana, una de las aplicaciones más importantes del PRP ha sido la aceleración de la cicatrización de las úlceras cutáneas crónicas. Anitua y colaboradores, observaron que a las 8 semanas de tratamiento de este tipo de heridas con PRP, el porcentaje de superficie curada fue significativamente mayor que en el grupo control (un 73% frente a un 21,4%, $P < 0,05$) (Anitua et al., 2008).

Las heridas crónicas se caracterizan por la presencia de inflamación de forma persistente debido a un desequilibrio entre las citoquinas pro-inflamatorias y las anti-inflamatorias y por los bajos niveles de factores de crecimiento, al mismo tiempo también existe un gran desequilibrio entre sustancias oxidantes y sustancias anti-oxidantes, mientras que los factores de crecimiento y las citoquinas juegan un papel crucial en el control del daño oxidativo (Behm et al., 2012).

Los pacientes con afecciones sistémicas como la diabetes, padecen frecuentemente úlceras cutáneas, y éstas acaban dando lugar a complicaciones vasculares y neuropatías periféricas. El empleo de los factores de crecimiento ha hecho que muchas de estas úlceras se puedan resolver disminuyendo el riesgo de complicaciones, el tiempo de curación y las posibilidades de infección y, por lo tanto, de amputación (Pietrzak and Eppley, 2005; Driver et al., 2006; Salemi et al., 2008).

En un estudio realizado en humana sobre heridas de espesor completo agudas en dermis, el 81,1% de los pacientes tratados con PRP estaban curados a los 42 días, frente a un 57,2% de los pacientes que no recibían este tratamiento (Hom et al., 2007).

McAleer y colaboradores en el 2006, mostraron la efectividad en humanos del uso de PRP autólogo en la cicatrización de heridas crónicas en la extremidad inferior, en pacientes en los que había fallado un trasplante de piel (McAleer et al., 2006). Driver y colaboradores en el 2006 llevaron a cabo el primer estudio prospectivo, randomizado, multicéntrico con grupo control sobre el uso de PRGF autólogo en el tratamiento de úlceras en pies de personas diabéticas y observaron que las úlceras tratadas con PRP cicatrizaban con mayor precocidad (Driver et al., 2006). En otro estudio se llevaron a cabo 20 ensayos clínicos controlados y aleatorios en pacientes, de los que 11 correspondían a cirugía oral y maxilofacial, 7 a úlceras cutáneas crónicas y 2 a heridas por cirugía, los cuales fueron tratados con PRP, y sólo se observó que en 5 de los casos (4 de cirugía oral y 1 úlcera crónica) no hubo diferencias entre grupos y se dieron reacciones adversas. Los 14 ensayos restantes, mostraron mejor resultado con PRP (Martinez-Zapata et al., 2009).

Zhenzhen Lian evaluó la eficacia del uso de Células madre mesenquimales (CM) y PRP en el tratamiento de heridas cutáneas refractarias a la cicatrización en un modelo de ratas diabéticas y concluyó que el grupo de tratamiento más efectivo fue el que se asoció PRP y CM ya que se observó un mayor cierre de las heridas por el incremento en la angiogénesis, la proliferación celular y la inducción de la expresión de TGF- β 1, además se presentó una mayor densidad de fibras de colágeno de forma significativa (Lian et al., 2014). En este último estudio también se observó la capacidad de proliferación y diferenciación de las células madre en un medio de cultivo de PRP de forma positiva, hecho que es reforzado por el trabajo de Maria G. Roubelakis y colaboradores en el que afirma que el PRP induce de forma significativa la habilidad migratoria y proliferativa de las células madre mesenquimales. En este último estudio se trataron heridas cutáneas de distinta etiología, entre ellas heridas con dehiscencia quirúrgica, úlceras de origen neuropático, úlceras isquémicas e incluso necróticas, todas ellas presentaron una aceleración del proceso de cicatrización, con un incremento de la vascularización en la zona ulcerativa. La gran mayoría de las úlceras ya presentaron una cicatrización prácticamente completa tras la primera aplicación de PRP, además el dolor junto con la inflamación en el área lesionada presentaba una reducción significativa en la mayoría de los pacientes (Roubelakis et al., 2014).

La acción regenerativa del PRGF está relacionada con tres funciones principales. En primer lugar, el PRP libera factores de crecimiento y citoquinas que son capaces de estimular la proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos y células endoteliales. El segundo factor

es la malla de fibrina que constituye la “estructura” del PRGF, esta malla ayuda y guía la migración de las células mesenquimales, derivadas de poblaciones de células madre residentes o precursoras de la base y de los alrededores de la herida. En tercer lugar destaca la propiedad antibacteriana de los factores liberados por las plaquetas (Bernuzzi et al., 2010).

El uso de PRP como opción terapéutica se justifica por su inocuidad (tratamiento seguro), bajo coste y simplicidad en su forma de obtención (Cole et al., 2010).

También es importante destacar el uso del PRP en cirugía plástica y reconstructiva, éste ha mostrado una disminución significativa de infecciones, tiempo de cirugía y recuperación del paciente. Principalmente el empleo de PRP en este campo se ha centrado en pacientes con pérdidas de piel y tejidos blandos, consecuencia de accidentes o patologías crónicas (Valbonesi et al., 2002). Tras la aplicación tópica o la inyección subcutánea del PRP se producen importantes cambios sobre la piel envejecida: restaura la vitalidad cutánea, aumenta su grosor, recupera la elasticidad, mejora la afluencia vascular, estimula las secreciones e incrementa su tersura y apariencia, ya que regula la remodelación de la epidermis y de la dermis (Mehta and Watson, 2008).

En el campo de la medicina estética se está empleando el PRP para la inyección subdérmica (en depresiones cicatriciales, surcos pronunciados entre otros), en mesoterapia para el tratamiento de arrugas principalmente, en *peelings* para favorecer la regeneración dérmica y epidérmica, entre otras aplicaciones (Arquero, 2009).

Aplicación de PRP-PRGF en otros tejidos

Cirugía oral y maxilofacial

Se trata de una especialidad pionera en la aplicación de PRP, de hecho la primera aplicación clínica de PRP fue en cirugía maxilofacial. Se ha demostrado que, tras su aplicación, se incrementa la formación y densidad del hueso, tanto cortical como alveolar (Whitman et al., 1997). Las aplicaciones van desde la aplicación en los lechos de extracción de piezas dentarias hasta favorecer que los implantes dentarios queden perfectamente unidos al tejido óseo contiguo, además de promover la regeneración ósea y la osteointegración (Anitua, 1999).

Lesiones musculares

Diversos estudios han demostrado que la administración de PRP en lesiones musculares acorta el periodo de recuperación ya que numerosos factores de crecimiento liberados por las

plaquetas estimulan la miogénesis (Hammond et al., 2009; Andia and Abate, 2015; Cianforlini et al., 2015).

Los factores de crecimiento b-FGF, IGF-1 y NGF incrementan la regeneración y mejora, la fuerza del músculo lesionado, además de estimular la proliferación de mioblastos (Menetrey et al., 2000).

Lesiones óseas

El PRP se ha utilizado en cirugía protésica de rodilla, roturas tendinosas, fracturas de cadera y rodilla, roturas de ligamentos de rodilla, entre otras patologías. Su aplicación en lesiones ortopédicas aporta una mayor capacidad de regeneración ósea, gracias a la liberación de factores de crecimiento por parte de los gránulos de las plaquetas que poseen efecto quimiotáctico y mitogénico sobre las células madre y los osteoblastos acelerando la cicatrización ósea (Mingo et al., 2007).

Serra comprobó que la aplicación de PRP en conejos con lesiones condrales de espesor completo en la zona de carga del cóndilo femoral medial, produce una reparación tisular con una clara tendencia a obtener características histológicas y biomecánicas similares a las de un cartílago articular sano (Serra, 2006).

Lesiones tendinosas y ligamentosas

La reparación del tendón se ve beneficiada principalmente por 5 Factores de crecimiento (IGF-I, TGF β , VEGF, PDGF y bFGF), que se encuentran en proporciones elevadas en las lesiones tendinosas y participan activamente en el proceso de reparación. Con su acción se reduce el proceso inflamatorio y se acorta el periodo de reparación y/o regeneración, por lo que se acorta el periodo de inmovilización y se alcanza la funcionalidad óptima en menos tiempo (Molloy et al., 2003).

Murray y colaboradores son pioneros en el uso de PRP para el tratamiento de roturas de ligamento cruzado anterior, tras la evaluación de los ligamentos con lesión se observó un mayor porcentaje de relleno del defecto y unas mejores propiedades biomecánicas que en los controles, por lo que concluyó que el PRP acelera el proceso de cicatrización del ligamento (Murray et al., 2006).

Oftalmología

El uso de PRP en el campo de la oftalmología destaca por su efecto regenerativo y reparativo sobre la retina, además de acelerar la cicatrización de úlceras corneales y la clínica de la queratoconjuntivitis seca (Cullinane et al., 2002; Alio et al., 2008).

Complicaciones en el uso de PRP-PRGF

El uso de diferentes sustancias para la activación de las plaquetas contenidas en el PRP fue una de las primeras complicaciones asociadas al uso de PRP, concretamente por el uso de trombina bovina. La trombina bovina puede favorecer el desarrollo de anticuerpos frente a los factores de coagulación V y XI y frente a la trombina humana, lo que podría dar lugar a importantes coagulopatías y poner en peligro seriamente la vida del paciente (Landesberg et al., 1998). En la actualidad la mayoría de autores recomiendan el uso de cloruro cálcico o trombina humana como agentes activadores del PRP (Anitua et al., 2004).

También se ha destacado el hecho de mantener unas medidas rigurosas de esterilidad durante su manipulación, limitando su aplicación a unas pocas horas tras su extracción (4-6 horas) por el riesgo y capacidad potencial de contaminación y desarrollo de infecciones (Zimmermann et al., 2001). En cambio, en otros trabajos se refleja que las plaquetas almacenan proteínas antibacterianas y fungicidas y que por ello podrían ayudar a prevenir la infección, además de tratarse de un producto completamente autólogo (Anitua et al., 2004).

Algunos autores han manifestado su preocupación por un posible efecto carcinogénico por parte de los PRP. No existen referencias actuales en la bibliografía que relacionen el uso de PRP con la aparición de procesos neoplásicos. Solo hay un artículo que analizó el efecto de los PRP a nivel sistémico y no se apreciaron variaciones destacables en los niveles séricos de citoquinas ni factores de crecimiento (Banfi et al., 2006).

En el año 2010, la agencia mundial antidopaje (World antidoping agency - WADA), incluyó el PRP en su lista de sustancias prohibidas. Estudios como el de Damiá del 2012 permitieron la supresión del PRP de la lista de sustancias prohibidas, ya que se demostró que la aplicación local de PRGF en músculo sano no se acompaña de un incremento de los niveles séricos del Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I), lo que excluye este tratamiento como sustancia dopante, que pudiese facilitar una hipertrofia muscular sistémica (Damiá, 2012). Inicialmente se prohibieron sólo las inyecciones intramusculares de PRP, mientras que todas las otras vías de administración, como la intralesional, intraarticular, entre otras, se permitieron y sólo requerían una declaración de uso. Esta restricción se debía a la preocupación del grupo de expertos de la

WADA de que los factores de crecimiento contenidos en el PRP pudieran estimular las células satélite del músculo y aumentar el tamaño y fuerza del músculo y más allá de la curación normal, ya que el PRP contiene factores de crecimiento que, purificados, están explícitamente prohibidos, como por ejemplo, IGF- 1, VEGF o PDGF entre otros (Dhillon et al., 2012). Hoy en día, se permite el uso de preparados derivados de plaquetas a partir de la centrifugación de sangre total autóloga, y hay que destacar que desde Mayo de 2013 el PRP ha sido aprobado como medicamento por la Agencia Española del Medicamento, por lo que su empleo ha quedado regularizado (Damiá, 2012).

Por último, otro gran inconveniente en el uso del PRP, es la falta de estandarización en el proceso de preparación en cuanto a cantidad de sangre extraída, velocidad de centrifugación y separación, número de plaquetas, presencia o no de leucocitos y método de activación. Todos estos pasos dan como resultado diferentes preparados plasmáticos que, por lo tanto, pueden tener una eficacia muy diferente (Kon et al., 2013).

Células madre

Introducción

Las células madre (CM) se definen como células no especializadas que poseen dos propiedades bien definidas: la capacidad de diferenciarse en otro tipo de células y la capacidad de autoregenerarse (Fortier, 2005). Además pueden dividirse indefinidamente sin perder sus propiedades y llegar a producir células especializadas (Diekman and Guilak, 2013).

La mayoría de los tejidos y órganos humanos y animales no son capaces de regenerarse de forma espontánea, este hecho justifica la importancia actual de la terapia celular como estrategia en la reparación tisular. La medicina regenerativa es un campo emergente multidisciplinar que tiene como objetivo mejorar la salud y la calidad de vida de nuestros pacientes mediante la restauración, mantenimiento y estimulación de los tejidos y las funciones de los órganos (Stoltz et al., 2015).

La historia de las células madre comenzó a mediados del siglo XIX, con el descubrimiento de que algunas células podían generar otras células distintas. A principios del siglo XX, las células

madre fueron identificadas cuando se hayaron, en el interior de la médula ósea, células madre hematopoyéticas y células estromales (Tavassoli and Friedenstein, 1983). El primer trasplante fue llevado a cabo con éxito por el Dr. Thomas en Nueva York, en los años 50. Dicho trasplante se realizó entre gemelos, uno de los cuales padecía de leucemia, evitando así posibles problemas inmunomediados. Posteriormente, en 1968, se llevó a cabo el primer trasplante alogénico entre dos hermanos y, ya en 1973, un joven con un desorden genético inmunodeficitario recibió células madre derivadas de médula ósea de un donante ajeno a su familia, tan solo seleccionado con una compatibilidad en grupo sanguíneo. A partir de este momento su uso se expandió rápidamente en los años 90 (Thomas, 1999).

Las células madre o troncales se caracterizan por su capacidad de autorrenovación, multipotencialidad y viabilidad funcional. La multipotencialidad es la capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen como adipocitos, condrocitos, osteocitos, mioblastos, miocardiocitos, neuronas, astrocitos, miocitos, tenocitos entre otros, mientras que la autorenovación de una célula es la capacidad de autogenerar una nueva célula que conserva la característica primitiva de “madre” y permanece “aletargada” hasta recibir un nuevo estímulo que la induzca a multiplicarse y dar lugar a linajes celulares iguales o incluso diferentes al original (Cahan and Daley, 2013; Kolios and Moodley, 2013).

Clasificación de las células madre

Las CM las podemos clasificar en función de su potencial de diferenciación: Totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, o células progenitoras, oligopotenciales o unipotenciales (Cahan and Daley, 2013). O bien, en función de su origen en: Células madre embrionarias, células madre fetales, células madre germinales y células madre adultas (Cahan and Daley, 2013; Teng et al., 2014).

En función de su potencial de diferenciación

Células Madre Totipotenciales

Las células totipotenciales u omnipotenciales son aquellas que están presentes durante los primeros estadios del desarrollo embrionario y que poseen la mayor capacidad de diferenciación, pudiendo dar lugar a todas las formas del embrión y tejidos placentarios. Estas células pueden diferenciarse en células embrionarias o extraembrionarias. Pueden formar nuevos embriones y éstos transformarse en nuevos organismos (Cahan and Daley, 2013; Kozlik and Wojcicki, 2014).

Células Madre Pluripotenciales

Las células pluripotenciales se pueden obtener de la masa interna celular del blastocisto son células capaces de producir tejidos derivados de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo) (Cahan and Daley, 2013; Kozlik and Wojcicki, 2014).

En el año 2006 un nuevo tipo de células pluripotenciales fueron desarrolladas mediante la reprogramación de células somáticas, denominadas células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Células Madre Pluripotenciales Inducidas (iPSCs)

Son células con características embrionarias obtenidas mediante la reprogramación de células adultas. Estas células se han convertido en las principales herramientas en el avance de la medicina personalizada, ya que surgieron con el fin de evitar los problemas éticos y técnicos de la utilización de células madre embrionarias (Hanna et al., 2010).

Posteriormente se identificaron cuatro factores de transcripción (Oct4, Sox2, y los oncogenes Klf4 y c-Myc), con la que se reprogramaron fibroblastos a un estado similar a células embrionarias, denominando estas células como células iPCS o células madre con pluripotencialidad inducida. Esta técnica se basa en el uso de un retrovirus, lo que llevaba a la integración de los genes exógenos en el genoma de forma permanente (Takahashi and Yamanaka, 2006). Este hecho se ha asociado con el desarrollo de tumores (Yu et al., 2009) y, como resultado se han buscado alternativas, como la propuesta por Zhou y colaboradores que lograron con éxito la reprogramación de las células mediante la administración de estos factores de reprogramación en forma de proteínas recombinantes purificadas (Zhou et al., 2008) o ARNm modificado en el caso de Warren y colaboradores (Warren et al., 2010).

Gracias a todos estos estudios, las células iPCS constituyen herramientas muy valiosas no sólo para estudiar la biología del desarrollo, sino también para capturar y tratar trastornos genéticos, así como para el descubrimiento de fármacos, ingeniería genética y, finalmente, terapias de trasplante celular (Cherry and Daley, 2012).

Uso de las iPCS en piel

La aplicación terapéutica de las iPCS en la cicatrización cutánea ha sido llevada a cabo por Itoh M. y colaboradores en pacientes con epidermólisis distrófica bullosa la cual se caracteriza por la presencia recurrente de heridas cutáneas. Estos investigadores diferenciaron estas iPCS en varios componentes celulares de la piel, incluyendo los queratinocitos, con gran eficiencia. El estudio concluyó que las iPCS tienen potencial para proporcionar una fuente de células

pluripotenciales para poder generar queratinocitos y tejidos específicos del paciente que son útiles para la medicina regenerativa y la modulación de enfermedades (Itoh et al., 2011).

Células Madre Multipotenciales

Dan lugar a tipos celulares de la misma capa o linaje embrionario del que proceden, (por ejemplo: una célula madre mesenquimal de médula ósea, al tener naturaleza mesodérmica, dará origen a células de ese linaje embrionario como miocitos, adipocitos u osteocitos, entre otros) y las podemos encontrar en la mayoría de tejidos del organismo adulto (Cahan and Daley, 2013; Kozlik and Wojcicki, 2014).

Mediante el proceso de transdiferenciación, las células multipotenciales procedentes de un linaje embrionario, se diferencian en células de otro linaje diferente del que proceden. Esto se ha visto por ejemplo, en células mesenquimales derivadas del mesodermo que se han diferenciado a células del tejido neuronal procedente del ectodermo (Barzilay et al., 2009).

Células Madre Oligopotenciales

Las células madre oligopotenciales pueden formar dos o más linajes dentro de un tejido específico. Este tipo de células se ha descrito en un estudio realizado por Majo y colaboradores en 2008, que obtienen células oligopotenciales de la superficie ocular del cerdo, incluyendo la córnea, para generar colonias individuales de células de la córnea y de la conjuntiva (Majo et al., 2008). También se consideran como células madre oligopotenciales las células madre hematopoyéticas, ya que pueden dar lugar tanto a células mieloides, como a células linfoides (Marone et al., 2002).

Células Madre Unipotenciales

Éstas solo son capaces de dar lugar a células de un solo linaje (por ejemplo, las células madre epidérmicas solo pueden producir células de tipo epiteliales escamosas queratinizadas), las encontramos en tejidos adultos y poseen un potencial más bajo de diferenciación comparadas con el resto de tipos de CM (Young and Black, 2004).

En función de su origen

Células Madre Embrionarias (ESC)

Las ESC, son células pluripotenciales, que se obtienen de los primeros estadios del desarrollo embrionario, a partir de la masa celular interna del blastocisto. Estas células se pueden diferenciar en tejidos de las tres capas germinales primarias, pero en cultivo pueden mantenerse en un estado no diferenciado durante un período prolongado ya que poseen una capacidad de proliferación extensa *in vitro* (Yao et al., 2006) o diferenciarse en multitud de tipos celulares

especializados como neuronas, adipocitos, células musculares entre otras (Korbling and Estrov, 2003).

En el año 1981 se obtuvieron las primeras células embrionarias de mamífero procedentes de embriones de ratón (Evans and Kaufman, 1981) y diecisiete años más tarde se publicó la obtención de células madre embrionarias (ESC) a partir de embriones humanos sobrantes de procesos de reproducción asistida (Thomson et al., 1998).

Uso de ESC en piel

El uso de ESCs humanas se enfrenta a grandes controversias éticas además de restricciones legales rigurosas. Recientemente se han obtenido métodos alternativos que permiten la obtención de ESC sin destruir el embrión (Chung et al., 2006). Un estudio preclínico relativamente reciente demostró que las ESC humanas podían diferenciarse en queratinocitos funcionales que podían ser empleados para la reconstitución de la epidermis (Guenou et al., 2009).

Célula Madre Germinales (GSC)

Las células madre germinales tienen una capacidad de diferenciación similar a las de las ESC, pero son más difíciles de aislar. Se trata de un tipo de células pluripotenciales que provienen de la cresta gonadal (esbozos gonadales del embrión) (Aflatoonian and Moore, 2005).

Células Madre Fetales (FSC)

Las células madre fetales (FSC) las podemos obtener de tejidos y órganos fetales como sangre, hígado o pulmón y poseen características similares a sus homólogos en tejidos adultos. Tienen mayor capacidad de expansión y diferenciación, aunque existen muchas dudas acerca del origen de estas células. Éste origen podría ser células embrionarias que aparecen distribuidas por todos los tejidos fetales como reservorios de células troncales o bien podría tratarse de células troncales que proceden de nuevas oleadas de progenitores sin relación con las células troncales embrionarias (Zhu et al., 2014).

Células Somáticas o Adultas (ASC)

Se pueden obtener de cualquier tejido del organismo adulto que derive de las 3 capas germinales y que posea capacidad de reparación o regeneración, por ejemplo la placenta y el cordón umbilical (Timmins et al., 2012).

Es importante destacar que, al tratarse de células autólogas (obtenidas a partir del propio paciente), no existe riesgo de crear rechazo por parte del organismo. Adicionalmente, al

proceder del individuo adulto no plantean un problema ético y son capaces de generar gran variedad de tipos celulares en un tejido en concreto (Borena et al., 2015).

Inicialmente se pensaba que estas células eran multipotenciales, es decir, se podían diferenciar únicamente en tipos celulares derivados del mismo linaje embrionario del que procedían. Pero, gracias a los estudios realizados en los últimos años, se ha llegado a la conclusión que la potencialidad de algunos tipos de ASC es mayor de lo esperado, ya que han mostrado en determinadas condiciones capacidad para diferenciarse en células de diferentes linajes (Korbling and Estrov, 2003). Así, las células madre hematopoyéticas han sido capaces de diferenciarse en diversos tejidos, entre ellos endotelio, músculo cardíaco, músculo estriado, hepatocitos, neuronas, piel e intestino (Rafii and Lyden, 2003).

Mecanismo de acción

Actualmente se han demostrado efectos beneficiosos de las ASC en diversas patologías, pero todavía no se conoce con exactitud los mecanismos mediante los cuales las células trasplantadas podrían mejorar o promover la regeneración de los tejidos. Existen varias hipótesis basadas en las evidencias existentes que incluyen fenómenos como la transdiferenciación celular, la fusión de células y un efecto autocrino/paracrino secundario a la liberación celular de diversas moléculas solubles o citocinas con acciones específicas, que incluyen varios factores de crecimiento, incluso pudiendo suceder varios de estos mecanismos a la vez (Ratajczak et al., 2012). Las ASC trasplantadas se estimulan mediante factores liberados por las células residentes o por contacto con ellas, de esta manera se diferencian en el tipo celular local circundante, integrándose así en el lugar apropiado para desarrollar una acción regenerativa (Lechner and Habener, 2003).

Mediante un mecanismo paracrino se liberan factores solubles que actúan localmente estimulando las células residentes. Estos productos solubles pueden también afectar, de manera autocrina, a las propias células trasplantadas que los secretan, modulando su biología y favoreciendo la autorrenovación, proliferación y continuidad de sus funciones (Gnecchi et al., 2008).

Las ASC pueden contribuir a la regeneración de tejidos mediante diversas acciones, entre las que destacan la diferenciación en células del tejido dañado, lo que podrían realizar mediante los fenómenos de transdiferenciación o fusión celular. La integración en el tejido lesionado con emisión de señales que favorezcan el reclutamiento en ese lugar de otras células madre o progenitoras que participen en la regeneración de los tejidos, acción que podrían realizar mediante la liberación de moléculas solubles con efectos autocrinos/paracrinos. El

mantenimiento de su propia autorrenovación, proliferación y diferenciación para cumplir las funciones fisiológicas del tejido en el que se encuentran. Además de un efecto antiinflamatorio, de inhibición de la apoptosis y de incremento de la vascularización del tejido dañado. Por último poseen también propiedades de citoprotección y estimulan las células sanas presentes en la región lesionada (Gnecchi et al., 2008; Ratajczak et al., 2012).

Encontramos dos tipos de ASC, dependiendo del origen de las mismas:

Células Madre Hematopoyéticas (HSC)

Desde hace más de 50 años se han estado utilizando clínicamente las HSC provenientes de la médula ósea y, más recientemente, las obtenidas de la sangre periférica o de la sangre del cordón umbilical, para el tratamiento de leucemias, linfomas y otros tipos de patologías (Gratwohl et al., 2002).

Dentro del grupo de las HSC existen diferencias en cuanto al grado de auto-renovación (Ema et al., 2005), diferenciación celular (Muller-Sieburg et al., 2012) y vida útil (Yang et al., 2005). Estas células se diferencian tanto al linaje linfóide (linfocitos y células natural killer) como linaje mielóide (eritrocitos, plaquetas, monocitos, etc.) y se han establecido clasificaciones aún más detalladas basándose en sus periodos de diferenciación, clasificándolas como HSC de corto, medio y largo plazo (Ema et al., 2014).

Las HSC se utilizan generalmente en infusión intravenosa con el fin de restablecer la función medular en pacientes con médula ósea no funcional. Las células pueden obtenerse del propio paciente (autólogas) o de un donante de la misma especie (allogénico), relacionados o no. Se utiliza principalmente para el tratamiento de enfermedades hematológicas malignas y corrección de alteraciones hereditarias de células derivadas de la médula ósea como leucemias, mielomas, linfomas, anemias aplásicas, síndromes mielodisplásicos y enfermedades genéticas diversas (O'Brien and Rizzieri, 2013).

Uso de HSC en piel

Krause y colaboradores llevó a cabo estudios en ratas con células hematopoyéticas derivadas de médula ósea en diferentes órganos, éstas dieron lugar a células epiteliales foliculares, glándulas sebáceas, queratinocitos epidérmicos e incluso células dendríticas. Por lo que sugirieron que las HSC podrían emplearse en el tratamiento de heridas cutáneas (Krause et al., 2001). Por otra parte, la aplicación tópica de estas células en heridas quirúrgicas excisionales de espesor completo en ratas diabéticas, resultaron en un alto porcentaje de cierre de las mismas (Chan et al., 2007).

Células Madre Mesenquimales (MSC)

Las células madre mesenquimales (MSC) poseen características multipotenciales y las encontramos en tejidos de origen mesodérmico como la médula ósea, la placenta (Timmins et al., 2012), el cordón umbilical (Yang et al., 2012), el músculo esquelético (Jackson et al., 2011), la cápsula sinovial (Jones and Pei, 2012), el líquido sinovial (Jones et al., 2008) y el tejido adiposo (Black et al., 2008; Yarak and Okamoto, 2010).

Se ha descrito que las MSC se pueden diferenciar en múltiples linajes celulares diferentes, entre los que se encuentran los osteoblastos, condroblastos, adipocitos, tenocitos y miocitos (Krampera et al., 2006).

En el año 1974 fueron descritas por Friedenstein y colaboradores (Friedenstein et al., 1974) y desde entonces se consideran como una buena opción terapéutica para diversas patologías ya que están presentes en gran cantidad de órganos y tejidos conectivos postnatales, y no están sujetas a las mismas restricciones éticas que las células madre embrionarias (Mizuno et al., 2012).

En cuanto a la actividad inmunomoduladora de las MSC, estas participan tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Una de las principales maneras que tienen estas células para regular la actividad inmune es mediante la secreción de moléculas solubles y citoquinas que participan en la inmunosupresión (Dorransoro et al., 2013).

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), cita una serie de características que deben cumplir estas células. Entre ellas se encuentra su morfología fibroblástica y aspecto fusiforme, siendo capaces de adherirse al soporte de cultivo cuando se mantienen en cultivo de tejidos estándar. Además, más del 95 % de estas células deben expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 y ser negativas para CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA -II. Por último, bajo condiciones estándar de diferenciación *in vitro*, deben tener la capacidad de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Dominici et al., 2006).

En medicina humana, las MSC se utilizan cada vez más para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, ya que podrían aumentar la función miocárdica tras un infarto (Hare and Chaparro, 2008), en enfermedad inflamatoria intestinal, existen datos preliminares de su capacidad para reparar úlceras y fístulas (García-Olmo et al., 2005), en diabetes mellitus, donde podrían mejorar el perfil glucémico por un incremento en el número de islotes pancreáticos (Lee et al., 2006), en enfermedades del aparato locomotor como osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, hipofosfatasa infantil, artrosis, etc. (Ma and Mao, 2012), en patologías oculares como traumatismos, quemaduras, sustancias químicas, síndrome de Stevens Johnson o

penfigoide ocular y en enfermedades neurológicas como enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, esclerosis en placas, infartos cerebrales o lesiones medulares (Prosper et al., 2006).

Uso de MSC en piel

Las MSC intervienen en mayor o menor grado en todas las fases del proceso de cicatrización cutánea. Pueden atenuar directamente el proceso inflamatorio mediante la disminución de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y el interferón γ (Kim et al., 2013), y de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y la IL-4 (Aggarwal and Pittenger, 2005). Por lo tanto, las propiedades anti-inflamatorias de las MSC incrementan la importancia de su uso en el tratamiento de heridas crónicas. Particularmente la vasculogénesis y la angiogénesis, que son pasos cruciales en el proceso de cicatrización de heridas, también son estimuladas por factores paracrinos liberados por las MSC, como el IGF-1, PDGF-BB, VEGF o bFGF (Chen et al., 2008). Además, las MSC poseen propiedades antibacterianas, mediante la secreción de factores antimicrobianos o indirectamente mediante la secreción de factores inmunomodulativos que regulan el proceso de fagocitosis y la destrucción bacteriana (Mei et al., 2010) y, finalmente, promueven la proliferación de fibroblastos, acelerando el cierre de heridas cutáneas (Maxson et al., 2012).

Uso de MSC en otros tejidos o patologías

Patologías cardíacas

Gracias a sus propiedades regenerativas e inmunomoduladoras, las MSC suponen una opción atractiva para la reparación cardiovascular. En estudios preclínicos, se vió que las MSC mejoraron la reparación cardíaca después de su administración (Zhang et al., 2006). Las MSC se han utilizado para tratar a pacientes con infartos agudos y crónicos de miocardio, con mejoras significativas en las funciones cardíacas (Zeinaloo et al., 2011).

Patologías neurológicas

La recuperación neurológica, tras un trasplante de células madre en un modelo animal con isquemia, demuestra su eficacia y seguridad (Hess and Borlongan, 2008). Varios estudios en ratones han mostrado que, en general, el trasplante de MSC en la corteza de una arteria cerebral media ocluida puede dar lugar a la recuperación de la función neurológica (Ding et al., 2007). Se ha visto que las MSC migran a la zona isquémica y se diferencian en neuronas, células gliales y otros tipos de células neuronales.

El grupo de investigadores de Yang y colaboradores han publicado recientemente datos impresionantes donde el trasplante de MSC puede ser una posible estrategia para promover la regeneración de la fibra corticoespinal y mejorar la función locomotora tras la transección de la médula espinal en ratas comparándolas con un grupo control. Los resultados mostraron un aumento del número de axones regenerados en la zona corticoespinal de la zona alrededor de la lesión. Se observó migración de MSC de la zona de implantación a la lesión, y dedujeron que la liberación de citoquinas y factores de crecimiento de las células madre era el mecanismo clave para la progresión de la fibra corticoespinal (Yang et al., 2008).

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo definido por la pérdida progresiva de la función dopaminérgica (Yasuhara and Date, 2007). El grupo de investigadores de Fu y colaboradores ha mostrado, en un modelo de rata con enfermedad de Parkinson, a las que se les realiza una implantación de MSC en el cuerpo estriado, una mejora parcial de la lesión inducida por actividad rotatoria inducida por D-anfetamina (Yan et al., 2013).

Patologías autoinmunes

La diabetes mellitus tipo I o diabetes juvenil es una enfermedad autoinmune de las células beta productoras de insulina del páncreas (Atkinson and Eisenbarth, 2001). Algunos estudios han demostrado que la aplicación de células de diversas fuentes (embrionarias, pancreáticas, hepáticas, médula ósea y cordón umbilical) originan la producción de insulina (Hori et al., 2005).

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune inflamatoria sistémica crónica que afecta a numerosos tejidos y órganos, pero las articulaciones sinoviales son las más afectadas, entre ellas las articulaciones pequeñas diartrodiales de las manos y pies (Scott et al., 2010). La progresión de la patología resulta en la destrucción del cartílago articular. Como resultado, la artritis reumatoide puede ser una enfermedad candidata para la reparación articular a través de las MSC debido a sus propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras mediante la modulación de la proliferación de células T y B y la producción de citoquinas en un complejo mayor de histocompatibilidad de manera independiente (Ren et al., 2008).

Traumatología

La necrosis avascular de la cabeza femoral, es una enfermedad degenerativa progresiva que resulta de la interrupción del suministro de sangre al hueso y, si no se trata a tiempo, conduce al colapso total de la cabeza femoral finalmente, y requiere el reemplazo total de la cadera en medicina humana o en algunos casos, la exéresis de la cabeza femoral en medicina veterinaria (Wang et al., 2005). El injerto de médula ósea autóloga con MSC se ha usado para el tratamiento de dicha enfermedad desde 1991 obteniendo buenos resultados a corto plazo (Chan et al.,

1991). Se han llevado a cabo diversas investigaciones preclínicas usando diversos modelos animales para evaluar la eficacia terapéutica de las MSC en el ratón (Cui et al., 2006), conejo (Li et al., 2011), perro (Peng et al., 2011) y ovejas (Feitosa et al., 2010), indicando que el trasplante autólogo o alogénico de MSC, es capaz de sobrevivir, proliferar y diferenciarse en osteoblastos directamente en la cabeza femoral necrótica después del trasplante, observándose una mejora en la reparación de la necrosis y una mejora de la regeneración ósea. Además, las MSC intravenosas implantados muestran buen resultado migrando y reparando los tejidos lesionados.

Otra enfermedad importante por ser la más frecuente de las patologías degenerativas, es la osteoartrosis. Se caracteriza por la degeneración del cartílago articular, acompañada de esclerosis ósea subcondral e inflamación sinovial (Gharbi et al., 2011). Un estudio evaluó de manera objetiva mediante una plataforma de fuerza, el efecto la infiltración intraarticular autóloga de MSC derivadas de tejido adiposo inguinal, en combinación con PRGF en perros con OA, obteniendo una mejora de todos los parámetro valorados (pico de fuerza vertical e impulso vertical) a 1, 3, y 6 meses post-infiltración, sin la aparición de efectos secundarios (Vilar et al., 2013).

Tejido muscular

El músculo esquelético tiene una gran capacidad regenerativa, atribuida a la diferenciación de las “células satélite” multipotenciales, pero recientemente se han descrito otros linajes de células progenitoras quiescentes en el músculo, son las “MDSC” (Muscle Derived Stem Cells). Este efecto regenerativo de las células mesenquimales, se debe más a su capacidad inductora sobre otras células progenitoras, como las células satélite (que serían las que se diferenciarían hacia mioblastos), que a su propia capacidad de diferenciación o de generar fenómenos de fusión celular. Ante la aplicación de las células madre en la curación del músculo, se ha demostrado que en respuesta a la lesión, no sólo las células madre específicas del músculo sino también las no específicas, participan en el proceso de reparación invadiendo el área lesional, diferenciándose en células satélite y finalmente participando en la reparación del músculo esquelético (Charge and Rudnicki, 2004).

Orígenes de MSC

Podemos obtener MSC de diversas fuentes del organismo adulto (Tabla 12), dentro de las cuales, las más frecuentes son médula ósea, placenta (Timmins et al., 2012), cordón umbilical (Yang et al., 2012), músculo esquelético (Jackson et al., 2011), cápsula sinovial (Jones and Pei,

2012), líquido sinovial (Jones et al., 2008) y tejido adiposo entre otros (Black et al., 2008; Yarak and Okamoto, 2010). En la tabla 12 se ofrece un resumen de las mismas.

Tabla 12. Fuentes de obtención clínicas de las MSC (Nuschke 2014).

Fuente de MSC	Método obtención	Marcadores de superficie
Médula ósea	Aspirado de médula ósea en huesos	+CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD29 -CD34, CD45, CD14
Tejido adiposo	Liposucción, biopsias tejido adiposo	+CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD9, CD29, CD106 -CD34, CD45, CD133, CD144, CD14
Placenta	Líquido amniótico o tejido placentario	+CD44, CD29, CD105, CD90, CD144 -CD14, CD34, CD45, CD117
Cordón umbilical	Cordón umbilical, sangre del cordón o gelatina de Wharton	+CD73, CD105, CD44, CD29 -CD45, CD34, CD14
Sangre periférica	Mobilización de MSC en sangre (inyecciones de G-CSF) recogidas mediante centrifugación	+CD73, CD90, CD105, CD44, CD166 -CD34, CD45, CD14

Médula ósea

Se trata un tejido complejo compuesto por células hematopoyéticas (precursores y células diferenciadas) y una mezcla heterogénea de células estromales. En el estroma se incluyen adipocitos, reticulocitos, células endoteliales y células fibroblásticas, que están en contacto con los elementos hematopoyéticos. Se considera una de las fuentes principales para el aislamiento de diversos tipos celulares. Se ha demostrado que entre las células del estroma, se encuentran una población celular de células mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSC) (Caplan, 1991).

La médula ósea como fuente de obtención presenta una principal ventaja, la posibilidad de aislar células con alta eficiencia y capacidad de diferenciación. En cambio, también posee dos limitaciones importantes, la primera es que la toma de la muestra es un procedimiento invasivo y la segunda es la elevada correlación inversa existente entre la edad y el potencial de diferenciación de las MSC, lo que dificulta su utilización en pacientes de edad avanzada (Wan, 2013).

Uso de Células Mesenquimales Derivadas de Médula ósea (BMSC) en piel

Este tipo de células suponen una fuente de fácil acceso y expansión in vitro, además de poseer un potencial inmunogénico bajo, estas dos características hacen que se empleen con frecuencia (Zou et al., 2010).

Tras la administración de BMSC alogénicas de forma sistémica no se ha observado ningún rechazo o si este ha estado presente ha sido muy leve, favoreciendo su uso en heridas cutáneas

(Mansilla et al., 2005). Un estudio experimental en ratas demostró que las BMSC contribuyeron a la recuperación de la población de fibroblastos dérmicos en heridas cutáneas. Adicionalmente demostraron que las BMSC expresaban una mayor cantidad de colágeno, FGF y VEGF comparado con los fibroblastos dérmicos nativos, lo que demuestra el potencial que poseen en la aceleración del proceso de cicatrización cutánea (Fathke et al., 2004). Los mecanismos que contribuyen a la mejora de la cicatrización cutánea varían ligeramente en las BMSC. En vez de producir factores de crecimiento, mejoran la cicatrización cutánea acelerando la reepitelización, incrementando la angiogénesis y diferenciándose en células epiteliales que expresan el marcador específico de queratina (Wu et al., 2007).

La evidencia preclínica también apoya el uso terapéutico de las BMSC, ya que la inyección de BMSC humanas en heridas incisionales mejora el cierre de éstas aportándoles una mayor fuerza tensil y una reducción significativa de la formación de cicatriz en conejos (Stoff et al., 2009). En otro estudio se aplicaron BMSC en heridas excisionales de espesor completo en ratones y observaron que estas heridas cicatrizaban con mayor facilidad además de presentar una menor reacción inflamatoria (Chen et al., 2009).

Con respecto a la administración de BMSC en formas diferentes, destacar el estudio llevado a cabo por Falanga y colaboradores en ratones y humanos que emplearon de forma satisfactoria BMSC autólogas en forma de spray para mejorar la cicatrización de heridas agudas y heridas crónicas. El empleo de dichas células en spray podría facilitar el uso clínico en terapias basadas en MSC (Falanga et al., 2007).

La aplicación de las BMSC en cicatrización cutánea ha sido planteada en el manejo de diferentes condiciones clínicas. Badiavas y colaboradores mostraron que la aplicación autóloga de BMSC impregnadas en matrices de colágeno daba lugar a una reducción del tamaño de la herida, un incremento de la vascularización de la dermis y un incremento del grosor cutáneo en pacientes con úlceras crónicas en la pierna, que no respondían a tratamientos convencionales durante más de un año (Badiavas and Falanga, 2003).

A pesar de los estimulantes resultados tanto de estudios clínicos como preclínicos, todavía existen retos en el uso terapéutico de las BMSC en heridas cutáneas. Las MSC deben expandirse en cultivos hasta alcanzar un número suficiente para su aplicación tópica y tienen que crecer en la herida para conseguir su objetivo terapéutico. Aunque no supone un problema para el tratamiento de heridas crónicas pequeñas, el hecho de necesitar un número más elevado de células para tratar heridas de gran superficie es todavía un reto hoy en día. Adicionalmente, en respuesta a quemaduras graves y traumatismos se ha observado una supresión de médula ósea

debida a una sepsis o por toxicidad de la sulfadiazina, dando lugar a un número reducido de células, y por lo tanto, limitando el potencial de la aplicación clínica de BMSC en estas situaciones (Badiavas and Falanga, 2003; Butler et al., 2010). Además, la fuente de BMSC disminuye de forma significativa con la edad y este hecho se considera que limita la aplicación de BMSC autólogas en heridas crónicas de pacientes mayores (Rao and Mattson, 2001).

Cordón Umbilical

Las MSC provenientes de cordón umbilical (UCMSC) se pueden aislar de forma no invasiva ni dolorosa y con mínima contaminación. Además poseen una alta tasa de proliferación y expansión, por lo que han mostrado un gran potencial clínico en medicina regenerativa (Li and Cai, 2012). Dentro del cordón umbilical, estas células se pueden aislar de diversas regiones como subendotelio de la vena, sangre del cordón umbilical, regiones perivasculares y gelatina de Wharton. Aquí es donde se obtienen cantidades mayores de células y con unas tasas de derivación a MSC más altas (Troyer and Weiss, 2008).

Uso de Células Mesenquimales Derivadas de Cordón Umbilical (UCMSC) en piel

Las UCMSC se consideran la mayor fuente de células madre con estado inmune nativo y la sangre de cordón umbilical humano es una fuente rica en células madre hematopoyéticas útiles para el tratamiento de diversas enfermedades pediátricas y adultas. A pesar de ello, existe controversia sobre la presencia de MSC en la sangre del cordón umbilical (Rao et al., 2012). Mortier y colaboradores aislaron células madre de cordón umbilical y pudieron diferenciarlas posteriormente en células epiteliales in vitro. Este mismo estudio apoyó la propuesta de que las UCMSC podrían ser empleadas como material inicial para la expansión de las células necesarias para el tratamiento de grandes defectos cutáneos (Mortier et al., 2010). De todas formas, el trasplante o transfusión de UCMSC puede dar lugar a rechazos inmunológicos debido a su naturaleza alogénica y, por este motivo, la inmunogenicidad de las mismas debería ser evaluada minuciosamente antes de cualquier aplicación clínica de las mismas (Teng et al., 2014).

Placenta

Las células mesenquimales derivadas de la placenta, son fácilmente accesibles, la recogida del donante no es invasiva ni dolorosa, no presenta controversias éticas y, además, se pueden aislar con mínima contaminación y tienen baja inmunogenicidad al igual que las derivadas de cordón umbilical. A pesar de ello, las células mesenquimales derivadas de placenta tienen una mayor capacidad proliferativa, se dividen más rápidamente, su tasa de apoptosis es menor y presentan mayor cantidad de células en fase mitótica (Zhu et al., 2013a).

Dentro del tejido placentario, se ha prestado especial atención a la membrana amniótica. En ella se han aislados dos poblaciones celulares con características de células madre (Insausti et al., 2010):

Las células epiteliales conocidas como “Human Amniotic Epithelial cells”, que poseen características muy parecidas a las células madre embrionarias, expresando marcadores antigénicos embrionarios, factores de transcripción propios de células pluripotenciales y características de diferenciación hacia las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo) y las células mesenquimales, obtenidas del estroma mesodérmico y denominadas “Human Amniotic Mesenchymal Stem or Stromal cells”, las cuales son células con características multipotenciales (Insausti et al., 2010).

Músculo esquelético

La gran capacidad de regeneración de las células madre derivadas de músculo esquelético se debe a la presencia de células madre musculares, entre ellas las células satélite que son capaces de regenerar músculo y poseen propiedades de autoregeneración, pero solo están asociadas al linaje miogénico, y las células mesenquimales derivadas del tejido muscular que presentan una mayor capacidad de regeneración y pueden diferenciarse en múltiples linajes (Qu-Petersen et al., 2002).

Diversos estudios experimentales han demostrado su capacidad de regenerar músculo esqueléticos y cardíaco, hueso, cartílago articular, e incluso reponer médula ósea de ratones irradiados letalmente (Kuroda et al., 2006; Lavasani et al., 2014).

Tejido adiposo

Las células madre mesenquimales derivadas de grasa (AMSC) tienen una morfología fibroblástica y una elevada capacidad de proliferación in vitro (Huang et al., 2013b). La obtención de este tipo de células presenta una serie de ventajas frente a otras fuentes de obtención, ya que el tejido adiposo es abundante y de muy fácil recolección en el organismo, se puede obtener en grandes cantidades, con anestesia local y causando mínimas molestias en el individuo, además, este tejido posee un elevado rendimiento ya que, con cantidades muy pequeñas de muestra se puede obtener un número muy elevado de células (Mizuno, 2009).

En medicina humana, la grasa se obtiene mediante procedimientos de liposucción. Técnica que produce menor grado de molestias para el paciente y menor morbilidad en la zona donante que otros métodos de obtención. Previamente a su cultivo para obtener las células, se digiere con colagenasas, se lava y se filtra (Mizuno, 2009). En cambio, en medicina veterinaria, específicamente en la especie canina, existen diversas zonas para la obtención de tejido adiposo,

ya sea mediante un procedimiento quirúrgico abierto o a través de laparoscopia. Entre las principales áreas de recolección del tejido, encontramos el ligamento falciforme (Bigham-Sadegh et al., 2012), la región torácica lateral (Haghighat et al., 2011), la región escapular caudal (Chung et al., 2013), la grasa intra-abdominal o subcutánea obtenida durante cirugía de ovariectomía (Martinello et al., 2011; Reich et al., 2012), la grasa de la zona glútea (Kang et al., 2012) y la región inguinal (Oh et al., 2012).

Gracias a los resultados de diversos estudios experimentales se ha demostrado que existen diferencias en la composición de las AMSC y su capacidad de diferenciación en las diversas regiones anatómicas (Prunet-Marcassus et al., 2006). En humana, se ha visto que el tejido adiposo muestra diferencias metabólicas de acuerdo con la localización anatómica (Fruhbeck et al., 2001). Además, la edad es otro factor que puede interferir en la composición de las células, ya que se ha demostrado que los individuos más jóvenes tienen un mayor número de AMSC en comparación con sujetos de mayor edad (Sharpless and DePinho, 2007).

Las AMSC son de menor tamaño si las comparamos con las BMSC además de poseer diferente expresión génica y diferentes marcadores de superficie celular. Una gran ventaja de las AMSC con respecto a las BMSC es que pueden someterse a un mayor número de pasajes antes de la senescencia, lo que les proporciona una mejor tasa de proliferación (Peng et al., 2008).

Uso de Células Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) en piel

El uso de AMSC en la reparación de heridas y regeneración de tejido ha sido analizado en un gran número de estudios experimentales tanto in vivo como in vitro. Kim y colaboradores demostraron que la aplicación de AMSC en heridas cutáneas acelera de forma significativa la reepitelización de dichas heridas mediante el estímulo de la proliferación de fibroblastos dérmicos gracias a un contacto directo célula con célula o por mecanismos paracrinicos que estimulan la secreción de una gran variedad de factores de crecimiento como el PDGF, FGF y TGF- β (Kim et al., 2007). En heridas cutáneas de espesor completo, en un modelo experimental con ratas, las AMSC estimularon en el proceso de neovascularización y aceleraron el cierre de las heridas como resultado de la secreción de HGF, VEGF-A, y FGF-2. Este estudio también desveló el gran potencial de diferenciación que presentan las AMSC en células epiteliales y endoteliales, apoyando una vez más el uso de las mismas en la regeneración de tejidos (Nie et al., 2011). Las funciones tróficas de las AMSC también pueden contribuir en el proceso de cicatrización cutánea. Maharlooei y colaboradores, en un modelo experimental de ratas diabéticas, observaron que la administración local de AMSC aceleró el cierre de heridas cutáneas de espesor completo (Maharlooei et al., 2011).

Este tipo de células también pueden ser empleadas en ingeniería tisular para la producción de sustitutivos de piel *in vitro* (Trottier et al., 2008). La aplicación tópica de AMSC humanas cultivadas en un scaffold de fibrina mostró una mejora en la reparación de las heridas cutáneas y, adicionalmente, estas células demostraron ser capaces de diferenciarse y contribuir a la formación de componentes fibrovasculares, endoteliales y epiteliales del tejido reconstituido (Altman et al., 2009). Se especula que el mecanismo de cicatrización llevado a cabo por las AMSC es el siguiente: Las AMSC contribuyen a la reparación cutánea y a la regeneración tisular mediante la secreción activa de factores de crecimiento, como el VEGF y el HGF, y con ello promueven el proceso de angiogénesis y la proliferación de queratinocitos o de fibroblastos dérmicos (Salgado et al., 2010). Las AMSC también se pueden emplear como sustitutos de fibroblastos en ingeniería cutánea para injertos, gracias a la demostración de Blasi y colaboradores sobre las propiedades antiinflamatorias, avasculogénicas y angiogénicas de las mismas (Blasi et al., 2011).

Una vez obtenidas las MSC de tejido adiposo pueden ser criopreservadas hasta 6 meses garantizando que estas mismas células son accesibles y viables para su uso terapéutico en el futuro (Gonda et al., 2008). Se ha demostrado que el PRP mejora la proliferación de las AMSC humanas y diversos estudios promueven su utilización para ingeniería de tejidos blandos y cicatrización de heridas (Kakudo et al., 2008). Dichas células pueden promover la proliferación de fibroblastos dérmicos mediante el contacto directo con células o a través de la activación paracrina en la fase de reepitelización de la cicatrización cutánea y estimulan la cicatrización cutánea gracias a la migración epitelial, la angiogénesis con una mayor tasa de cicatrización y la menor formación de tejido cicatricial (Kim et al., 2007).

El uso de AMSC también ha sido testado para el retraso de la formación de arrugas foto-inducidas tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio en el que se cultivaban fibroblastos dérmicos humanos con AMSC y se exponían a radiación ultravioleta, se observó una menor tasa de proliferación en los cultivos control, mientras que aquellos que fueron cultivados con AMSC no se vieron afectados por la radiación. Este mismo estudio *in vitro* fue reproducido *in vivo* en ratas a las cuales se les inyectaron AMSC de forma subcutánea y, posteriormente, se expusieron a luz ultravioleta durante 8 semanas. Dicho estudio preclínico resultó en un retraso en la formación de arrugas en las ratas tratadas con AMSC comparado con las ratas control, lo cual sugiere un posible efecto paracrino de las AMSC (Kim et al., 2009b).

Las AMSC pueden iniciar o estimular la regeneración tisular mediante dos mecanismos distintos, gracias a la diferenciación directa en células de la piel o por la secreción de factores

paracrinos, que inician el proceso de cicatrización a través del reclutamiento de células madre endógenas y células endoteliales y regulando la respuesta inflamatoria (Hassan et al., 2014).

También encontramos estudios preclínicos en la especie canina, como el estudio experimental de Kim JH y colaboradores los que generan heridas de espesor completo en el dorso de beagles e infiltran intradermicamente distintas concentraciones de MSC alogénicas. La evolución se realizó a 7, 14, 21 y 35 días tanto macro como microscópicamente. Dicho estudio obtuvo los siguientes resultados: las heridas tratadas con MSC mostraron un cierre cutáneo más rápido comparado con las heridas control gracias a la estimulación de la reepitelización por parte de las MSC, se hayó una proliferación de los queratinocitos más activa en las heridas infiltradas con MSC, detectado mediante inmunohistoquímica; en las evaluaciones microscópicas con la tinción tricrómica de masson las heridas tratadas con MSC mostraron una mayor deposición de colágeno lo que indica una estimulación de la proliferación de fibroblastos resultando en una formación de tejido de granulación más intensa, el proceso de angiogénesis también se vió estimulado en las heridas tratadas con MSC, ya que las MSC pueden atraer macrófagos y células endoteliales vasculares al tejido dañado mediante la liberación de diversos factores angiogénicos (Kim et al., 2013). La expresión de bFGF en las heridas tratadas con MSC estaba incrementada hecho que podría ayudar a la neoformación de vasos sanguíneos y a la producción de fibras de colágeno , adicionalmente también se observó un incremento de metaloproteinasas de matriz (MMP), que juegan un papel crucial en el control de la degradación de colágeno y en la remodelación de las heridas previniendo la formación de cicatrices hipertróficas y la contracción excesiva, manteniendo una buena apariencia estética y una buena funcionalidad (Kim et al., 2013). También se demostró que las MSC regulaban la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, disminuyendo la inflamación local. Finalmente se concluyó que no existían diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de MSC empleadas (Kim et al., 2013), hecho que se contradice con el estudio de Falanga, un estudio clínico humano que reveló una fuerte correlación entre el número de células y el índice de curación de úlceras. Este mismo estudio sugirió que al menos se necesitan más de 1×10^6 células/cm² de herida para conseguir un efecto terapéutico significativo (Falanga, 2005).

El retraso en la cicatrización junto con la formación de cicatriz son las complicaciones más frecuentes que encontramos tras una intervención quirúrgica, por ello el estudio de Reckhenrich y colaboradores evaluó el efecto de suturas quirúrgicas biodegradables que rellenaron con AMSC en muestras de piel humana donde se crearon heridas cutáneas de espesor completo y fueron cerradas mediante dichas suturas con un patrón intradérmico. Tras su evaluación demostraron que no se afectó la viabilidad celular, además observaron un incremento en la

actividad metabólica de las células a los 8 días, lo que sugiere un incremento en la proliferación celular y que las AMSC incluidas en la sutura liberaban sustancias clave que interfieren en el proceso de angiogénesis, inmunomodulación y remodelación tisular (Reckhenrich et al., 2014).

Las AMSC son interesantes como terapia en heridas cutáneas de múltiples orígenes gracias a su fácil extracción en grandes cantidades y a su gran capacidad de recuperación (Hassan et al., 2014). Dichas células estimulan la cicatrización cutánea mediante su diferenciación en células de piel endógenas, estimulando la migración de células epiteliales y la proliferación de fibroblastos, promoviendo la angiogénesis, liberando citoquinas y factores de crecimiento y reduciendo la formación de cicatriz, además como sabemos las podemos aplicar o bien de forma tópica en formas de gel o inyectadas directamente (Tartarini and Mele, 2015).

Problemas asociados al uso de MSC como terapia terapéutica

Existe gran controversia con respecto al posible efecto carcinogénico de las MSC, encontramos estudios que sugieren la existencia de una relación entre las MSC y su transformación en células malignas in vitro o inicio de cáncer in vivo (Crowder et al., 2013; Torsvik and Bjerkgvig, 2013; Liu et al., 2016). Aunque es muy probable que la mayoría de estos efectos observados se debiesen a una contaminación cruzada de las muestras de MSC con líneas celulares tumorales (Nicolay et al., 2015). Por otra parte, existen diversos estudios que acreditan la capacidad de las MSC para suprimir la formación de tumores en el contexto de diferentes tipos de malignidad, resultando en una reducción del crecimiento del tumor y alterando la distribución de su ciclo celular (Ahn et al., 2015).

Por último, resulta extremadamente importante protocolizar el procesado de estas células, con respecto al medio de cultivo a emplear y forma de aislamiento, entre otras características para garantizar seguridad al paciente y poder reproducir un tratamiento efectivo (Korbling and Estrov, 2003).

MSC intravenosas

Las MSC pueden ser liberadas terapéuticamente mediante infusión sistémica y son capaces de llegar al lugar de la lesión o área inflamada (Kidd et al., 2009). Adicionalmente la inyección intravenosa de MSC ha demostrado producir efectos antiinflamatorios sistémicos mediante la liberación de diversas proteínas antiinflamatorias como el TNF- α -6 (Lee et al., 2009).

En un hospedador sin heridas la inyección de MSC de forma intravenosa desaparece rápidamente de la circulación e inicialmente son atrapadas por los pulmones. De 1-5 días post-inyección, las MSC comienzan a salir del pulmón y se alojan en hígado, bazo, riñones y médula ósea. Sin embargo, tras la administración intravenosa de las mismas células en un animal al que

se le han realizado heridas cutáneas las MSC, en un periodo inicial, se quedan atrapadas en el pulmón y a partir de día 1-3 las podemos encontrar en el lugar de la herida (Kidd et al., 2009). En un individuo sin heridas no encontramos rastros de las MSC tras 2-3 semanas post-inyección, en cambio en individuos con heridas un pequeño porcentaje de las MSC permanecen en el lugar de la herida durante un periodo de tiempo más prolongado contribuyendo al proceso de reparación cutánea mediante la secreción de varias citoquinas y la transdiferenciación de las mismas en tipos celulares específicos del tejido. Con lo que se concluye que las MSC se pueden administrar de forma intravenosa en pacientes con heridas cutáneas crónicas ya que estas son capaces de migrar desde la circulación hasta los lugares de inflamación y daño tisular, además la biodistribución y comportamiento de las MSC pueden ser controladas mediante técnicas de diagnóstico por imagen como son la resonancia magnética (Rustad and Gurtner, 2012). Dichas células presentan una potente propiedad angiogénica, por lo que sería interesante su aplicación en heridas con problemas de vascularización (Rustad et al., 2012).

Con respecto al tratamiento de heridas isquémicas, HU y colaboradores llevaron a cabo un estudio randomizado controlado para evaluar el efecto de la administración intravenosa de MSC en colgajos cutáneos a los que se les inducía una isquemia en ratas. En dicho estudio se evaluó la cicatrización cutánea midiendo el porcentaje de necrosis en los colgajos, la perfusión del colgajo y la fuerza tensil del injerto tras 14 días. Los colgajos cutáneos isquémicos tratados con MSC demostraron un porcentaje de necrosis significativamente menor que los controles, al principio del estudio (día 5) los colgajos tratados con MSC poseían una perfusión tisular significativamente mayor, además de una mejor fuerza tensil comparado con los controles. Adicionalmente mediante microscopía de fluorescencia se detectaron las MSC en las células epiteliales y endoteliales de los colgajos. Con lo que se consiguió una mayor supervivencia de los colgajos cutáneos y una mayor cicatrización cutánea (Hu et al., 2014).

MATERIALES y MÉTODOS

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

MATERIALES

La presente tesis doctoral está basada en la investigación sobre la aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y Células Madre Mesenquimales derivadas de Grasa en heridas cutáneas sobre un modelo experimental de conejo, siendo de gran importancia tanto en medicina humana como en veterinaria en el contexto de la medicina regenerativa como alternativa a los tratamientos convencionales de heridas cutáneas complicadas.

Se llevó a cabo un estudio experimental *in vivo*, aleatorio y controlado con placebo (suero salino fisiológico) en un modelo animal en el que se evaluó el efecto de la aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento, Células Madre Mesenquimales derivadas de Grasa, y la combinación de ambos sobre el proceso de cicatrización de heridas cutáneas realizadas en conejos mediante un procedimiento quirúrgico y en condiciones de asepsia. Las heridas cutáneas fueron evaluadas a distintos tiempos de estudio tanto a nivel macro como microscópico y mediante diferentes parámetros, que serán descritos a lo largo de esta sección.

Este proyecto experimental (tanto la manipulación de los animales como el protocolo de trabajo) ha sido aprobado por el Comité Ético y de Bienestar Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera, siguiendo las normas referentes al bienestar y experimentación animal (Real Decreto 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros Fines Científicos - Boletín Oficial del Estado del 21 de Octubre que adecúa la directiva Comunitaria 86/609/CEE).

Se incluyeron un total de 72 animales del mismo sexo y edad, que fueron divididos en 6 grupos diferentes de forma aleatoria en función del periodo de supervivencia, con el fin de poder realizar comparaciones entre e intragrupos.

Modelo Animal

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se optó por la elección del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal. Se emplearon un total de 72 hembras sanas procedentes de la Universidad Politécnica de Valencia, adultas y de raza Nueva Zelanda.

La necesidad de obtención de cantidades considerables de sangre para la obtención de Plasma Rico en Factores de Crecimiento autólogos (de cada conejo) y una cantidad de grasa adecuada (alrededor de 20 gramos) para la obtención de Células Madre Mesenquimales, hizo que nos inclinásemos a emplear el conejo como modelo animal para nuestro estudio y descartar animales más pequeños como la rata o el ratón, ya que estos suelen ser empleados para estudios en los que se aplica PRGF heterólogo y no autólogo debido a la imposibilidad de obtención de cantidades adecuadas de sangre. Adicionalmente el tamaño muestral elegido fue de 12 conejos por cada grupo experimental (6 grupos en total) para contrarrestar posibles diferencias entre individuos que pudiesen afectar a los resultados globales del estudio y a la vez poder conseguir resultados estadísticamente significativos.

La elección de este tipo de animales responde básicamente a las razones que se citan a continuación:

- Modelo animal ampliamente documentado.
- Elevada disponibilidad.
- Fácil manejo quirúrgico.
- Tamaño adecuado para la obtención de PRGF y AMSC.
- Poca variabilidad genética y hormonal.
- Amplia tolerancia de los medicamentos empleados.

Instalaciones

Los animales fueron estabulados durante 1 semana previa al inicio del estudio en las instalaciones de Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera en jaulas individuales para cada conejo para conseguir una buena adaptación de los mismos y minimizar su estrés lo máximo posible (Figura 4).

La fase experimental quirúrgica se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia, y una vez recuperados de la anestesia fueron alojados en las instalaciones de la granja docente de nuestra facultad.

Durante el periodo completo de estudio, los animales fueron alimentados con agua y pienso *ad-libitum*. Adicionalmente, fueron controlados diariamente mediante la evaluación de la condición física de cada animal, toma de temperatura y control de peso para así poder evaluar el estado de salud y detectar algún tipo de alteración que obligara a excluir a ese animal del estudio.

Figura 4: Estabulación de los animales en las instalaciones de la Granja Docente de la Universidad CEU Cardenal Herrera.



Criterios de inclusión

Previamente a la inclusión de los animales en el estudio, se realizó a cada uno de los animales un examen físico completo junto con una hematología y bioquímica sanguínea básica, con el objetivo de confirmar que los conejos no presentaran ninguna enfermedad concomitante que pudiese afectar al proceso de cicatrización de las heridas cutáneas y por lo tanto los resultados del estudio (Tabla 13). Cualquier animal que presentase alteraciones hematológicas, bioquímicas o signos de enfermedad durante la exploración física fue excluido del estudio.

Tabla 13: Parámetros hematológicos y bioquímicos evaluados en todos los animales.

Hematología	Bioquímica
Leucocitos (mil/ μ l)	Creatinina (mg/dl)
Eritrocitos (mill/ μ l)	Albúmina (mg/dl)
Hemoglobina (g/dl)	Calcio (mg/dl)
Hematocrito (%)	Amilasa (U/l)
MCV (fl)	CK (U/l)
MCH (pg)	Colesterol (mg/dl)
MCHC (g/dl)	ALP (U/l)
Plaquetas (mil/ μ l)	Fósforo (mg/dl)
Linfocitos (%)	GGT (U/l)
Monocitos (%)	Glucosa (mg/dl)
Eosinófilos (%)	AST (U/l)
Granulocitos (%)	ALT (U/l)
	CRP (μ /ml)
	Proteínas Totales (g/dl)
	Triglicéridos (mg/dl)
	Urea (mg/dl)
	Bilirrubina total (mg/dl)

MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; CK: creatinina-quinasa; ALP: fosfatasa alcalina; GGT: gama glutamil transpeptidasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanino aminotransferasa.

Criterios de exclusión

Como ya hemos comentado anteriormente, cada animal del estudio fue controlado diariamente desde la realización de las heridas experimentales hasta su sacrificio según el tiempo de supervivencia. En cada observación se valoró la ingesta de comida, el peso del animal, la actividad y actitud y el estado general del paciente. La exploración clínica se llevó a cabo empleando los siguientes parámetros indicadores de enfermedad o lesión (la valoración se realizó entre 0 y 3).

- **Peso.** Las variaciones puntuales de peso podrían deberse a la cantidad de ingesta en cada momento. Pérdida de peso constante en pocos días podría ser indicativo de enfermedad. Rango de valores: 0= normal, 1= <10% pérdida de peso, 2= 10-15% pérdida de peso, 3= >20% pérdida de peso.
- **Temperatura.** Las temperaturas rectales se tomaron de forma individual con el uso de termómetros digitales. Valoración: 0= temperatura normal y \pm 1°C sobre la media grupal, 1= temperatura $>$ ó $<$ de 1°C sobre la media grupal. En el caso de haber fallecido algún animal se tendría en cuenta que su temperatura puede oscilar sustancialmente durante las 24 horas previas a su fallecimiento.
- **Apariencia física.** Estado general. 0= Normal, 1= pérdida de acicalamiento, 2= pelo basto, secreción nasal / ocular, 3= Pelo muy áspero, postura anormal.


- **Comportamiento.** Actitud. 0= Normal, 1= Cambios mínimos, animal ligeramente apático, 2= Anormal, movilidad reducida o inactividad, 3= Vocalizaciones, automutilación, letárgico o inmóvil.



Una valoración superior a 4 en el cómputo total, de 2 en dos criterios o de 3 en un solo criterio, era motivo de exclusión del animal y eutanasia del mismo.

La aparición de infección no controlable en la zona de estudio, la lesión grave en la zona, así como las alteraciones graves del estado general (pérdida de peso grave, infección general grave, lesiones traumáticas graves, por ejemplo fracturas, u otro tipo de alteraciones que puedan afectar al desarrollo general del procedimiento), fueron causa de exclusión del animal. En estos casos se procedió al sacrificio del mismo con los métodos que se comentan más adelante.

A continuación, pasamos a detallar los equipos, material fungible y fármacos empleados a lo largo del presente estudio

Equipos

<p>Centrífuga PRGF (Centrífuga BTI PRGF SYSTEM®, Vitoria, España).</p>		<p>Centrífuga (Centrífuga P Selecta®, JP Selecta S.A, Barcelona, España).</p>	
<p>Máquina de hematología sanguínea (Celltac α hematology analyzer® 6318 J/K NIHON KOHDEN, Japan).</p>		<p>Máquina de Bioquímica sanguínea (Metrolab 2300®, Random Access Clinical Analyzer, Buenos Aires, Argentina).</p>	
<p>Cabina de flujo laminar vertical con seguridad biológica clase II (Telsar Bio II A, Telsar Life Science Solutions, Barcelona, España).</p>		<p>Máquina de Anestesia (Datex Ohmeda, Court Louisville KY, USA)</p>	
<p>Centro de inclusión de tejidos (Leica EG1160, Leica biosystems, Barcelona, España)</p>		<p>Microtomo Microtomo rotatorio, Leica Biosystems, Barcelona, España)</p>	

<p>Robot automático de tinción (Autostainer Link 48, Dako, Barcelona, España)</p>		<p>Escaner digital muestras (Pannoramic digital slide scanner, 3D HISTECH, Budapest, Hungary)</p>	
--	---	--	---

Soluciones y fármacos

<p>Clorhexidina en solución (Desinclor[®], Clorhexidina Digluconato 5%, AGB, Madrid, España).</p>		<p>Clorhexidina jabonosa (Desinclor[®], Clorhexidina Digluconato 4%, AGB, Madrid, España).</p>	
<p>Alcohol etílico 96° (Alcohol 96° Cidar[®], Murcia, España).</p>		<p>Cloruro cálcico (CaCl₂[®], B-Braun, Melsungen, Alemania)</p>	
<p>Ketamina (Imalgene 100mg/ml Merial)</p>		<p>Dexmedetomidina (Dexdomitor[®], 0,5mg/ml Esteve Veterinaria, Madrid, España).</p>	
<p>Morfina (Cloruro mórfico 2%[®], B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>		<p>Sevoflurano 100% (Sevoflo[®], Esteve Veterinaria, Barcelona, España).</p>	
<p>Cefovecina sódica (Convenia 80mg/ml, Zoetis, Bélgica)</p>		<p>Meloxicam inyectable (Metacam[®] 5 mg/ml, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania).</p>	
<p>Tinción Hematoxilina-Eosina (Dako, Barcelona, España)</p>		<p>Tinción Tricrómico de Masson (Dako, Barcelona, España)</p>	

Material fungible

<p>Tubo de EDTA 0,5 ml (AQUISEL® K3E/EDTA 3K, AQUISEL, Barcelona, España).</p>		<p>Tubos Heparina Sódica 1 ml (AQUISEL®, LH/Li HEPARIN, AQUISEL, Barcelona, España).</p>	
<p>Tubos Eppendorf.de 1,5 ml (Eppendorf®, Alvet Plus, S.L, Valencia, España).</p>		<p>Tubos citrato sódico (P.R.G.F. Collection tube. Sodium citrate 3,8%. BTI®, Vitoria, España).</p>	
<p>Agujas de 20G y 25G (Sterican®, B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>		<p>Tubos estériles (PRGF) Fractionation tube no aditive®, BTI, Vitoria, España).</p>	
<p>Jeringuillas de 1 ml (Jeringas hipodérmicas Injekt. B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>		<p>Adaptador macho-macho (Combifix-adapter®, B- Braun, Melsungen, Alemania).</p>	
<p>Puntas estériles con filtro (BiosphereR Filter Tips®, SARSTEDT, USA).</p>		<p>Palomillas (Venifix®, B- Braun, Melsungen, Alemania).</p>	
<p>Micropipeta de 1000 µL (Exacta®, Madrid, España).</p>		<p>Micropipeta de 200 µL (Exacta®, Madrid, España).</p>	
<p>Portamuestras (Cassettes, Diapath, Italia).</p>		<p>Tubos sin anticoagulante (BD. Vacutainer®, Plymouth, UK).</p>	

Esponja de Poliuretano
(Mepilex border Ag®
Molnlycke Health Care,
Madrid, España).



Sutura Poligluconato
(Monosyn 3/0, Braun,
Barcelona, España)



MÉTODOS

Diseño experimental

Grupos de estudio

Se llevó a cabo un estudio experimental controlado con un total de 72 conejos adultos hembra procedentes de granja controlada. Los animales se dividieron de forma completamente aleatoria en 6 grupos de estudio en función del período de supervivencia de los mismos (1, 2, 3, 5, 7 y 10 días), obteniendo un total de 12 conejos por grupo. Tras el periodo de aclimatación de 1 semana, se procedió a la realización bajo anestesia general de cuatro heridas cutáneas en cada uno de los conejos, cuyo proceso será detallado con posterioridad, y se procedió a la infiltración de cada una de las heridas con uno de los tratamientos a estudiar:

- **Grupo AMSC. Herida 1:** Infiltración con Células Madre Mesenquimales derivadas de Grasa (AMSC).
- **Grupo AMSC+PRGF. Herida 2:** Infiltración con AMSC y Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFG).

- **Grupo PRGF. Herida 3:** Infiltración con PRGF.
- **Grupo PCB. Herida 4:** Infiltración con suero salino fisiológico (SSF).

En la tabla 14 se muestra la distribución final de los seis grupos de estudio en función del periodo de supervivencia de los animales. Destacar que todos los animales fueron infiltrados con el correspondiente tratamiento en una sola ocasión, y de manera intraquirúrgica.

Tabla 14: Distribución de conejos por grupo y tiempo de supervivencia.

GRUPO	NÚMERO	TIEMPO (días)	TRATAMIENTO
AMSC+PRGF1	12	1	AMSC+PRGF
AMSC1	12	1	AMSC
PRGF1	12	1	PRGF
PLACEBO1	12	1	SSF
AMSC+PRGF2	12	2	AMSC+PRGF
AMSC2	12	2	AMSC
PRGF2	12	2	PRGF
PLACEBO2	12	2	SSF
AMSC+PRGF3	12	3	AMSC+PRGF
AMSC3	12	3	AMSC
PRGF3	12	3	PRGF
PLACEBO3	12	3	SSF
AMSC+PRGF5	12	5	AMSC+PRGF
AMSC5	12	5	AMSC
PRGF5	12	5	PRGF
PLACEBO5	12	5	SSF
AMSC+PRGF7	12	7	AMSC+PRGF
AMSC7	12	7	AMSC
PRGF7	12	7	PRGF
PLACEBO7	12	7	SSF
AMSC+PRGF10	12	10	AMSC+PRGF
AMSC10	12	10	AMSC
PRGF10	12	10	PRGF
PLACEBO10	12	10	SSF

AMSC: Células Mesenquimales derivadas de Grasa, PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento

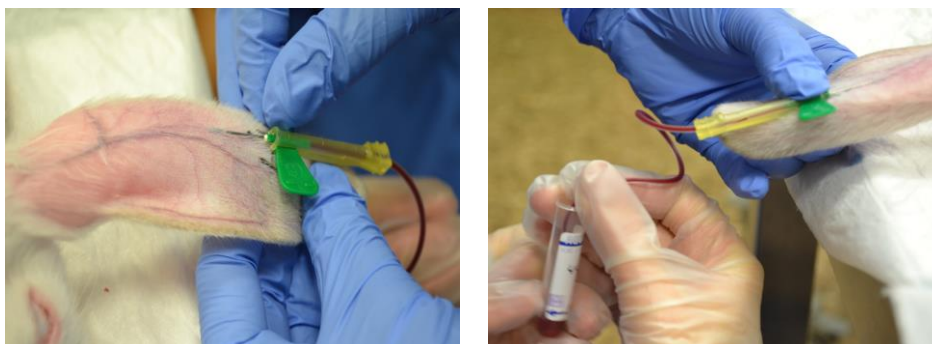
Preparación del paciente y procedimiento anestésico

Los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno tanto sólido como líquido de apenas 2 horas ya que ayunos más prolongados tienen efectos negativos sobre la funcionalidad digestiva de esta especie. Antes de iniciar la preparación del conejo, se procedió al pesaje e identificación en la cara interna del pabellón auricular de cada uno de los animales.

Una vez pesados e identificados los animales se procedió a la sedación de los mismos mediante la inyección intramuscular de dexmedetomidina (10mcg/kg), Ketamina (20mg/kg) y morfina (0,2 mg/kg) en una única inyección en la musculatura lumbar. Transcurridos unos minutos desde la sedación, se obtuvieron muestras de sangre de la arteria auricular para la

realización de las hematologías y bioquímicas sanguíneas además de para la obtención de PRGF (Figura 5).

Figura 5: Obtención de muestras sanguíneas de la arteria auricular.



Tras la obtención de las muestras sanguíneas, se rasuró la zona dorsal toracolumbar y se preparó asépticamente para poder proceder a la realización de las heridas quirúrgicas (Figura 6).

Figura 6: Rasurado y desinfección de la zona quirúrgica.



Para el mantenimiento anestésico se empleó isoflurano vaporizado en oxígeno al 100% mediante mascarilla (Figura 7).

Figura 7: Anestesia inhalatoria mediante el empleo de mascarilla.



El protocolo analgésico postoperatorio consistió en la administración subcutánea de meloxicam a de 0,2mg/kg las primeras 24 horas y a 0,1mg/kg los 3 días posteriores minimizando al máximo el estrés inducido por el dolor en los animales y con ello, la afección en el proceso de cicatrización de las heridas.

Por último, los animales fueron tratados con una dosis única de cefovecina (8mg/kg) administrada de forma subcutánea para el control de posibles contaminaciones bacterianas a nivel superficial de las heridas. En la tabla 15 se muestra un resumen de el protocolo anestésico completo empleado en todos los animales.

Tabla 15: Protocolo anestésico empleado en los animales.

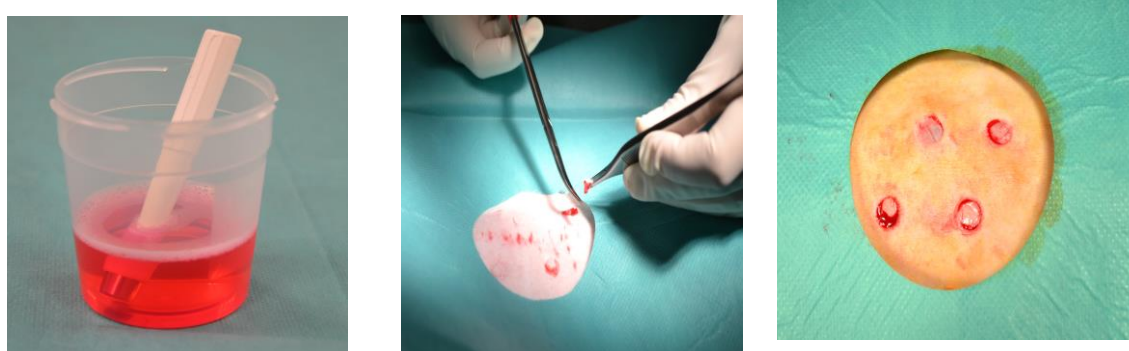
Anestesia o Sedación				
Manipulación Prevista	Compuesto	Vía	Dosis	Frecuencia
Herida experimental	Dexmedetomidina	IM	10mcg/kg	Dosis única
	Ketamina	IM	20mg/kg	Dosis única
	Morfina	IM	0,2mg/kg	Dosis única
	Sevoflurano	Inhalatoria	1,5%	Mantenimiento
Analgésia				
Manipulación Prevista	Compuesto	Vía	Dosis	Frecuencia
Post-anestesia	Meloxicam	SC	0,2 (0,1) mg/kg	Día 1 (2, 3 y 4)
	Cefovecina	SC	8mg/kg	Dosis única

Procedimiento quirúrgico

Con el objetivo de conseguir un defecto cutáneo lo más homogéneo posible, todas las heridas fueron realizadas por el mismo cirujano. Para la realización de las mismas se empleó un punch de biopsia de 8mm, garantizando la obtención de heridas homogéneas y de forma rápida.

En cada animal se realizaron cuatro heridas quirúrgicas de espesor completo en la zona dorsal toracolumbar a ambos lados de la línea media con una separación entre heridas de 20mm para evitar la aparición de interacciones entre tratamientos con el fin de aplicar distintos tratamientos y poder establecer diferencias intra y entre individuos. La disección del colgajo cutáneo se realizó con tijeras de disección y pinzas atraumáticas (Figura 8).

Figura 8: Procedimiento quirúrgico y aspecto final de las heridas cutáneas.

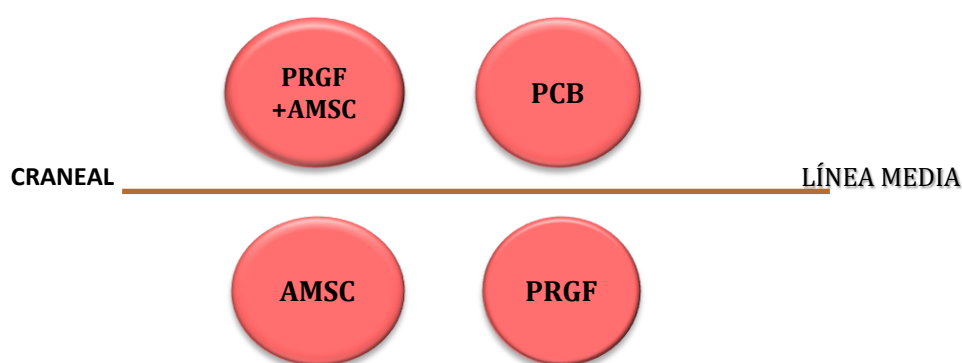


Cada una de las heridas fué infiltrada de forma perilesional en cuatro puntos cardinales (0,02 ml por punto) y los 0,02ml restantes en la superficie de la herida, sumando un total de 0,1ml administrados de PRGF y otros 0,1ml de AMSC.

De forma que las heridas quedaron de la siguiente manera (Figura 8 y 9):

- **Herida 1:** Infiltrada de forma perilesional con 0,1ml de AMSC (La herida más craneal).
- **Herida 2:** Infiltrada de forma perilesional con 0,1ml de AMSC y 0,1ml de PRGF.
- **Herida 3:** Infiltrada de forma perilesional con 0,1ml de PRGF.
- **Herida 4:** Infiltrada de forma perilesional con 0,1 de de suero salino fisiológico (herida placebo, y la herida más caudal).

Figura 9: Distribución de heridas cutáneas experimentales en función del tratamiento administrado.



PRGF: Plasma Rico en factores de Crecimiento, AMSC: Células Mesenquimales Derivadas de Grasa, PCB: Placebo (suero salino fisiológico).

Al finalizar el procedimiento quirúrgico todas las heridas fueron cubiertas con un apósito de esponja de poliuretano para el control de exudados y el mismo se fijó a la piel mediante puntos simples con sutura poligliconato, finalmente para proteger las heridas se colocó un collar isabelino a cada uno de los conejos.

Tratamientos aplicados

PRGF

Obtención del PRGF

El procedimiento de obtención del PRGF se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera bajo sedación de los animales, minimizando el estrés por la manipulación de los mismos.

El PRGF aplicado en las heridas quirúrgicas de los conejos se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Anitua en el año 1999, siguiendo los pasos que se describen de forma detallada a continuación:

A. Extracción sanguínea: Se procedió a la extracción de 5ml de sangre de forma autóloga, es decir de cada conejo, y en todos los casos se realizó de la arteria auricular mediante el uso de palomillas verdes conectadas a un adaptador macho-macho y a una aguja de 20G. La sangre era recolectada en tubos de citrato sódico de 4,5ml que contenían 0,5 ml de anticoagulante (Figura 10).

Figura 10: Extracción sanguínea de la arteria auricular y recolección en tubos de citrato sódico.

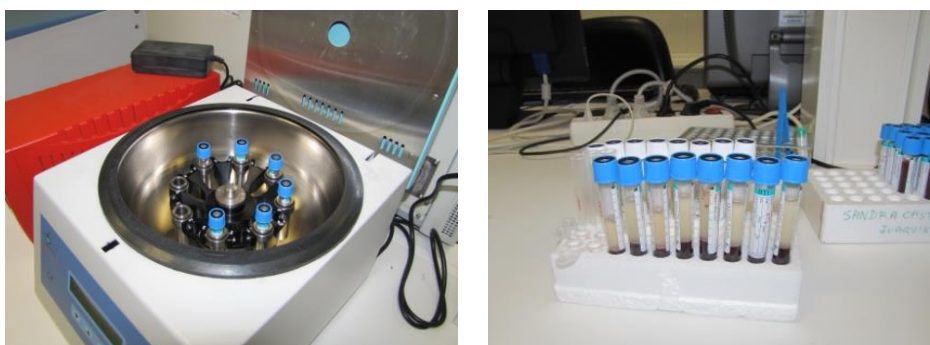


B. Centrifugación: A continuación, los tubos se sometieron a una única centrifugación a 460G durante 8 minutos en la centrífuga para PRGF. Esta centrífuga consta de un rotor oscilante a 90°, de modo que cuando comienza a centrifugar mantiene los tubos en posición horizontal. Esto hace que, tras el proceso de centrifugación, la interfase entre plasma y componente celular quede perfectamente horizontal, facilitando así el posterior proceso de pipeteo (Figura 11). Se optó por utilizar una única centrifugación a 460G durante 8 minutos en el conejo al igual que en humana ya que son numerosos los estudios publicados que demuestran la efectividad de estos parámetros en la obtención de PRGF en conejos (Soler, 2006; Lopez-Jornet et al., 2009; Molina-Minano et al., 2009b; Serra et al., 2013).

Tras la centrifugación, la sangre queda separada en tres fracciones bien diferenciadas:

- **Fracción 1 (superior):** que corresponde al plasma pobre en factores de crecimiento (PPGF): Los 60ul superiores por cada 100ul de plasma.
- **Fracción 2 (intermedia):** que es el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). Esta fracción plasmática está situada inmediatamente por encima de la serie roja y la serie blanca, posee alto contenido en plaquetas, unas tres veces el número de plaquetas presentes en la sangre periférica. Estas plaquetas se caracterizan por tener una mayor densidad comparándolas con las de otras fracciones, que por el centrifugado quedan más abajo. Se corresponde a los 40ul inferiores por cada 100ul de plasma, sin incluir el “Buffy coat”.
- **Fracción 3:** serie roja.

Figura 11: Centrifugación de las muestras y aspecto de las mismas tras la cetrifugación.



C. Pipeteado de fracciones: El procedimiento de extracción de las fracciones plasmáticas se realizó siempre por el mismo investigador. Se obtuvieron 2 tubos estériles de cada tubo recolectado, en el primero se introdujo la primera fracción, correspondiente al PPGF, y en el segundo el PRGF. Se recomienda no tocar nunca la “*buffy-coat*” (fracción blanca), para ello, se emplea la micropipeta de 1000 μ L para la primera fracción y la de 200 μ L para la segunda, con puntas estériles con filtro. Dicho procedimiento se llevó a cabo en máximas condiciones de esterilidad bajo una cabina de flujo laminar (Figura 12). Los accesorios que entraron en contacto con el PRGF, entre ellos pipetas regulables y puntas de pipetas, estaban previamente esterilizados. El respeto de las normas de asepsia, para evitar así la contaminación bacteriana del PRGF, era esencial a la hora de realizar estos procedimientos. También era fundamental manipular los tubos, una vez centrifugados, siempre en posición vertical y con cuidado de no someterlos a movimientos bruscos que pudiesen mezclar las diferentes interfases.

Figura 12: Obtención de las diferentes fases plasmáticas y pipeteado bajo campana de flujo laminar de las mismas.



D. Activación del PRGF: Una vez obtenido el PRGF (fracción más rica en densidad plaquetaria) e inmediatamente antes de la inoculación, se activó con el 5% del volumen de Cloruro Cálcico al 10% con el fin de lograr la degranulación de las plaquetas permitiendo la liberación de los factores de crecimiento (Figura 13).

Figura 13: Material empleado para la activación del PRGF.

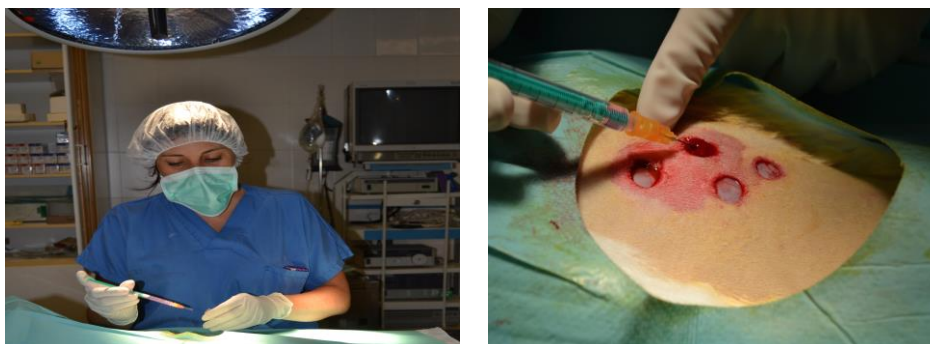


Aplicación del PRGF

Tal y como hemos comentado en la revisión bibliográfica, existen diversas formas de realizar las aplicaciones del PRGF en heridas cutáneas. Algunos estudios planteaban la aplicación tópica en forma de gel, otros la infiltración del mismo de forma perilesional y otros incluso de forma intravenosa (Crovetti et al., 2004; Bing et al., 2007; Jee et al., 2016). En este estudio se optó por una única aplicación de PRGF activado en forma líquida mediante la infiltración perilesional de un total de 0,1ml del mismo alrededor de la herida cutánea de forma subcutánea, dicha infiltración se realizó mediante el uso de una jeringuilla de insulina de 1ml y una aguja de 25G naranja.

Tras la activación del PRGF con el 5% de cloruro cálcico se procedió a su infiltración perilesional en 4 puntos cardinales en las heridas cutáneas número 2 y 3 (Figura 14).

Figura 14: Infiltración perilesional del PRGF en heridas cutáneas correspondientes.



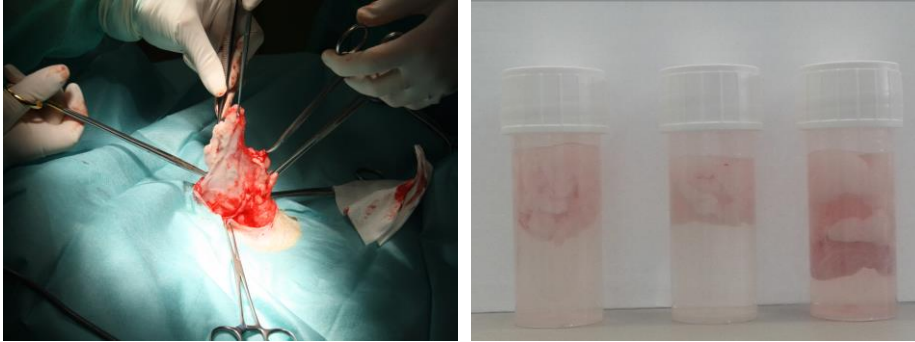
AMSC

Obtención de las AMSC

Las AMSC son células derivadas del tejido graso. En este trabajo no se han empleado células autólogas, por lo que se realizó una biopsia, en la que se obtuvo una gran cantidad de tejido graso de un conejo donante procedente de la misma granja, 15 días antes de la realización del procedimiento experimental quirúrgico, se premedicó al animal siguiendo el mismo protocolo anestésico empleado durante el procedimiento quirúrgico experimental y se rasuró de forma bilateral la zona inguinal y la zona ventral del cuello, para la realización de la biopsia grasa de manera aséptica.

A continuación, se procedió a la extracción de un total de 20 ml de sangre entera bajo condiciones de esterilidad de la vena yugular externa. Seguidamente, bajo condiciones de máxima esterilidad y anestesia general se realizó la biopsia de la zona inguinal del tejido adiposo (mínimo 10 gramos de tejido adiposo subcutáneo). El tejido graso empleado para el cultivo fue el de la región inguinal, por lo que el tipo de AMSC que infiltrábamos eran AMSC alogénicas, obtenidas a partir de grasa de otro animal pero de la misma especie (Figura 15).

Figura 15: Procedimiento quirúrgico para la obtención de biopsias de tejido graso inguinal, y almacenamiento de las mismas en recipientes estériles.

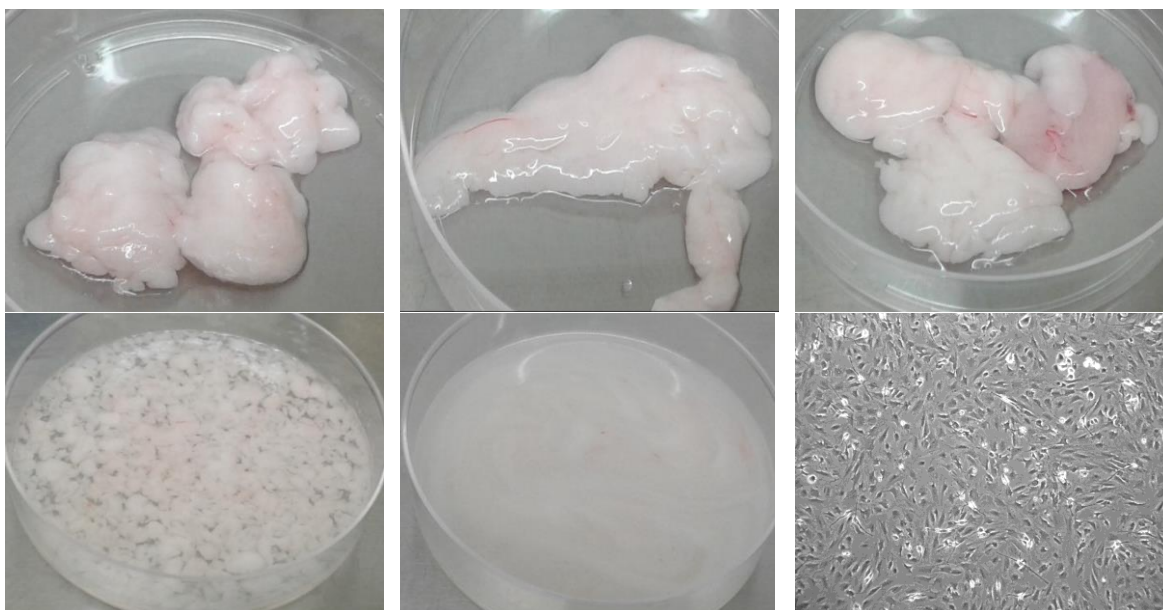


Un total de 31,3 gramos de tejido adiposo fueron recolectados por el cirujano en tres tomas diferentes. Dichas muestras fueron alojadas en tres tubos estériles los cuales contenían suero salino estéril. Tras la obtención de las muestras, tanto de la sangre como del tejido adiposo, se transportaron al laboratorio del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) en cajas refrigeradas a 4°C, donde se realizó el aislamiento y cultivo de las AMSC.

Las muestras se lavaron con tampón fosfato salino junto con diversos antibióticos para limpiar las muestras de grasa y eliminar posibles residuos. Fueron distribuidas a 10 gramos de tejido adiposo por cada placa de Petri (tres en total), y fueron sumergidas en una solución que contenía tampón fosfato salino, penicilina, estreptomina, colagenasa tipo 1-A, y dispasa. Adicionalmente, el tejido graso fue cortado con tijeras quirúrgicas estériles en pequeños trozos manualmente y sometido a un proceso de digestión durante toda la noche. Al día siguiente se recolectó el tejido digerido y se cultivó en suero autólogo del propio conejo hasta obtener un millón de células por gramo de tejido adiposo. Posteriormente las AMSC se aislaron y se amplificaron en cultivos celulares.

Para el aislamiento del suero autólogo, se obtuvo un total de 20ml de sangre entera del mismo conejo del que obtuvimos la grasa, a través de la vena yugular externa. Tras la coagulación de la misma, se centrifugó la muestra a 3000 revoluciones por minuto durante 8 minutos, y por último se pipeteó el suero, el cual era necesario para el cultivo de las AMSC (Figura 16).

Figura 16: Procesamiento del tejido adiposo. Digestión, cultivo y amplificación de las AMSC.



Aplicación de las AMSC

Las AMSC fueron infiltradas el mismo día que se recibieron de forma perilesional en las heridas cutáneas correspondientes (heridas 1 y 2). Desde el laboratorio del CIPF nos enviaron viales independientes que contenían 0,1ml de medio de cultivo con un mínimo de un millón de células troncales viables en suspensión. Con lo que estaríamos infiltrando un mínimo de un millón de AMSC en cada una de las heridas correspondientes mediante el uso de una jeringa de insulina de 1ml y una aguja naranja de 25G.

Obtención y procesado de las muestras

Tiempo de sacrificio

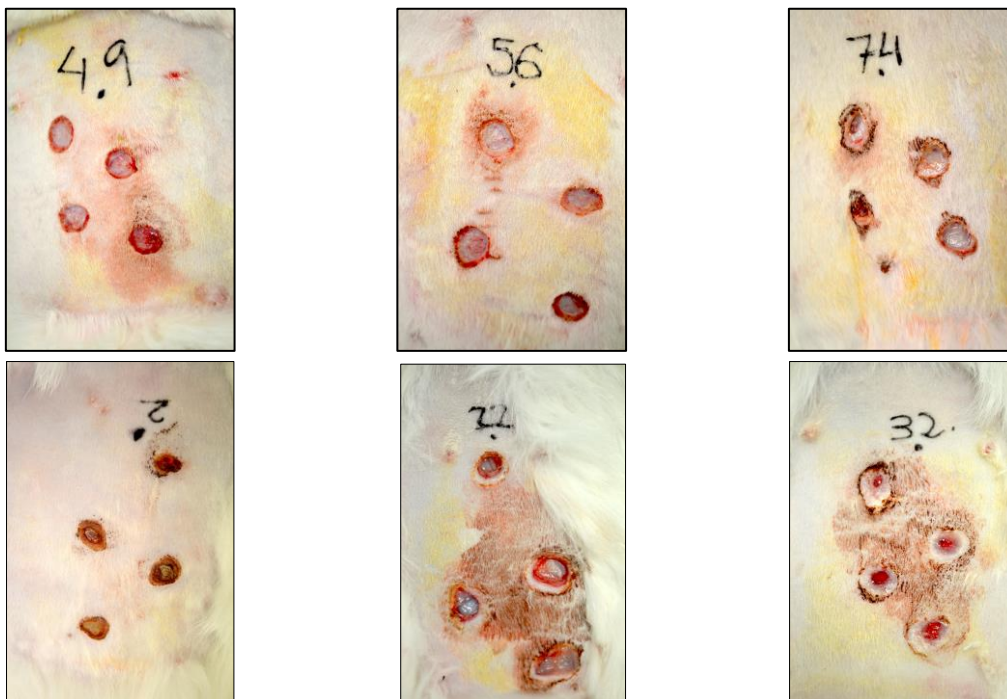
Los 72 animales fueron distribuidos de forma aleatoria en 6 grupos diferentes en función del periodo de supervivencia. Para la obtención de las muestras se procedió a la eutanasia de los mismos mediante el uso de pentobarbital sódico administrado de forma intracardiaca posteriormente a la sedación de los animales con dexmedetomidina, ketamina y morfina a las dosis habituales. Los tiempos de estudio según la fecha de sacrificio se detallan a continuación:

- **Tiempo 1:** 12 Animales (sacrificados 24 horas tras el estudio experimental).
- **Tiempo 2:** 12 Animales (sacrificados 48 horas tras el estudio experimental).
- **Tiempo 3:** 12 Animales (sacrificados 72 horas tras el estudio experimental).
- **Tiempo 5:** 12 Animales (sacrificados 5 días tras el estudio experimental).

- **Tiempo 7:** 12 Animales (sacrificados 7 días tras el estudio experimental).
- **Tiempo 10:** 12 Animales (sacrificados 10 días tras el estudio experimental).

Tras el sacrificio de los animales a sus correspondientes tiempos de supervivencia, se procedió a la valoración macroscópica de cada herida. Paralelamente, a su vez, se tomaron fotografías de alta calidad de cada una de las lesiones para su posterior estudio digital en detalle (Figura 17).

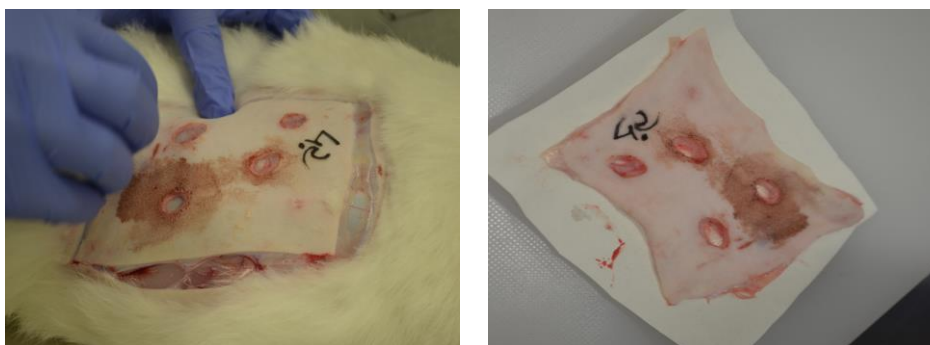
Figura 17: Aspecto macroscópico de las heridas a distintos días de estudio (de izquierdas a derechas y de arriba abajo: día 1, día 2, día 3, día 5, día 7, día 10).



Procesado microscópico

En primer lugar, una vez eutanasiado el animal, se recortaron las heridas en bloque dejando un margen de piel sana para no dañar las mismas, mediante la ayuda de un bisturí, y de tijeras de corte, para su posterior procesado y estudio microscópico en el centro de investigación del príncipe felipe (Figura 18).

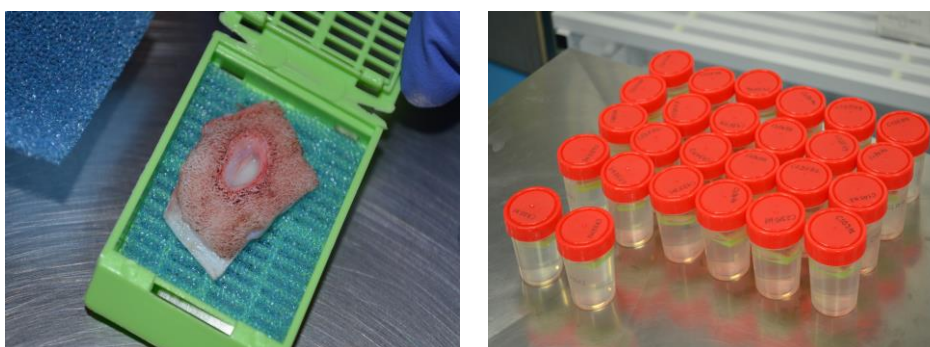
Figura 18: Obtención de las heridas cutáneas para el estudio microscópico.



Cada una de las heridas cutáneas se cortó individualmente y se introdujeron en cassettes verdes y los mismos en botes que contenían formaldehído para la conservación de las muestras hasta su posterior estudio anatomopatológico (Figura 19). Tanto los botes como los cassettes fueron identificados correctamente, siguiendo la siguiente codificación:

- **C** (Conejo) **D** (Día) **H** (Herida): Los conejos se enumeraron del 1 al 72, los días son los días de estudio (sacrificio) día 1,2,3,5,7 y 10, y heridas tenemos herida 1 (AMSC), herida 2 (AMSC+PRGF), herida 3 (PRGF), y herida 4 (Placebo).
- Ejemplo: C39D1H2.

Figura 19: Conservación de muestras en formaldehído dentro de cassettes e identificación de las mismas para su estudio anatomopatológico.



Tras la correcta identificación y almacenamiento de todas las muestras se trasladaron al CIPF para su estudio anatomopatológico. Con lo que una vez allí, las muestras fueron talladas e incluidas en bloques de parafina. Se obtuvieron entre 3 y 4 cortes de cada una de las heridas, siempre uno de ellos correspondía al centro de la herida, y los otros 2 a la periferia de la misma. Posteriormente los bloques de parafina se tallaron en el micrótopo para conseguir las preparaciones histológicas que fueron evaluadas con posterioridad.

Evaluación de las muestras

Estudio macroscópico

Mediante las fotografías digitales obtenidas se evaluó el aspecto del tejido de reparación y diversos parámetros visuales y morfométricos, de manera ciega tanto al día 1, como al día 2, 3, 5, 7 y día 10. Los parámetros evaluados se basaron en los empleados por Oppenheimer en el año 2010 en un estudio experimental llevado a cabo en piel de conejos (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010).

Los parámetros evaluados macroscópicamente en el presente estudio fueron los siguientes:

- **Grado de curación/cicatrización de la herida:** Dicho parámetro se expresó en porcentaje, por lo que se evaluó el porcentaje de cicatrización de la herida, y se le otorgó un valor del 0-100%.

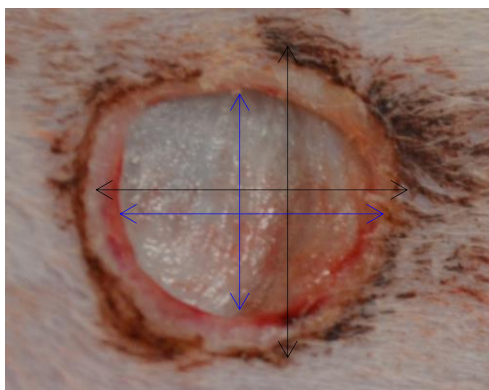
Para el cálculo de dicho valor, se realizó lo siguiente: Sobre las fotografías de las heridas, se tomaron dos medidas de los ejes mayores (los más largos), es decir de borde a borde de la herida, y se realizó la media entre estos dos valores (Medida A). A continuación, se tomaron dos medidas más de los ejes menores (los más cortos), y una vez más se obtuvo la media de ambos valores (Medida B), dichas medidas se muestran representadas en la Figura 20.

De forma que la ecuación para calcular el porcentaje de cicatrización de cada una de las heridas sería la siguiente:

$$\text{Medida A (media)} - \text{Medida B (media)} = \text{Medida C}$$

$$\text{Medida C} * 100 / \text{Medida A} = \% \text{ Cicatrización}$$

Figura 20: Cálculo del porcentaje de cicatrización de las heridas en la valoración macroscópica.



Flechas en negro marcan las medidas A (eje mayor), las flechas azules marcan las medidas B (eje menor).

- **Presencia o ausencia de Infección:** Dicho parámetro fue evaluado de forma subjetiva en función del aspecto externo de la herida, es decir, mediante la presencia de exudados verdoso/amarillentos y mal olor. La valoración numérica otorgada a este parámetro fue la siguiente:
 - 0: Presencia de infección.
 - 1: Ausencia de infección.
- **Color de la cicatriz:** Valorado por la siguiente escala numérica del 1-5:
 - 1: Hiperpigmentada (color negruzco – con costra).
 - 2: Pigmentada (rojo oscuro/grisácea).
 - 3: Roja.
 - 4: Casi normal (amarilla/rosácea).
 - 5: Normal (blanca).
- **Grosor de la cicatriz:** Valorado con una escala numérica del 1 al 4:
 - 1: Queloide.
 - 2: Cicatriz hipertrófica.
 - 3: Casi normal.
 - 4: Normal.
- **Retracción de la cicatriz:** Valorado con una escala numérica del 1 al 3:
 - 1: Muy retraída.
 - 2: Retracción media.
 - 3: No retraída.

Todos estos datos se recopilaron para cada herida y cada conejo en una plantilla de Spss para su posterior estudio estadístico.

Estudio microscópico

Las imágenes histológicas fueron escaneadas para poder ser observadas y manipuladas en el visor de imágenes Panoramic Viewer (3DHISTECH). Se llevaron a cabo tinciones de las muestras tanto con Hematoxilina-Eosina como con Tricrómico de Masson.

Tinción Hematoxilina-Eosina

Todas las heridas de cada uno de los conejos fueron teñidas con la tinción Hematoxilina-Eosina. Dicho procedimiento fue llevado a cabo en el laboratorio del CIPF. Con la presente tinción, nuestro objetivo era el de valorar los siguientes parámetros:

- Porcentaje de epitelización.
- Evaluación de la inflamación.

Para la medición y valoración de todos estos parámetros se tomaron fotografías de las áreas interesadas de las muestras con el programas Panoramic Viewer y, a continuación, fueron procesadas y en los casos que correspondía medidas en el programa Image Pro Plus.

Porcentaje de Epitelización

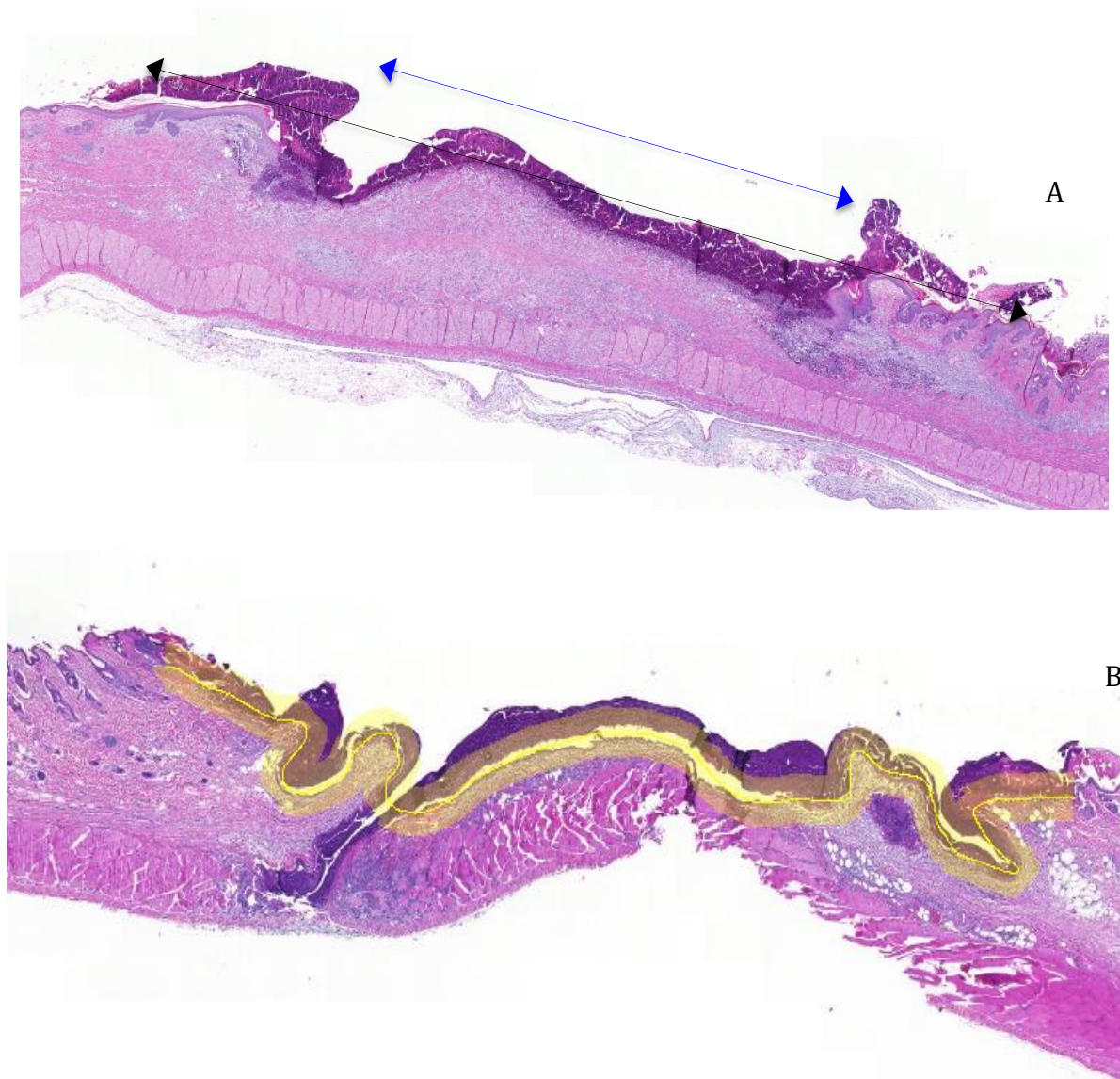
Se tomaron imágenes de los cortes correspondientes al centro de la herida en todos los casos. El porcentaje de epitelización a nivel microscópico se calculó de forma objetiva, las imágenes obtenidas con el programa Panoramic Viewer se centraron en la zona de la dermis superficial y del epitelio, de forma que englobáramos en la imagen toda la extensión de la herida (de un borde al otro), para ello empleábamos unos aumentos de 1X. Para la toma de medidas, empleamos el programa Image Pro Plus, con lo que en primer lugar, trazábamos una línea a mano alzada desde un borde a otro del epitelio de la herida original (Medida A), y a continuación tomábamos una segunda medida del hueco “gap” de la herida (Medida B). Dicha técnica se muestra en la figura 21.

La ecuación empleada para el cálculo del porcentaje de epitelización fue la siguiente:

$$\text{Medida A} - \text{Medida B} = \text{Medida C}$$

$$\text{Medida C} * 100 / \text{Medida A} = \% \text{ Epitelización}$$

Figura 21: Cálculo del porcentaje de epitelización de las heridas en la valoración microscópica (Destacar que las trazadas de las líneas se realizaron a mano alzada y no en línea recta (imagen A), tal y como se muestra en la imagen B).



La flecha negra muestra la medida A (calibre de la herida original), la flecha azul muestra la medida B (espacio que queda tras la nueva epitelización "gap"). Los límites de la medida A se toman como el comienzo del engrosamiento del epitelio (lo que indica formación de nuevo epitelio).

La importancia de emplear la opción de mano alzada para trazar las medidas A y B recae sobre la variabilidad en forma que existe en los distintos cortes del epitelio de la piel, de esta forma conseguimos valores mucho más precisos y por lo tanto con un menor margen de error.

Evaluación de la respuesta Inflamatoria

Para evaluar la respuesta inflamatoria nos basamos exclusivamente en la dermis de cada una de las muestras, tanto la dermis superficial como la dermis profunda. Valoramos toda la

extensión de la herida (de borde a borde) con el visor de imágenes Panoramic viewer, obviando la zona de la costra que aparecía por encima de la herida en algunas ocasiones, ya que aquí se acumulan grandes restos celulares y células inflamatorias muertas. Las muestras se evaluaron a un aumento de 20X lo suficiente para que nos permitiese diferenciar el infiltrado inflamatorio y sin necesidad de diferenciar entre tipos celulares. Valoramos dos parámetros distintos para evaluar el proceso inflamatorio en las distintas heridas tratadas:

- **Intensidad del proceso inflamatorio:** Dicho parámetro fue evaluado de forma semicuantitativa, basándonos en un método modificado ya publicado por Lowry y colaboradores (Lowry et al., 2001) el cual también evalúa la respuesta inflamatoria en conejos aunque en aplicaciones de sustancias en piel totalmente diferentes y igualmente empleado por José Andrés Fernández en su tesis doctoral (Fernández, 2012). A continuación se expone en la tabla 16 la información relevante y la escala numérica otorgada en función de la valoración:

Tabla 16: Escala semicuantitativa de la intensidad de reacción inflamatoria.

Descripción histológica	Valor (0-4)
Ausencia de reacción inflamatoria	0
Ligero infiltrado inflamatorio	1
Grado de inflamación fuerte	2
Grado de inflamación severa	3

- **Distribución del proceso inflamatorio:** Para la valoración de la distribución de la reacción inflamatoria nos centramos en el área de la dermis, y valoramos en cada herida las posibles tres opciones siguientes que se muestran en la tabla 17 con su correspondiente valor numérico:

Tabla 17: Escala semicuantitativa de la distribución de la reacción inflamatoria.

Descripción histológica	Valor (1-3)
Focalizada bajo la epidermis	1
Difusa bajo la epidermis	2
Ambas opciones	3

Tinción Tricrómico de Masson

Cada uno de los cortes tomados de las heridas de los conejos fueron teñidas con la tinción Tricrómico de Masson, una vez más al igual que con la tinción de Hematoxilina-Eosina, dicho

proceso fue llevado a cabo en el laboratorio del CIPF. Con la presente tinción pretendíamos valorar los siguientes parámetros:

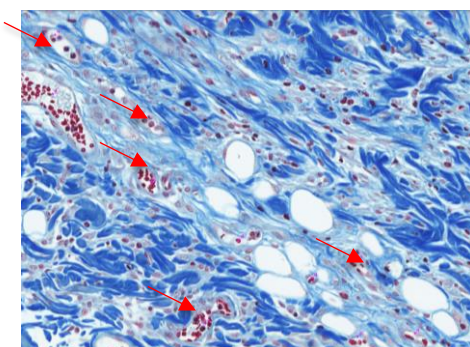
- Proceso de angiogénesis.
- Colágeno maduro.

Para la evaluación de ambos parámetros se tomaron imágenes de las áreas interesadas de cada una de las heridas en cada conejo mediante el visor de imágenes Pannoramic y posteriormente estas fueron procesadas en el programa Image Pro Plus.

Proceso de angiogénesis

El objetivo de la evaluación de la angiogénesis en nuestras muestras era la de valorar el proceso de neovascularización. Para dicha evaluación centramos nuestras imágenes en la dermis, y obtuvimos a unos aumentos de 20X un total de 6 imágenes por herida (3 imágenes de dermis superficial y 3 imágenes de la dermis profunda separadas a una distancia homogénea aproximada). Una vez obtenidas estas imágenes se procedía a realizar un conteo de todos los vasos de pequeño y mediano calibre que aparecían en las imágenes de forma que al obtener el total de vasos calculábamos la media de todos ellos para obtener un único dato final (Figura 22). En todos los casos se obviaba el conteo de vasos de gran calibre ya que se asumía que estos ya estaban presentes anteriormente, y por lo tanto no contribuían a formar parte de la evaluación de la neovascularización, es decir, de la nueva formación de vasos tras realizar las heridas cutáneas a los tiempos resaltados con anterioridad.

Figura 22: Evaluación de la angiogénesis: Las flechas rojas señalan vasos de mediano y pequeño calibre.



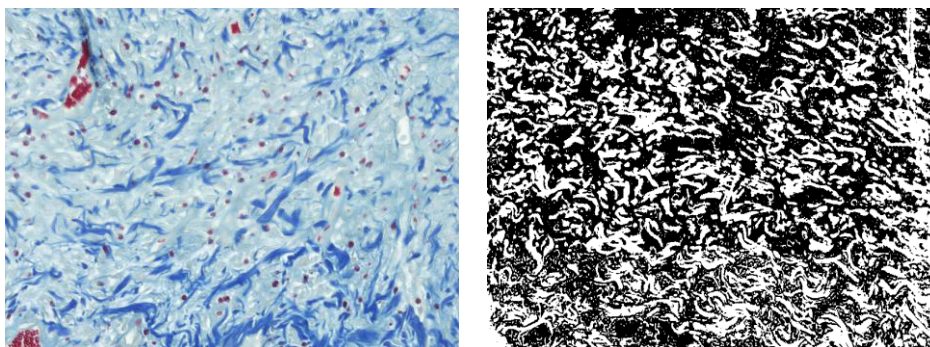
Evaluación del colágeno

Para la evaluación del colágeno nos centramos exclusivamente en la dermis. Evaluamos el colágeno de la herida, de forma que aprovechamos las imágenes obtenidas para la evaluación de la angiogénesis a 20X aumentos para la valoración de dicho parámetro.

Nuestro objetivo fue el de medir el área de colágeno maduro en cada una de las imágenes (6 por herida) expresando dicho área en porcentaje, para ello, con el programa Image Pro Plus

seleccionamos los tonos azules oscuros correspondientes al colágeno maduro los cuales queríamos medir y transformamos las imágenes en blanco y negro, de forma que los tonos azules oscuros seleccionados eran transformados en color blanco para su posterior medida del porcentaje de área seleccionada (Figura 23). Una vez medido el colágeno de cada imagen se calculaba la media de las seis imágenes para cada herida.

Figura 23: Imágenes tomadas para la evaluación del área de colágeno.



Estudio estadístico

Al finalizar el estudio, y una vez recopilados todos los datos de los parámetros evaluados, estos fueron analizados con el programa informático SPSS para Mac, versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA), tomando como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p < 0,05$, en todos los casos.

En primer lugar se realizó un estudio descriptivo simple utilizando tablas de frecuencias y gráficos de barras para las variables cualitativas y un estudio descriptivo de la media, desviación estándar, intervalos de confianza, máximo y mínimo y representación con gráficas de caja de las variables cuantitativas.

En todas las variables cuantitativas se comprobó la normalidad con el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene.

Se tomaron como parámetros a evaluar dos factores: el tiempo, comprobando las diferencias que existieron dentro de un mismo animal a lo largo del tiempo y observando así su evolución, y el factor tratamiento, comparando los resultados de cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de estudio. Para ello, se emplearon diferentes técnicas estadísticas:

Factor tiempo

Para estudiar la evolución de cada uno de los tratamientos se compararon los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de forma independiente para cada grupo de estudio.

En las variables categóricas se emplearon las tablas de contingencia y el coeficiente de contingencia o test exacto de Fisher según fuese necesario.

En las variables cuantitativas, una vez comprobada la normalidad y homogeneidad de las varianzas, en el caso de que las variables no cumplieran con la normalidad se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o el test U de Mann-Whitney para comparar estas variables en cada uno de los tiempos. En caso de variables normales se realizó un test de ANOVA con el posterior test posthoc de Tukey.

Factor Tratamiento

Para conocer si existían diferencias en el grado de cicatrización entre los 4 tratamientos, se comparó cada una de las variables en los diferentes tiempos de estudio, es decir, a día 1, 2, 3, 5, 7 y 10. Para comparar las variables cualitativas se empleó el test de χ^2 , coeficiente de contingencia o el test exacto de Fisher según la necesidad de cada una de las variables. En cambio, para las variables cuantitativas se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis o el test U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

RESULTADOS

En el presente apartado se relacionan los datos obtenidos durante la fase experimental en los diferentes protocolos, recogidos en tablas y figuras. Todos los resultados se expresan como la media y la desviación típica para todas las variables estudiadas. En todos ellos se ha tomado como diferencias estadísticamente significativas si $p < 0,05$.

Para una mejor exposición de los datos obtenidos en la presente investigación, el apartado de resultados se ha dividido en los siguientes puntos:

- Estudio descriptivo de los pacientes.
 - Criterios de exclusión e inclusión de animales en el estudio.
- Estudio descriptivo y comparativo del factor tiempo (estudio macroscópico y microscópico).
 - Grupo AMSC.
 - Grupo AMSC+PRGF.
 - Grupo PRGF.

- Grupo Placebo.
- Estudio comparativo del factor tratamiento (estudio macroscópico y microscópico).
 - Cicatrización cutánea.
 - Presencia / Ausencia de infección.
 - Color de la cicatriz.
 - Grosor de la cicatriz.
 - Retracción de la cicatriz.
 - Epitelización cutánea.
 - Intensidad inflamatoria.
 - Distribución de la reacción inflamatoria.
 - Angiogénesis.
 - Porcentaje de colágeno.

Descripción de los animales

Exclusión e inclusión de animales en el estudio

Para la realización de esta tesis doctoral se evaluaron un total de 72 animales repartidos en los diferentes tiempos de estudio. Previa a la fase experimental, se evaluó su estado de salud. En primer lugar se realizó una exploración física básica de cada uno de ellos para comprobar que ninguno de ellos presentaba signos evidentes de enfermedad, los animales fueron pesados de forma individual y se les tomó la temperatura. En segundo lugar y para corroborar los resultados del examen físico se les realizaron analíticas sanguíneas (Tabla 18 y 19).

Tabla 18: Valores hematológicos de los animales empleados durante la fase experimental.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
WBC	72	1,60	11,50	6,34	2,00
RBC	72	4,09	5,73	5,19	0,310
HGB	72	8,60	11,80	10,77	0,55
HTO	72	28,00	38,60	35,60	1,78
MCV	72	64,30	75,60	68,64	1,94
MCH	72	19,40	22,60	20,78	0,69
MCHC	72	29,20	31,30	30,27	0,46
PLT	72	33,00	473,00	295,15	83,52
RDW	72	11,90	16,30	13,05	0,71
PCT	72	,03	8,08	,21	0,94
MPV	72	2,30	9,90	3,38	0,95
PDW	72	16,40	21,50	18,37	1,25

N: tamaño de la muestra; WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; HTO: hematocrito MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración de hemoglobina corpuscular media; PLT: plaquetas; RDW: amplitud de distribución eritrocitaria; PCT: procalcitonina; MPV: volumen promedio de plaquetas; PDW: amplitud distribución de plaquetas.

Tabla 19: Valores bioquímicos de los animales empleados durante la fase experimental.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
ALB	72	3,27	4,35	3,67	0,32
FA	72	25	120	47,5	23,45
CREA	72	0,55	0,88	0,68	0,08
GLOB	72	1,45	2,44	1,88	0,27
GLU	72	119	196	155,33	21,73
GPT	72	25	63	44,88	10,91
PT	72	4,79	6,45	5,56	0,43
UREA	72	24,90	42,40	34,02	4,61

ALB: albúmina; FA: fosfatasa alcalina; CREA: creatinina; GLOB: globulinas; GLU: glucosa; GPT: transaminasa glutámico-pirúvica; PT: proteínas totales.

Todos los valores hematológicos y bioquímicos se encontraron dentro de la normalidad a excepción de los valores de glucosa que se encontraron ligeramente incrementados. Esta hiperglucemia se explica fácilmente por el estrés en la manipulación de los animales. Gracias a que encontramos todos los resultados dentro de sus rangos normales según la especie cunícula, pudimos confirmar que los animales cumplían con los criterios de inclusión del estudio (Kaneko et al., 1997; Feldman et al., 2000).

Para el control de los pacientes se registraba la temperatura y el peso diariamente. En los resultados de estos se observó una evolución positiva y constante a lo largo de todo el estudio, con temperaturas máximas de 39.5, no observando en ningún momento descensos bruscos, ni lo que es más importante incrementos notables de temperatura que pudieran indicar la presencia de infección. De la misma forma, el peso de los animales se mantuvo constante sin variaciones notables del mismo, lo que muestra un buen estado de salud por parte de los animales incluidos en el estudio y una ingesta diaria de comida y agua.

Destacar que uno de los animales falleció entre los días 2 y 3 postoperatorio debido a diarreas, por lo que se excluyó del estudio. Con lo que en 5 tiempos de estudio (Día 1, 2, 3, 5 y 7) incluyeron 12 conejos y el grupo 10 solo se incluyeron 11 conejos.

De manera que finalmente se evaluaron un total de 284 heridas (4 por conejo), las cuales fueron distribuidas según el tratamiento infiltrado y el tiempo de supervivencia como se muestra en la tabla 20.

Tabla 20: Distribución de las heridas en los animales en función del tiempo de supervivencia y del tratamiento recibido.

Eutanasia	1	2	3	5	7	10	Total
Grupo 1	12	12	12	12	12	11	71
Grupo 2	12	12	12	12	12	11	71
Grupo 3	12	12	12	12	12	11	71
Grupo 4	12	12	12	12	12	11	71
Total	48	48	48	48	48	44	284

Grupo AMSC: Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo

En la presente sección se exponen los datos obtenidos en el grupo AMSC de forma independiente en cada uno de los tiempos para las distintas variables estudiadas, junto con el análisis estadístico de los mismos que compara su evolución a lo largo de los tiempos estudiados (Día 1, 2, 3, 5, 7 y 10).

Estudio Macroscópico

El estudio macroscópico de las heridas cutáneas se llevó a cabo evaluando las siguientes variables (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010):

- Cicatrización cutánea.
- Presencia/ausencia de infección.
- Color de la cicatriz.
- Grosor de la cicatriz.
- Retracción de la cicatriz.

Cicatrización Cutánea

La evaluación de la cicatrización cutánea se llevó a cabo durante el estudio macroscópico, para la cual se tomaron diferentes medidas mediante el programa Image Pro Plus® como se ha detallado en el apartado de materiales y métodos. Dicho valor se expresó en forma de porcentaje. A continuación, en la tabla 21 se describen los resultados obtenidos en los distintos tiempos de estudio.

Tabla 21 : Evaluación de la cicatrización cutánea en las heridas del grupo AMSC.

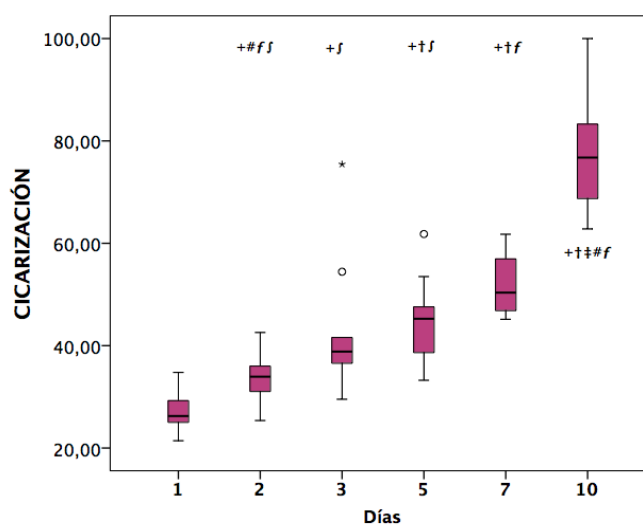
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	10	26,94	4,80	1,51	23,50	30,38	20,62	34,76
2	12	33,51	4,64	1,34	30,56	36,46	25,37	42,57
3	11	42,69	12,79	3,85	34,10	51,29	29,53	75,44
5	12	44,48	8,10	2,33	39,33	49,62	33,24	61,81
7	12	51,74	5,91	1,70	47,98	55,50	45,16	61,77
10	10	78,12	13,13	4,15	68,73	87,52	62,81	100
Total	67	45,93	17,88	2,18	41,56	50,29	20,62	100

Tras la descripción de los datos, se realizó un estudio comparativo entre cada uno de los tiempos de estudio como podemos observar en la tabla 22 y gráfica 1.

Tabla 22: Estudio comparativo entre tiempos del factor cicatrización cutánea en las heridas del grupo AMSC.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-6,29	7,10	2,25	-11,37	-1,21	-2,80	9	0,021
DIA1-DIA3	-15,30	10,32	3,44	-23,24	-7,36	-4,45	8	0,002
DIA1-DIA5	-18,39	11,43	3,62	-26,57	-10,21	-5,09	9	0,001
DIA1-DIA7	-24,50	8,58	2,71	-30,63	-18,36	-9,03	9	0,000
DIA1-DIA10	-48,54	12,19	4,06	-57,91	-39,17	-11,95	8	0,000
DIA2-DIA3	-8,99	13,82	4,17	-18,27	0,29	-2,16	10	0,056
DIA2-DIA5	-10,97	10,57	3,05	-17,69	-4,25	-3,59	11	0,004
DIA2-DIA7	-18,23	5,98	1,73	-22,03	-14,44	-10,57	11	0,000
DIA2-DIA10	-45,24	11,87	3,75	-53,73	-36,74	-12,05	9	0,000
DIA3-DIA5	-2,80	17,10	5,16	-14,30	8,69	-0,54	10	0,598
DIA3-DIA7	-8,33	14,77	4,45	-18,25	1,60	-1,87	10	0,091
DIA3-DIA10	-37,51	14,46	4,82	-48,62	-26,40	-7,79	8	0,000
DIA5-DIA7	-7,27	11,76	3,39	-14,74	0,21	-2,14	11	0,056
DIA5-DIA10	-33,42	16,57	5,24	-45,27	-21,57	-6,38	9	0,000
DIA7-DIA10	-26,26	11,64	3,68	-34,58	-17,93	-7,14	9	0,000

Gráfica 1: Evolución de la cicatrización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo AMSC en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
†† Diferencias con día 7. ††† Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

En este grupo de estudio se observó una cicatrización cutánea de las heridas infiltradas con AMSC muy rápida, positiva y constante en el tiempo desde el primer día hasta el día 10, en el cual prácticamente todas las heridas habían alcanzado entre el 80% y el 100% de cicatrización. Cabe destacar en particular el notable incremento del porcentaje de cicatrización entre el día 7 y el día 10, y de la cicatrización del 50% de la superficie de las heridas cutáneas que se alcanza entre los 5 y 7 días.

Presencia o ausencia de infección

Este parámetro fue evaluado como ya se ha comentado en el apartado de materiales y métodos de forma subjetiva, en función del aspecto general de las heridas. Siempre por el mismo investigador las heridas se clasifican como infectadas o no infectadas, y los resultados obtenidos se manifiestan en la tabla 23.

Tabla 23: Evaluación del porcentaje de infección en las heridas del grupo AMSC.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENCIA	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Como se puede apreciar, la tabla 23 muestra heridas libres de contaminación, por lo que todas las heridas infiltradas con AMSC fueron descritas como careedoras de infección. Como

resultado, y debido a la ausencia de infección en todas las heridas, no fue necesario realizar el estudio comparativo entre tiempos.

Color de la cicatriz

Los datos obtenidos en esta variable son el resultado de evaluar de forma subjetiva el aspecto externo de cada una de las cicatrices de las heridas y clasificarlas dentro de uno de los siguientes códigos:

- 1: Hiperpigmentada (si adquiría un color negruzco-costra).
- 2: Pigmentada (con color rojo oscuro incluso gris).
- 3: Roja.
- 4: Color casi normal (amarillento/rosa pálido).
- 5: Color normal de cicatriz .

Los resultados de esta variable se muestran en la tabla 24.

Tabla 24 : Evaluación del color de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC.

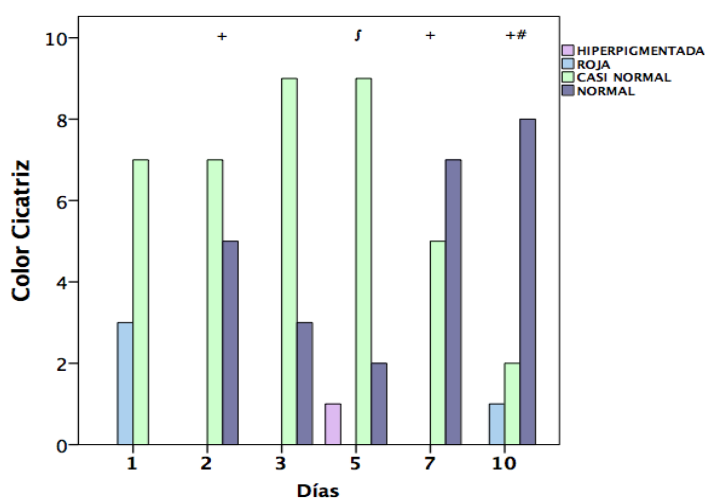
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
HIPERPIGMENTADA	Recuento	0	0	0	1	0	0	1
	%	0,00%	0,00%	0,00%	100,0%	0,00%	0,00%	100,0%
ROJA	Recuento	3	0	0	0	0	1	4
	%	75,0%	0,00%	0,00%	0,0%	0,00%	25,0%	100,0%
CASI NORMAL	Recuento	7	7	9	9	5	2	39
	%	17,9%	17,9%	23,1%	23,1%	12,8%	5,10%	100,0%
NORMAL	Recuento	0	5	3	2	7	8	25
	%	0,00%	20,0%	12,0%	8,0%	28,0%	32,0%	100,0%
TOTAL	Recuento	10	12	12	12	12	11	69
	%	14,50%	17,40%	17,40%	17,40%	17,40%	15,90%	100,00%

Tras la descripción de los resultados obtenidos, se realizó el estudio estadístico para evaluar las diferencias entre los distintos tiempos de estudio, que se muestran a continuación en la tabla 25 y en la gráfica 2.

Tabla 25: Estudio comparativo entre tiempos del factor color de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	34,02	15	0,003
Razón de verosimilitudes	34,18	15	0,003
Asociación lineal por lineal	6,68	1	0,01
N de casos válidos	69		

Gráfica 2: Evolución del color de cicatriz de las heridas del grupo AMSC en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
§ Diferencias con día 7. ¶ Diferencias con día 10.

Como podemos ver en los resultados obtenidos, comenzamos a observar cambios en el color de la cicatriz estadísticamente significativos en las heridas infiltradas con AMSC a partir del día 2 de estudio hasta el día 10 (a excepción del día 3). Conforme avanza el tiempo de cicatrización se aprecia un mayor número de cicatrices con una coloración casi normal y conforme vamos avanzando hacia el final del estudio, estas se van convirtiendo en cicatrices con un color semejante al de una cicatriz convencional.

Grosor de la cicatriz

En cuanto al grosor de la cicatriz en las diferentes heridas se evaluó mediante una escala numérica y de forma subjetiva, tal y como se muestra a continuación: las heridas que presentasen un aspecto externo de queloide recibían la calificación 1, la presencia de heridas hipertróficas un 2, las que presentaban un grosor casi normal un 3 y finalmente las que poseían un grosor normal semejante al de una cicatriz convencional un 4. La evolución del grosor de la cicatriz se muestra a continuación en la tabla 26.

Tabla 26 : Evaluación del grosor de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC.

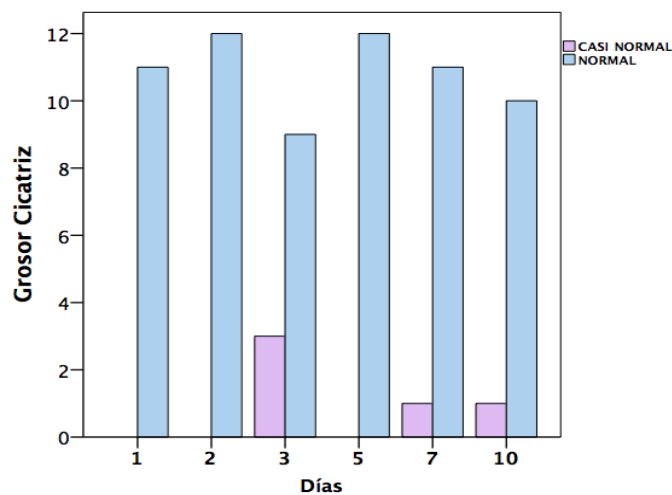
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
CASI NORMAL	Recuento	0	0	3	0	1	1	5
	%	0,00%	0,00%	60,00%	0,00%	20,00%	20,00%	100,00%
NORMAL	Recuento	11	12	9	12	11	10	65
	%	16,90%	18,50%	13,80%	18,50%	16,90%	15,40%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

La tabla 27 y la gráfica 3 muestran los resultados del estudio estadístico tras la comparación entre tiempos de dicho parámetro.

Tabla 27: Estudio comparativo entre tiempos del factor grosor de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,55	5	0,128
Razón de verosimilitudes	8,943	5	0,111
Asociación lineal por lineal	0,179	1	0,673
N de casos válidos	70		

Gráfica 3: Evolución del grosor de la cicatriz de las heridas del grupo AMSC en el tiempo.



Con referencia a la evaluación del grosor de la cicatriz, claramente no observamos diferencias significativas entre tiempos. Apreciamos cada vez una mayor cantidad de animales con una puntuación de “normal” con respecto al grosor de la cicatriz, con lo que la gran mayoría de las heridas infiltradas con AMSC no se ven afectadas por grandes cambios respecto al grosor de la cicatriz.

Retracción de la cicatriz

La retracción de la cicatriz una vez más fue evaluada mediante el uso de una escala numérica con diferentes categorías: cicatrices muy retraídas: 1, cicatrices moderadamente retraídas: 2, cicatrices no retraídas: 3. Los resultados de dicha variable se encuentran expuestos en la tabla 28.

Tabla 28: Evaluación del grosor de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENCIA	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Tal y como se aprecia en la anterior tabla, ninguna de las heridas infiltradas con AMSC a lo largo de los distintos tiempos de estudio presentó signos de retracción (ausencia de retracción), lo que hizo insignificante la realización del estudio estadístico comparativo entre tiempos.

Estudio Microscópico

El estudio microscópico se realizó mediante el uso de dos tinciones histológicas, la tinción con hematoxilina-eosina y la tinción con tricrómico de masson. Con la tinción hematoxilina-eosina se evaluaron los siguientes parámetros:

- Epitelización cutánea.
- Grado de inflamación.

En cambio, la tinción con tricrómico de masson, se empleó para evaluar los parámetros:

- Angiogénesis.
- Porcentaje de colágeno.

Epitelización Cutánea

Para la evaluación de la epitelización cutánea se emplearon las muestras teñidas con hematoxilina eosina. Para ello, se realizaron dos medidas con el programa Image Pro Plus por cada herida, la primera medida medía la extensión original de la herida, y la segunda medía desde el final de un borde del epitelio al otro. De forma que se realizaba la resta entre estas dos mediciones y se convertía el dato en porcentaje. A continuación encontramos en la tabla 29 los resultados obtenidos ante la evaluación de la epitelización cutánea en el grupo AMSC.

Tabla 29: Evaluación de la epitelización cutánea en las heridas del grupo AMSC.

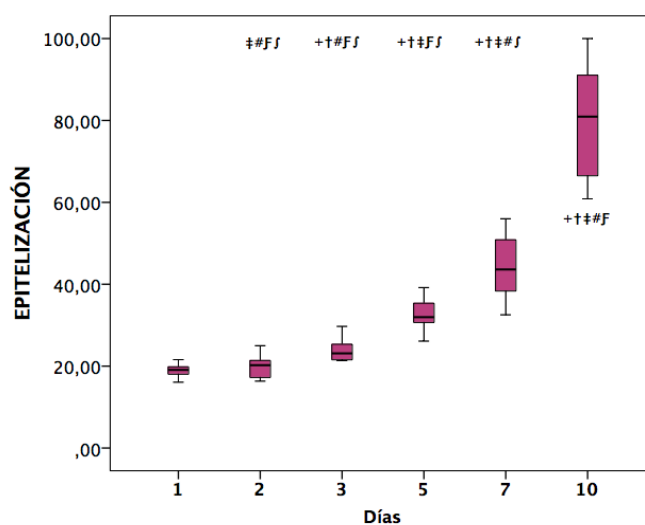
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	11	18,78	2,47	0,74	17,12	20,44	14,42	22,78
2	12	19,87	2,68	0,77	18,16	21,58	16,33	25
3	12	24,57	3,19	0,92	22,54	26,61	21,33	29,71
5	12	32,54	3,98	1,15	30,01	35,08	26,11	39,19
7	12	44,15	7,54	2,17	39,35	48,94	32,54	56
10	11	77,47	16,23	4,89	66,56	88,38	52,03	100
Total	70	35,89	21,36	2,55	30,80	40,99	14,42	100

Una vez obtenidos y descritos los resultados de la evolución de la epitelización cutánea de las heridas a nivel microscópico, se llevó a cabo un estudio comparativo entre cada uno de los tiempos de estudio, que podemos observar en la tabla 30, y en forma de gráfica en la gráfica 4.

Tabla 30: Estudio comparativo entre tiempos del factor epitelización cutánea en las heridas del grupo AMSC.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-1,3	4,69	1,41	-4,45	1,85	-0,92	10	0,38
DIA1-DIA3	-5,80	3,54	1,07	-8,17	-3,42	-5,44	10	0,000
DIA1-DIA5	-13,79	4,95	1,49	-17,12	-10,47	-9,24	10	0,000
DIA1-DIA7	-26,42	6,65	2,01	-30,89	-21,95	-13,1	10	0,000
DIA1-DIA10	-58,69	18,07	5,45	-70,83	-46,55	-10,7	10	0,000
DIA2-DIA3	-4,70	4,00	1,15	-7,24	-2,16	-4,07	11	0,002
DIA2-DIA5	-12,67	4,36	1,26	-15,44	-9,90	-10,0	11	0,000
DIA2-DIA7	-24,28	8,60	2,48	-29,74	-18,81	-9,78	11	0,000
DIA2-DIA10	-57,39	15,48	4,67	-67,79	-46,99	-12,3	10	0,000
DIA3-DIA5	-7,97	5,23	1,51	-11,29	-4,65	-5,28	11	0,000
DIA3-DIA7	-19,58	8,77	2,53	-25,15	-14,00	-7,73	11	0,000
DIA3-DIA10	-52,89	18,26	5,51	-65,16	-40,62	-9,61	10	0,000
DIA5-DIA7	-11,61	9,76	2,82	-17,81	-5,40	-4,12	11	0,002
DIA5-DIA10	-44,90	18,04	5,44	-57,01	-32,78	-8,26	10	0,000
DIA7-DIA10	-32,27	15,57	4,70	-42,73	-21,80	-6,87	10	,000

Gráfica 4: Evolución de la epitelización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo AMSC.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 † Diferencias con día 7. ‡ Diferencias con día 10.

El diagrama de cajas (Gráfica 4) y la tabla 30 muestran diferencias significativas desde el día 2 del estudio hasta el día 10. Existe un incremento constante y rápido del porcentaje de epitelización a lo largo del estudio en aquellas heridas infiltradas con AMSC. El incremento mayor se observó entre los días 7 y 10, donde las heridas cutáneas pasan de poseer un porcentaje de epitelización entorno al 50% a presentar una epitelización prácticamente completa a día 10. Sin embargo, entre los días 1 y 2 los porcentajes de epitelización cutánea no muestran grandes cambios.

Inflamación

La reacción inflamatoria producida en los tejidos adyacentes a las heridas cutáneas fue evaluada de dos formas diferentes. Se decidió evaluar tanto la intensidad inflamatoria como la distribución de la misma. Dicha variable se observó en la dermis de cada una de las muestras de piel que se obtuvieron, y pudo ser evaluada mediante la tinción de las muestras con hematoxilina eosina.

Intensidad Inflamatoria

Se empleó una escala semicuantitativa para evaluar la intensidad de la reacción inflamatoria en la dermis de las heridas cutáneas. Dicho parámetro fue clasificado como: ausencia de reacción inflamatoria, ligero infiltrado inflamatorio, fuerte y severa reacción inflamatoria. La tabla 31 muestra la evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria en heridas infiltradas con AMSC.

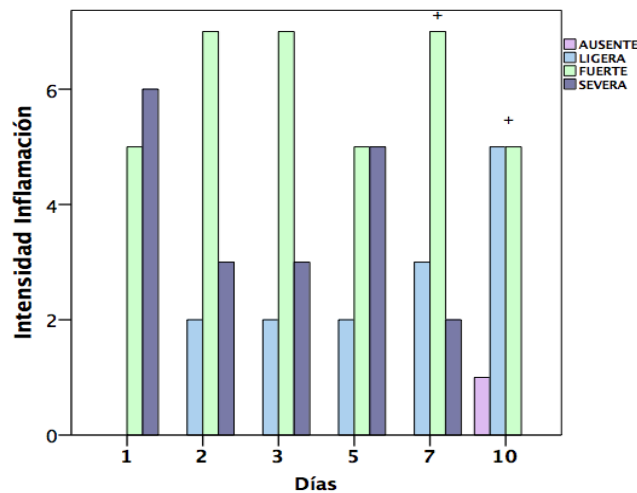
Tabla 31: Evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENTE	Recuento	0	0	0	0	0	1	1
	%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	100,00%
LIGERA	Recuento	0	2	2	2	3	5	14
	%	0,00%	14,30%	14,30%	14,30%	21,40%	35,70%	100,00%
FUERTE	Recuento	5	7	7	5	7	5	36
	%	13,90%	19,40%	19,40%	13,90%	19,40%	13,90%	100,00%
SEVERA	Recuento	6	3	3	5	2	0	19
	%	31,60%	15,80%	15,80%	26,30%	10,50%	0,00%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

A continuación, en la tabla 32 y gráfica 5 se muestran los resultados del estudio estadístico para la intensidad de la reacción inflamatoria en los diferentes tiempos de estudio.

Tabla 32: Estudio comparativo sobre la intensidad de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo AMSC.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	19,673	15	0,185
Razón de verosimilitudes	21,502	15	0,122
Asociación lineal por lineal	12,211	1	0,000
N de casos válidos	70		

Gráfica 5: Evolución de la intensidad de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo AMSC en el tiempo.

+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
f Diferencias con día 7. j Diferencias con día 10.

Como se observa en la gráfica 5, existen diferencias significativas tanto a día 7 como a día 10 con respecto al día 1 de estudio en la evolución de la intensidad de la reacción inflamatoria de

las heridas tratadas con AMSC. Al comienzo del estudio existe un grado del infiltrado inflamatorio severo, el cual va disminuyendo de forma progresiva hasta desaparecer en el día 10 de estudio. A día 7 y 10 la mayoría de las heridas presentan una ligera inflamación o incluso está ausente.

Distribución de la reacción inflamatoria

Igual que la anterior variable, la distribución de la reacción inflamatoria en la dermis también fue evaluada mediante una escala semicuantitativa, de forma que fue clasificada en: distribución subepidérmica focalizada, subepidérmica difusa o una combinación de ambas.

En la tabla 33 se muestran los resultados para esta variable.

Tabla 33: Evaluación de la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC.

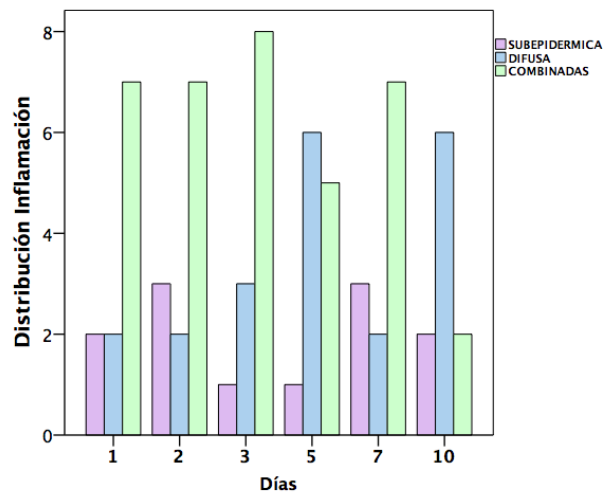
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
SUBEPIDÉRMICA	Recuento	2	3	1	1	3	2	12
	%	16,70%	25,00%	8,30%	8,30%	25,00%	16,70%	100,00%
DIFUSA	Recuento	2	2	3	6	2	6	21
	%	9,50%	9,50%	14,30%	28,60%	9,50%	28,60%	100,00%
COMBINADAS	Recuento	7	7	8	5	7	2	36
	%	19,40%	19,40%	22,20%	13,90%	19,40%	5,60%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	10	69
	%	15,90%	17,40%	17,40%	17,40%	17,40%	14,50%	100,00%

El estudio estadístico de la comparación entre tiempos para la distribución de la reacción inflamatoria se muestra en la tabla 34 y gráfica 6.

Tabla 34: Estudio comparativo sobre la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,682	10	0,307
Razón de verosimilitudes	11,936	10	0,289
Asociación lineal por lineal	2,112	1	0,146
N de casos válidos	69		

Gráfica 6: Evolución de la distribución de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo AMSC en el tiempo.



Como podemos ver, no existen diferencias significativas con respecto a la distribución de la reacción inflamatoria entre tiempos en las heridas infiltradas con AMSC. Existe una tendencia, a priori, de predominar una distribución combinada (tanto subepidérmica focalizada como difusa), sin embargo, a medida que avanza el tiempo en el estudio, va predominando la distribución subepidérmica difusa.

Angiogénesis

La evaluación de la angiogénesis es una forma directa de evaluar la neovascularización de la zona, se procedió a medir de manera objetiva el número total de nuevos vasos formados de pequeño y mediano calibre en las muestras teñidas con tricrómico de masson, los resultados obtenidos se encuentran registrados en la tabla 35.

Tabla 35: Evaluación de la angiogénesis en las heridas del grupo AMSC.

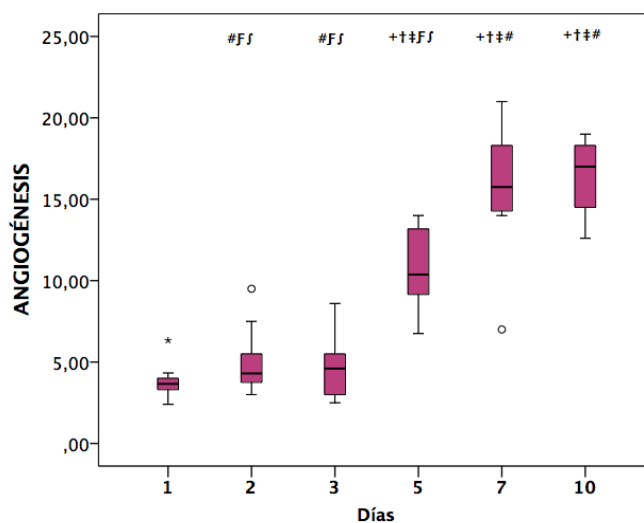
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	11	3,94	1,10	0,33	3,21	4,68	2,4	6,33
2	11	4,95	1,99	0,60	3,61	6,28	3	9,5
3	10	5,14	2,17	0,69	3,58	6,70	2,5	8,6
5	12	10,71	2,35	0,68	9,22	12,20	6,75	14
7	12	15,91	3,63	1,05	13,60	18,22	7	21
10	10	16,45	2,46	0,78	14,68	18,21	12,6	19
Total	66	9,59	5,69	0,70	8,19	10,99	2,4	21

En la tabla 36 se muestran los resultados tras comparar la angiogénesis en cada uno de los tiempos de estudio, pudiendo observar la evolución de la misma en la gráfica 7.

Tabla 36: Estudio comparativo entre tiempos del factor angiogénesis en las heridas del grupo AMSC.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-1,04	2,38	0,75	-2,73	0,66	-1,38	9	0,202
DIA1-DIA3	-1,23	3,40	1,13	-3,84	1,38	-1,09	8	0,309
DIA1-DIA5	-6,90	2,37	0,71	-8,49	-5,31	-9,66	10	0,000
DIA1-DIA7	-11,68	3,58	1,08	-14,09	-9,28	-10,8	10	0,000
DIA1-DIA10	-12,39	2,75	0,92	-14,50	-10,28	-13,5	8	0,000
DIA2-DIA3	-0,13	3,40	1,13	-2,74	2,48	-0,12	8	0,911
DIA2-DIA5	-5,85	2,67	0,80	-7,64	-4,06	-7,27	10	0,000
DIA2-DIA7	-11,13	4,75	1,43	-14,32	-7,94	-7,78	10	0,000
DIA2-DIA10	-11,65	2,56	0,85	-13,61	-9,68	-13,6	8	0,000
DIA3-DIA5	-5,00	3,53	1,12	-7,52	-2,47	-4,47	9	0,002
DIA3-DIA7	-11,75	3,65	1,15	-14,36	-9,14	-10,1	9	0,000
DIA3-DIA10	-11,04	3,44	1,22	-13,92	-8,17	-9,09	7	0,000
DIA5-DIA7	-5,20	4,55	1,31	-8,08	-2,31	-3,96	11	0,002
DIA5-DIA10	-5,70	2,24	0,71	-7,30	-4,09	-8,03	9	0,000
DIA7-DIA10	-0,54	5,49	1,74	-4,46	3,39	-0,31	9	0,765

Gráfica 7: Evolución de la angiogénesis en el tiempo en las heridas del grupo AMSC.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 f Diferencias con día 7. F Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Con los resultados obtenidos, observamos que las heridas infiltradas con AMSC presentaron un claro aumento significativo de la angiogénesis a medida que avanzan los tiempos de estudio, alcanzando los valores más elevados en los días 7 y 10 sin existir diferencias significativas entre ambos tiempos, con lo que el incremento exponencial de la angiogénesis alcanza su máximo en el día 7. Cabe destacar la rápida neovascularización que presentan estas heridas en el periodo comprendido entre el día 3 y día 7, donde pasan a duplicar, e incluso a triplicar, la nueva formación de vasos.

Porcentaje de colágeno

El porcentaje de colágeno fue valorado de forma objetiva, ya que mediante la tinción de las muestras con Tricrómico de Masson se procedió a realizar la medición del colágeno maduro en la zona de la dermis superficial y profunda de las heridas cutáneas.

Los resultados del porcentaje de colágeno aparecen en la tabla 37.

Tabla 37: Evaluación del porcentaje de colágeno en las heridas del grupo AMSC.

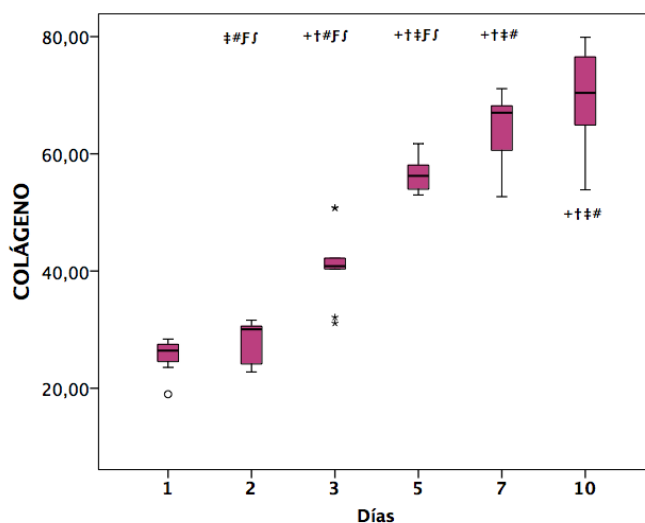
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	25,67	2,86	0,83	23,85	27,48	18,98	29,92
2	11	27,87	3,52	1,06	25,51	30,24	22,78	31,61
3	10	42,02	7,05	2,23	36,98	47,07	31,09	50,79
5	12	56,33	2,77	0,80	54,57	58,09	52,98	61,73
7	12	64,54	5,47	1,58	61,06	68,02	52,69	71,12
10	10	69,18	8,78	2,78	62,90	75,46	53,86	79,89
Total	67	47,42	17,90	2,19	43,05	51,79	18,98	79,89

Una vez obtenidos los resultados descriptivos, se realizó la comparación de estos valores entre los tiempos de estudio obteniendo los resultados que aparecen a continuación en la tabla 38 y la gráfica 8.

Tabla 38: Estudio comparativo entre tiempos del factor porcentaje de colágeno en las heridas del grupo AMSC.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-2,28	5,89	1,78	-6,24	1,68	-1,28	10	0,229
DIA1-DIA3	-15,8	7,96	2,52	-21,50	-10,10	-6,28	9	0,000
DIA1-DIA5	-30,66	3,48	1,00	-32,87	-28,45	-30,5	11	0,000
DIA1-DIA7	-38,88	5,76	1,66	-42,53	-35,22	-23,3	11	0,000
DIA1-DIA10	-43,08	10,11	3,20	-50,31	-35,85	-13,4	9	0,000
DIA2-DIA3	-15,02	5,70	1,90	-19,40	-10,64	-7,91	8	0,000
DIA2-DIA5	-28,66	4,43	1,33	-31,63	-25,68	-21,4	10	0,000
DIA2-DIA7	-36,41	7,69	2,32	-41,57	-31,24	-15,7	10	0,000
DIA2-DIA10	-40,79	7,61	2,54	-46,64	-34,94	-16,0	8	0,000
DIA3-DIA5	-14,61	7,48	2,37	-19,96	-9,26	-6,18	9	0,000
DIA3-DIA7	-22,23	11,37	3,60	-30,37	-14,09	-6,18	9	0,000
DIA3-DIA10	-27,39	9,08	3,21	-34,98	-19,80	-8,53	7	0,000
DIA5-DIA7	-8,214	6,75	1,95	-12,50	-3,92	-4,22	11	0,001
DIA5-DIA10	-13,03	10,29	3,25	-20,39	-5,67	-4,01	9	0,003
DIA7-DIA10	-2,83	9,20	2,91	-9,41	3,75	-0,97	9	0,357

Gráfica 8: Evolución del porcentaje de colágeno en el tiempo en las heridas del grupo AMSC.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 J' Diferencias con día 7. J Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Como podemos apreciar en los resultados arriba expuestos, existe un crecimiento exponencial estadísticamente significativo del depósito de colágeno maduro en las heridas infiltradas con AMSC a medida que avanza el tiempo de estudio. Es importante resaltar que la mayor parte del colágeno se depositó entre los días 2 y 7 de una forma rápida y efectiva. Entre los días 1 y 2 no existieron diferencias significativas, con lo que la formación de colágeno maduro entre ambos fue constante, pero sin grandes cambios.

Grupo AMSC+PRGF: Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo

A continuación se exponen de forma independiente todos los datos obtenidos en el grupo de estudio AMSC+PRGF. Para comenzar se exponen los datos obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio para las diferentes variables estudiadas, y posteriormente se realiza una comparación de los mismos, lo cual se muestra en gráficos de forma más ilustrativa.

Estudio Macroscópico

Tal y como ya hemos comentado con anterioridad, se evaluó el porcentaje de cicatrización cutánea, la presencia/ausencia de infección, el color de la cicatriz, el grosor de la cicatriz y por último la retracción de la misma.

Cicatrización cutánea

Los valores de cicatrización cutánea se muestran como porcentajes. La tabla 39 muestra los distintos datos obtenidos en los diferentes tiempos de estudio. Además se han incorporado los valores medios, la desviación típica y el intervalo de confianza entre otros parámetros.

Tabla 39: Evaluación de la cicatrización cutánea en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

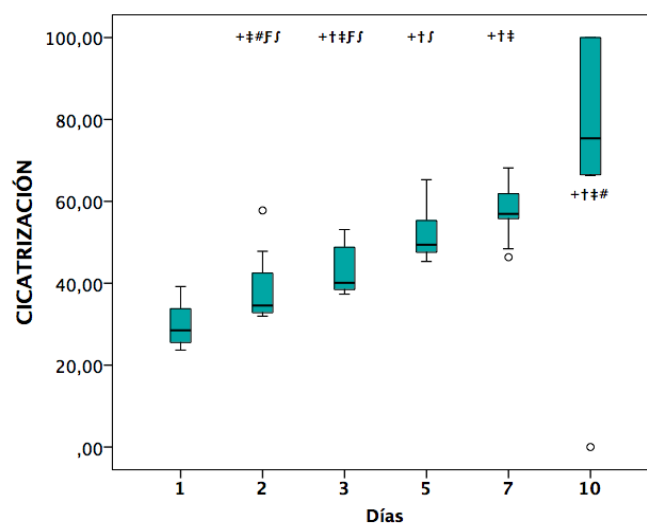
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	11	29,72	5,25	1,58	26,19	33,24	23,67	39,20
2	12	38,66	7,94	2,29	33,62	43,71	31,97	57,78
3	12	46,07	6,81	1,97	41,75	50,40	37,33	56,93
5	12	50,53	6,04	1,74	46,69	54,37	44,11	65,30
7	11	55,85	6,71	2,02	51,35	60,36	46,36	68,16
10	11	75,71	28,82	8,69	56,35	95,07	0,00	100,00
Total	69	49,24	18,98	2,29	44,67	53,80	0,00	100,00

Los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio se compararon entre sí y se exponen a continuación tanto en la tabla 40 como en la gráfica 9.

Tabla 40: Estudio comparativo entre tiempos del factor cicatrización cutánea en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo confianza 95%		t	gl	Sig
				Límite inferior	Límite superior			
DIA1-DIA2	-7,21	7,15	2,15	-12,01	-2,41	-3,34	10	0,007
DIA1-DIA3	-17,15	8,30	2,50	-22,73	-11,58	-6,85	10	0,000
DIA1-DIA5	-21,28	9,13	2,75	-27,43	-15,15	-7,73	10	0,000
DIA1-DIA7	-27,40	10,67	3,37	-35,04	-19,77	-8,12	9	0,000
DIA1-DIA10	-43,51	27,94	8,83	-63,50	-23,53	-4,93	9	0,001
DIA2-DIA3	-7,41	10,88	3,14	-14,32	-0,50	-2,36	11	0,038
DIA2-DIA5	-11,86	10,29	2,97	-18,41	-5,32	-3,99	11	0,002
DIA2-DIA7	-16,58	11,36	3,42	-24,22	-8,94	-4,84	10	0,001
DIA2-DIA10	-36,72	30,89	9,31	-57,47	-15,96	-3,94	10	0,003
DIA3-DIA5	-4,45	9,50	2,74	-10,49	1,58	-1,62	11	0,133
DIA3-DIA7	-10,28	8,30	2,50	-15,86	-4,70	-4,11	10	0,002
DIA3-DIA10	-30,27	30,45	9,18	-50,73	-9,82	-3,30	10	0,008
DIA5-DIA7	-5,22	8,12	2,45	-10,68	0,24	-2,13	10	,059
DIA5-DIA10	-24,59	31,13	9,38	-45,51	-3,68	-2,62	10	0,026
DIA7-DIA10	-19,70	34,70	10,97	-44,53	5,13	-1,80	9	,106

Gráfica 9: Evolución de la cicatrización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
†† Diferencias con día 7. ††† Diferencias con día 10.

○ Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Se observan diferencias estadísticamente significativas prácticamente entre todos los días del estudio. Se aprecia un proceso de cicatrización muy rápido de las heridas cutáneas tratadas con AMSC+PRGF y progresivo a medida que avanza el tiempo desde el primer día del estudio hasta el final, llegando a estabilizarse a día 7. Cabe destacar que entre los días 3 y 5 la gran mayoría de las heridas cutáneas ya presentaban al menos una cicatrización del 50% de su superficie.

Presencia o ausencia de infección

La variable infección se evaluó con una escala numérica en la que 0 se adjudicaba a aquellas heridas con signos macroscópicos evidentes de infección/contaminación bacteriana, mientras que aquellas que no demostraban poseer signos de infección se calificaban con un 1. A continuación, en la tabla 41 se muestran los resultados obtenidos de dicha variable.

Tabla 41: Evaluación del porcentaje de infección en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENCIA	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Como claramente se observa en la tabla 41, ninguna de las heridas cutáneas presentó signos de infección, por lo que no fue necesario realizar el estudio estadístico comparativo entre tiempos.

Color de la cicatriz

Para valorar el color de la cicatriz de las heridas cutáneas se valoró el aspecto macroscópico de la cicatriz de las heridas y se clasificó en: hiperpigmentada, pigmentada, roja, casi normal y normal en cada uno de los tiempos de estudio. A continuación se muestran los resultados obtenidos de dicha variable (Tabla 42).

Tabla 42: Evaluación del color de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

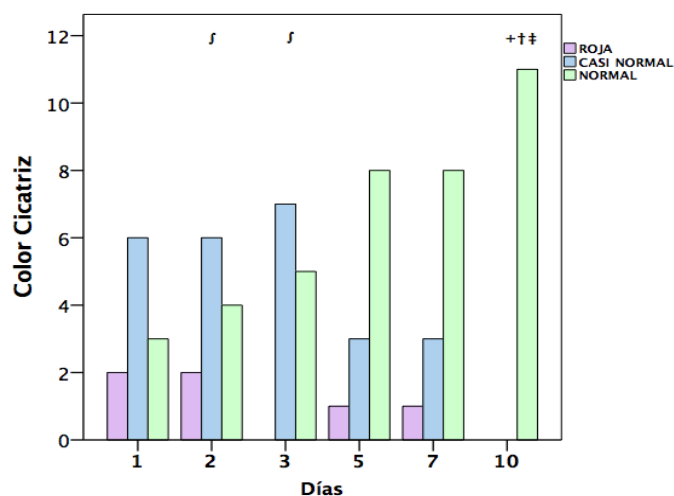
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
ROJA	Recuento	2	2	0	1	1	0	6
	%	33,30%	33,30%	0,00%	16,70%	16,70%	0,00%	100,00%
CASI NORMAL	Recuento	6	6	7	3	3	0	25
	%	24,00%	24,00%	28,00%	12,00%	12,00%	0,00%	100,00%
NORMAL	Recuento	3	4	5	8	8	11	39
	%	7,70%	10,30%	12,80%	20,50%	20,50%	28,20%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Tras la exposición de los resultados respecto al color de la cicatriz en heridas tratadas con AMSC+PRGF, pasamos a realizar el estudio estadístico de los mismos datos entre tiempos de estudio, donde se muestran las diferencias significativas marcadas en rojo en la tabla 43. Estas mismas son posteriormente reflejadas para su mejor comprensión gráficamente en la gráfica 10.

Tabla 43: Estudio comparativo entre tiempos del factor color de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	19,763a	10	0,032
Razón de verosimilitudes	24,574	10	0,006
Asociación lineal por lineal	13,403	1	0,000
N de casos válidos	70		

Gráfica 10: Evolución del color de la cicatriz de las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. †† Diferencias con día 3. ††† Diferencias con día 5.
f Diferencias con día 7. J Diferencias con día 10.

Existe un claro cambio en la coloración de la cicatriz de las heridas infiltradas con AMSC+PRGF hacia una coloración normal de forma temprana. Se muestran diferencias estadísticamente significativas a días 1, 2 y 3 con respecto al día 10, donde conforme pasan los días un mayor número de heridas reflejan un color de cicatriz cada vez más semejante al de una cicatriz fisiológica, alcanzando un color de cicatriz completamente normal en el 100% de las heridas a día 10, y porcentajes en torno al 70% a penas a día 5 de la realización de las heridas.

Grosor de la cicatriz

Para la valoración del grosor de la cicatriz nos centramos principalmente en los bordes de cada una de las heridas y los clasificamos según una escala cualitativa ya validada y publicada en queloides, cicatrices hipertróficas, casi normales o normales. Los resultados tras la evaluación de dicha variable se muestran a continuación en la tabla 44.

Tabla 44: Evaluación del grosor de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

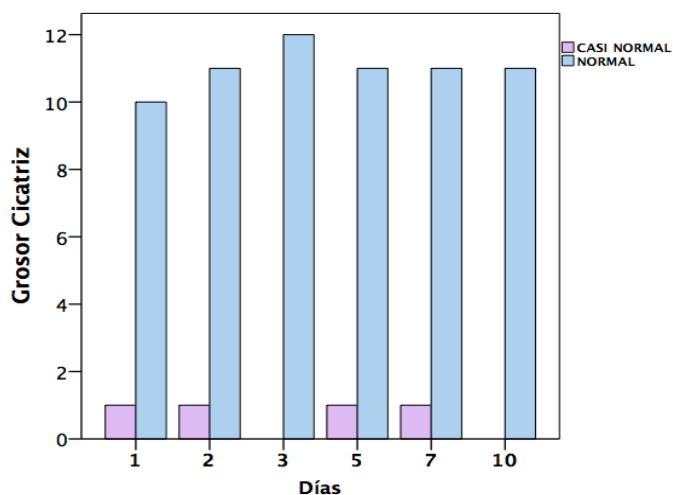
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
CASI NORMAL	1	1	0	1	1	0	4
	25,00%	25,00%	0,00%	25,00%	25,00%	0,00%	100,00%
NORMAL	10	11	12	11	11	11	66
	15,20%	16,70%	18,20%	16,70%	16,70%	16,70%	100,00%
TOTAL	11	12	12	12	12	11	70
	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Una vez descritos los resultados obtenidos se valoró mediante la realización de un estudio comparativo las diferencias entre los distintos tiempos de estudio, los cuales aparecen expuestos en la tabla 45 y gráfica 11.

Tabla 45: Estudio comparativo entre tiempos del factor grosor de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,085	5	0,837
Razón de verosimilitudes	3,31	5	0,652
Asociación lineal por lineal	0,361	1	0,548
N de casos válidos	70		

Gráfica 11: Evolución del grosor de la cicatriz de las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



En el caso de la evaluación del grosor de cicatriz de las heridas tratadas con AMSC+PRGF, no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de estudio. Es importante destacar que de manera progresiva al comienzo del estudio y posteriormente de forma constante, todas las heridas presentaron un grosor de cicatriz normal o casi normal y no se detectaron queloides ni cicatrices hipertróficas.

Retracción de la cicatriz

Se trata de una variable evaluada de forma subjetiva y clasificada en cicatrices muy retraídas, con retracción moderada o ausente. A continuación, en la tabla 46 se exponen los resultados obtenidos con respecto a la retracción de la cicatriz.

Tabla 46: Evaluación de la retracción de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

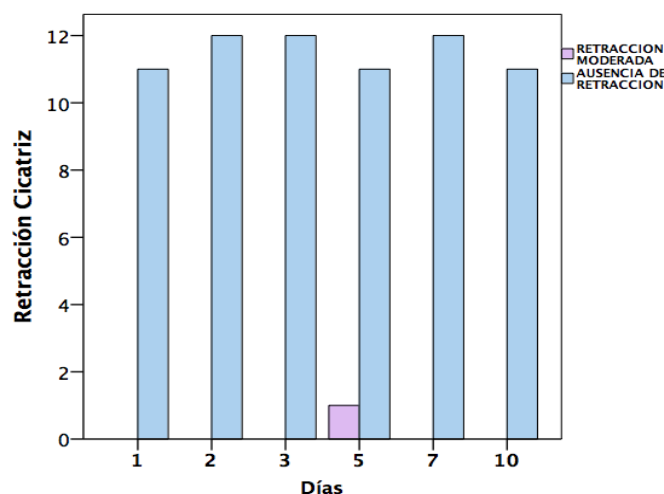
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
MODERADA	0	0	0	1	0	0	1	0
	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%
AUSENCIA	11	12	12	11	12	11	69	11
	15,90%	17,40%	17,40%	15,90%	17,40%	15,90%	100,00%	15,90%
TOTAL	11	12	12	12	12	11	70	11
	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%	15,70%

Con posterioridad a la obtención de los resultados descriptivos se procedió a realizar la comparación de estos valores entre los tiempos de estudio, obteniendo los resultados que aparecen en forma de tabla (tabla 47) y gráfica (gráfica 12).

Tabla 47: Estudio comparativo entre tiempos del factor retracción de la cicatriz en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,094	10	0,169
Razón de verosimilitudes	14,435	10	0,154
Asociación lineal por lineal	0,081	1	0,776
N de casos válidos	67		

Gráfica 12: Evolución de la retracción de la cicatriz de las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



Una vez más, la variable retracción de la cicatriz no muestra diferencias significativas entre los tiempos de estudio. La gran mayoría de los animales no presentan retracción de cicatriz alguna lo que justifica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre tiempos.

Estudio Microscópico

Tras la realización del estudio macroscópico se procedió a realizar el estudio microscópico el cual consistió en el tallado de las muestras e inclusión de las mismas en bloques de parafina para la obtención de preparaciones histológicas las cuales fueron teñidas mediante dos tinciones diferentes: hematoxilina eosina y tricrómico de masson.

Dicho estudio, como ya se ha comentado con anterioridad, consistió en la evaluación de las siguientes variables: epitelización cutánea, grado de inflamación, proceso de angiogénesis y el porcentaje de colágeno.

Epitelización Cutánea

Esta variable fue expresada en todo momento en porcentaje y mediante la obtención de medidas directas de cada una de las heridas cutáneas, midiendo las extensiones de borde a borde de nuevos y antiguos epitelios. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la tabla 48.

Tabla 48: Evaluación de la epitelización cutánea en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

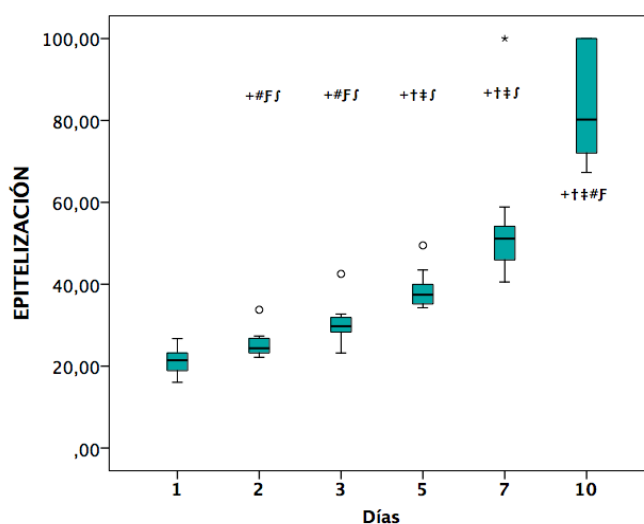
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	21,32	3,11	0,90	19,34	23,29	16,05	26,72
2	10	25,87	3,35	1,06	23,47	28,27	22,17	33,77
3	12	29,44	4,86	1,40	26,36	32,53	23,21	42,53
5	10	38,71	4,75	1,50	35,31	42,11	34,26	49,49
7	10	54,22	17,01	5,38	42,05	66,38	40,55	100
10	11	84,15	13,47	4,06	75,11	93,20	67,29	100
Total	65	41,89	23,67	2,94	36,02	47,75	16,05	100

Para comparar los valores de la epitelización cutánea entre los diferentes tiempos de estudio, se realizó el estudio estadístico de dichas variables (Tabla 49 y Gráfica 13).

Tabla 49: Estudio comparativo entre tiempos del factor epitelización cutánea en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-4,02	4,13	1,31	-6,97	-1,07	-3,08	9	0,013
DIA1-DIA3	-8,13	5,52	1,59	-11,63	-4,62	-5,10	11	0,000
DIA1-DIA5	-18,18	6,39	2,02	-22,75	-13,61	-9,00	9	0,000
DIA1-DIA7	-32,57	15,99	5,06	-44,01	-21,13	-6,44	9	0,000
DIA1-DIA10	-62,85	13,92	4,20	-72,20	-53,49	-14,97	10	0,000
DIA2-DIA3	-3,88	6,03	1,91	-8,20	0,44	-2,03	9	0,072
DIA2-DIA5	-13,39	7,65	2,71	-19,79	-6,99	-4,95	7	0,002
DIA2-DIA7	-28,54	20,13	7,12	-45,37	-11,71	-4,01	7	0,005
DIA2-DIA10	-54,42	11,11	3,70	-62,96	-45,88	-14,70	8	0,000
DIA3-DIA5	-8,94	7,74	2,45	-14,48	-3,41	-3,65	9	0,005
DIA3-DIA7	-24,31	18,73	5,92	-37,71	-10,91	-4,10	9	0,003
DIA3-DIA10	-54,86	15,00	4,52	-64,94	-44,78	-12,13	10	0,000
DIA5-DIA7	-17,17	20,96	7,41	-34,68	0,35	-2,32	7	0,054
DIA5-DIA10	-43,62	17,09	5,70	-56,76	-30,48	-7,65	8	0,000
DIA7-DIA10	-32,27	15,57	4,70	-42,73	-21,80	-6,87	10	0,000

Gráfica 13: Evolución de la epitelización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo AMSC+PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 †† Diferencias con día 7. ††† Diferencias con día 10.
 ° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El estudio de la epitelización cutánea muestra diferencias estadísticamente significativas desde el día 1 del estudio hasta el día 10. Podemos apreciar un porcentaje de epitelización que se incrementa de forma rápida y progresiva en las heridas que fueron tratadas con AMSC+PRGF. Se alcanzó una epitelización más rápida entre los periodos de tiempo 7 y 10 días. Dicho incremento del porcentaje de epitelización muestra diferencias estadísticamente significativas incluso al principio del estudio entre los días 1 y 2.

Inflamación

La variable de la inflamación se evaluó mediante dos formas, por un lado la intensidad de la reacción inflamatoria y por otro la distribución de la misma.

Intensidad Inflamatoria

Para valorar la intensidad inflamatoria de las heridas cutáneas se estudió el infiltrado inflamatorio en la dermis de las heridas y se clasificó en: infiltrado inflamatorio severo, fuerte, ligero o ausente. Los resultados aparecen expuestos en la tabla 50.

Tabla 50: Evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

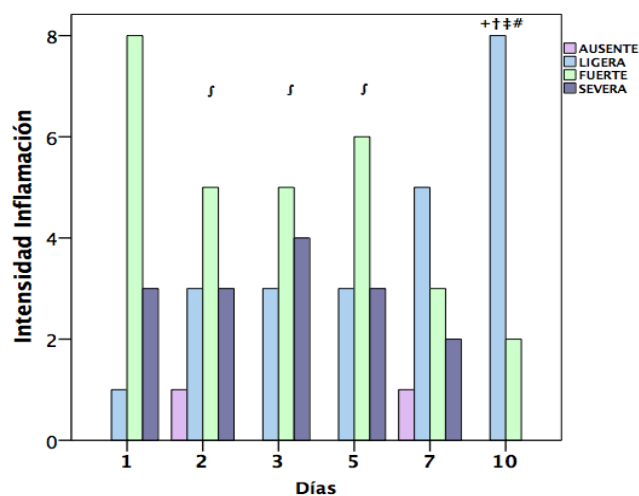
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENTE	Recuento	0	1	0	0	1	0	2
	%	0,00%	50,00%	0,00%	0,00%	50,00%	0,00%	100,00%
LIGERA	Recuento	1	3	3	3	5	8	23
	%	4,30%	13,00%	13,00%	13,00%	21,70%	34,80%	100,00%
FUERTE	Recuento	8	5	5	6	3	2	29
	%	27,60%	17,20%	17,20%	20,70%	10,30%	6,90%	100,00%
SEVERA	Recuento	3	3	4	3	2	0	15
	%	20,00%	20,00%	26,70%	20,00%	13,30%	0,00%	100,00%
TOTAL	Recuento	12	12	12	12	11	10	69
	%	17,40%	17,40%	17,40%	17,40%	15,90%	14,50%	100,00%

A continuación, se recogen los resultados obtenidos tras el estudio comparativo entre tiempos de dicha variable (Tabla 51 y Gráfica 14).

Tabla:51 Estudio comparativo sobre la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	20,825	15	0,143
Razón de verosimilitudes	22,504	15	0,095
Asociación lineal por lineal	9,023	1	0,003
N de casos válidos	69		

Gráfica 14: Evolución de la intensidad de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
§ Diferencias con día 7. ¶ Diferencias con día 10.

En cuanto a la intensidad de la reacción inflamatoria, podemos apreciar que desde el primer día de estudio, es decir 24 horas tras la realización de las heridas, la intensidad de reacción está va disminuyendo hasta llegar a conseguir que la gran mayoría de las heridas presentase una ligera reacción inflamatoria al final del mismo.

Distribución de la reacción inflamatoria

En segundo lugar se valoró la distribución de la reacción inflamatoria mediante el análisis de la localización del infiltrado inflamatorio en las preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina. En la tabla 52 vemos reflejados los valores obtenidos en cada tiempo de estudio.

Tabla 52: Evaluación de la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

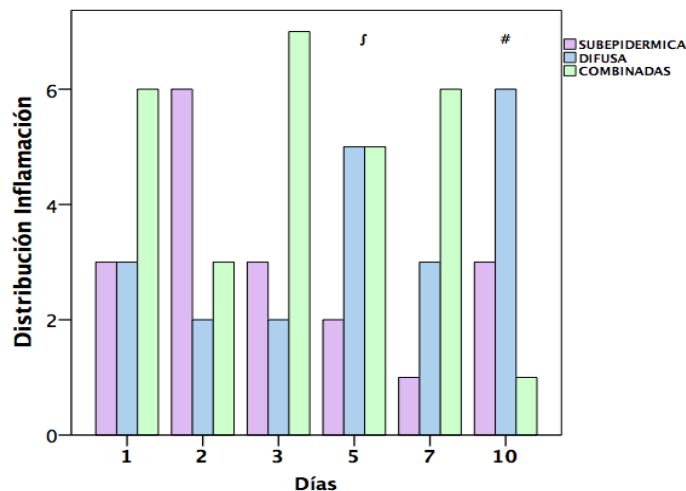
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
SUBEPIDÉRMICA	Recuento	3	6	3	2	1	3	18
	%	16,70%	33,30%	16,70%	11,10%	5,60%	16,70%	100,00%
DIFUSA	Recuento	3	2	2	5	3	6	21
	%	14,30%	9,50%	9,50%	23,80%	14,30%	28,60%	100,00%
COMBINADAS	Recuento	6	3	7	5	6	1	28
	%	21,40%	10,70%	25,00%	17,90%	21,40%	3,60%	100,00%
TOTAL	Recuento	12	11	12	12	10	10	67
	%	17,90%	16,40%	17,90%	17,90%	14,90%	14,90%	100,00%

A continuación, en la tabla 53 y la gráfica 15 se muestra el estudio comparativo para la presente variable.

Tabla 53: Estudio comparativo sobre la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,094	10	0,169
Razón de verosimilitudes	14,435	10	0,154
Asociación lineal por lineal	0,081	1	0,776
N de casos válidos	67		

Gráfica 15: Evolución de la distribución de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo AMSC+PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
f Diferencias con día 7. f Diferencias con día 10.

El infiltrado inflamatorio se encuentra distribuido a nivel difuso en la dermis en la gran mayoría de las heridas a medida que avanzan los tiempos de estudio hasta alcanzar un máximo número de heridas con dicha distribución a día 10, mientras que hasta el día 7 del estudio es la combinación de ambas distribuciones la que predomina, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los días de estudio 5 y 10.

Angiogénesis

La angiogénesis se evaluó objetivamente mediante la visualización y contabilización directa de vasos de pequeño y mediano calibre de nueva formación en la preparación. En la tabla 54 aparecen de manera descriptiva los resultados obtenidos de dicha variable.

Tabla 54: Evaluación de la angiogénesis en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

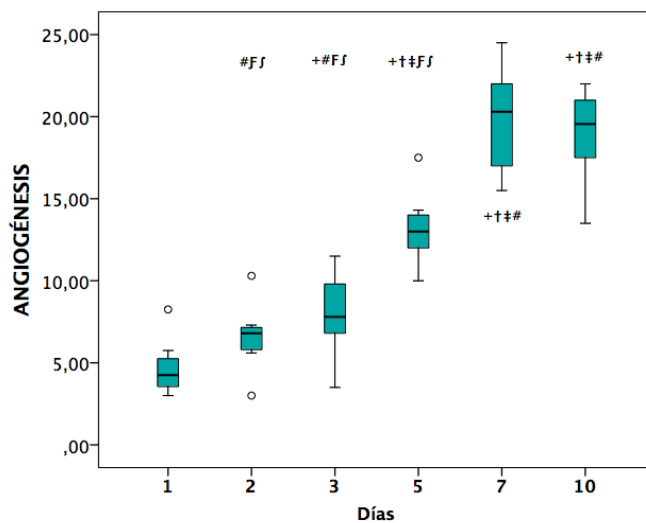
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	4,76	1,53	0,44	3,79	5,74	3	8,25
2	10	6,31	1,89	0,60	4,96	7,66	3	10,3
3	8	7,98	2,57	0,91	5,83	10,12	3,5	11,5
5	11	12,71	2,89	0,87	10,77	14,65	6,5	17,5
7	12	18,71	3,56	1,03	16,45	20,96	12,6	24,5
10	10	18,86	2,77	0,88	16,88	20,84	13,5	22
Total	63	11,70	6,33	0,80	10,10	13,29	3	24,5

Los resultados obtenidos en cada uno de los tiempos de estudio se compararon entre sí y se exponen a continuación en forma de tabla (Tabla 55) y de gráfica (Gráfica 16).

Tabla 55: Estudio comparativo entre tiempos del factor angiogénesis en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-1,23	2,53	0,80	-3,03	0,58	-1,53	9	0,16
DIA1-DIA3	-2,93	2,84	1,00	-5,30	-0,56	-2,92	7	0,022
DIA1-DIA5	-7,84	3,71	1,12	-10,33	-5,35	-7,01	10	0,000
DIA1-DIA7	-13,94	3,58	1,03	-16,22	-11,67	-13,48	11	0,000
DIA1-DIA10	-13,84	3,06	0,97	-16,02	-11,65	-14,32	9	0,000
DIA2-DIA3	-1,76	3,15	1,19	-4,67	1,15	-1,48	6	0,19
DIA2-DIA5	-6,61	3,80	1,27	-9,53	-3,69	-5,22	8	0,001
DIA2-DIA7	-12,62	4,53	1,43	-15,86	-9,38	-8,81	9	0,000
DIA2-DIA10	-12,76	3,08	1,03	-15,13	-10,39	-12,41	8	0,000
DIA3-DIA5	-4,39	3,16	1,20	-7,31	-1,46	-3,67	6	0,01
DIA3-DIA7	-11,53	5,08	1,80	-15,78	-7,29	-6,42	7	0,000
DIA3-DIA10	-11,83	3,91	1,48	-15,45	-8,21	-8,00	6	0,000
DIA5-DIA7	-6,22	4,80	1,45	-9,45	-2,99	-4,30	10	0,002
DIA5-DIA10	-6,38	3,62	1,14	-8,97	-3,79	-5,58	9	0,000
DIA7-DIA10	0,41	3,58	1,13	-2,15	2,97	0,36	9	0,725

Gráfica 16: Evolución de la angiogénesis en el tiempo de las heridas del grupo AMSC+PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
†† Diferencias con día 7. ††† Diferencias con día 10.

○ Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El proceso de neovascularización presentó un incremento progresivo desde el día 1 del estudio hasta el día 7 de forma estadísticamente significativa en las heridas tratadas con AMSC+PRGF. Cabe destacar el rápido proceso de angiogénesis que tuvo lugar entre el periodo de tiempo comprendido entre el día 3 y el día 7 de estudio, periodo en el cual se muestra un incremento exponencial y muy rápido, llegando a duplicar la cantidad de nuevos vasos formados.

Porcentaje de colágeno

El depósito de colágeno maduro en las heridas cutáneas fue calculado de forma objetiva en las preparaciones teñidas con la tinción tricrómico de masson y expresado en todo momento en forma de porcentaje. Los resultados se encuentran expuestos en la tabla 56.

Tabla 56: Evaluación del porcentaje de colágeno en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

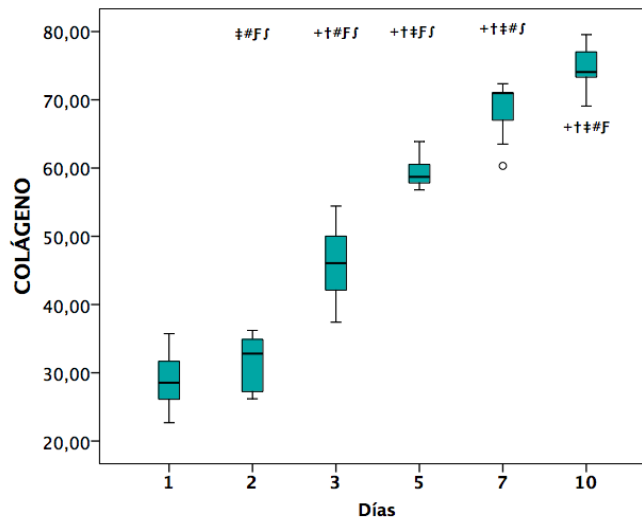
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	29,08	4,13	1,19	26,46	31,70	22,68	35,73
2	10	32,15	4,06	1,28	29,25	35,05	26,19	37,41
3	8	46,03	5,76	2,04	41,21	50,84	37,41	54,43
5	11	58,81	2,68	0,81	57,01	60,61	55,38	63,88
7	12	67,17	4,36	1,26	64,39	69,94	60,32	72,36
10	10	74,65	2,92	0,92	72,56	76,73	69,08	79,55
Total	63	51,40	17,88	2,25	46,89	55,90	22,68	79,55

El estudio estadístico comparativo que se realizó de dicha variable en los distintos tiempos de estudio se muestra a continuación en la tabla 57 y en la gráfica 17.

Tabla 57: Estudio comparativo entre tiempos del factor porcentaje de colágeno en las heridas del grupo AMSC+PRGF.

	Media	Desviación tıp.	Error tıp. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-2,91	7,84	2,48	-8,52	2,70	-1,17	9	0,271
DIA1-DIA3	-16,41	8,90	3,15	-23,85	-8,98	-5,22	7	0,001
DIA1-DIA5	-29,68	5,26	1,59	-33,21	-26,14	-18,70	10	0,000
DIA1-DIA7	-38,08	3,70	1,07	-40,44	-35,73	-35,63	11	0,000
DIA1-DIA10	-45,17	6,38	2,02	-49,73	-40,60	-22,38	9	0,000
DIA2-DIA3	-14,11	3,89	1,47	-17,70	-10,51	-9,61	6	0,000
DIA2-DIA5	-27,50	4,17	1,39	-30,70	-24,29	-19,78	8	0,000
DIA2-DIA7	-35,28	6,94	2,19	-40,24	-30,32	-16,08	9	0,000
DIA2-DIA10	-42,98	3,07	1,02	-45,33	-40,62	-42,02	8	0,000
DIA3-DIA5	-14,54	5,27	1,99	-19,42	-9,67	-7,30	6	0,000
DIA3-DIA7	-21,49	9,70	3,43	-29,60	-13,38	-6,27	7	0,000
DIA3-DIA10	-28,57	4,47	1,69	-32,70	-24,44	-16,93	6	0,000
DIA5-DIA7	-8,92	5,08	1,53	-12,33	-5,50	-5,82	10	0,000
DIA5-DIA10	-15,50	3,92	1,24	-18,30	-12,69	-12,49	9	0,000
DIA7-DIA10	-6,18	4,95	1,57	-9,72	-2,64	-3,95	9	0,003

Gráfica 17: Evolución del porcentaje de colágeno en el tiempo en las heridas del grupo AMSC+PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 ¶ Diferencias con día 7. § Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El porcentaje de colágeno en las heridas tratadas con AMSC+PRGF muestra diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos a excepción de entre los días 1 y 2. Se aprecia claramente un aumento exponencial y muy rápido de depósito de fibras de colágeno maduro en dichas heridas cutáneas entre los periodos de tiempo comprendidos entre 2 y 7 días,

cuyos porcentajes llegan a duplicarse en un periodo relativamente corto. Finalmente el depósito de colágeno maduro alcanza su máximo a los 7 días, no presentando diferencias a los 10 días.

Grupo PRGF: Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo

En la presente sección se exponen los resultados obtenidos de forma individual de cada una de las variables evaluadas en el grupo de heridas cutáneas tratadas solo con PRGF, adicionalmente también se muestra el estudio estadístico que compara la evolución de los resultados para cada una de las variables estudiadas a lo largo de los diferentes tiempos de estudio.

Estudio Macroscópico

El estudio macroscópico consistió en la evaluación y medición de la cicatrización cutánea, además de la evaluación del color, grosor y retracción de las cicatriz de las heridas cutáneas así como la valoración de la presencia de infección en las heridas. Como ya se ha realizado con anterioridad, se estudió cada una de las variables independientemente para cada uno de los tiempos de estudio y posteriormente se compararon entre sí.

Cicatrización cutánea

En la tabla 58 se presentan de manera descriptiva los valores obtenidos en el cálculo de la cicatrización cutánea de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio, incluyendo en cada caso la media de los datos obtenidos junto con la desviación típica y el intervalo de confianza.

Tabla 58: Evaluación de la cicatrización cutánea en las heridas del grupo PRGF.

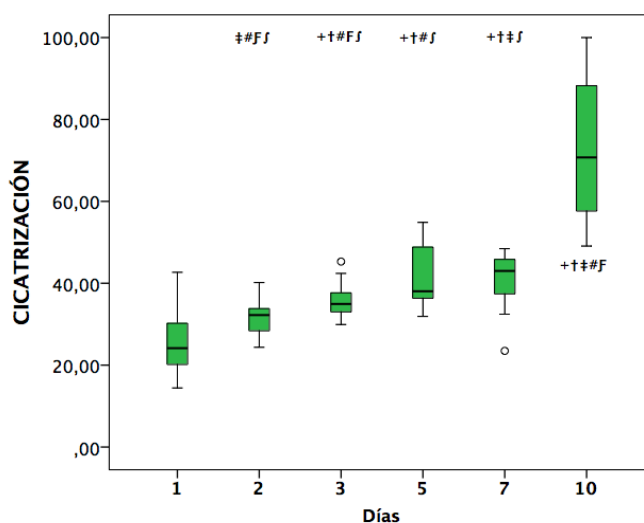
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	11	25,85	8,41	2,54	20,20	31,50	14,43	42,67
2	12	30,43	5,12	1,48	27,18	33,69	22,08	40,16
3	12	36,57	5,00	1,44	33,39	39,74	29,93	45,29
5	12	42,57	8,58	2,48	37,12	48,02	31,89	54,86
7	12	42,63	7,85	2,27	37,64	47,62	23,48	52,54
10	11	70,28	17,18	5,18	58,73	81,82	49,09	100
Total	70	41,20	16,72	2,00	37,21	45,18	14,43	100

Una vez estudiados los datos, se llevó a cabo un estudio comparativo entre cada uno de los tiempos de estudio, expuestos en la tabla 59 y gráfica 18.

Tabla 59: Estudio comparativo entre tiempos del factor cicatrización cutánea en las heridas del grupo PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-3,70	8,46	2,55	-9,39	1,99	-1,45	10	0,178
DIA1-DIA3	-10,90	10,68	3,22	-18,07	-3,72	-3,39	10	0,007
DIA1-DIA5	-17,29	12,93	3,90	-25,97	-8,60	-4,44	10	0,001
DIA1-DIA7	-16,69	7,91	2,39	-22,01	-11,38	-7,00	10	0,000
DIA1-DIA10	-44,02	17,74	5,61	-56,70	-31,33	-7,85	9	0,000
DIA2-DIA3	-6,14	5,58	1,61	-9,68	-2,59	-3,81	11	0,003
DIA2-DIA5	-12,14	11,08	3,20	-19,18	-5,10	-3,80	11	0,003
DIA2-DIA7	-12,20	7,88	2,28	-17,21	-7,19	-5,36	11	0,000
DIA2-DIA10	-39,29	19,24	5,80	-52,22	-26,37	-6,77	10	0,000
DIA3-DIA5	-6,00	7,13	2,06	-10,53	-1,47	-2,92	11	0,014
DIA3-DIA7	-6,07	9,49	2,74	-12,10	-0,04	-2,21	11	0,049
DIA3-DIA10	-33,40	16,77	5,06	-44,67	-22,13	-6,61	10	0,000
DIA5-DIA7	-0,07	12,91	3,73	-8,27	8,14	-0,02	11	0,986
DIA5-DIA10	-28,18	14,80	4,46	-38,13	-18,24	-6,32	10	0,000
DIA7-DIA10	-26,71	17,64	5,32	-38,57	-14,86	-5,02	10	0,001

Gráfica18: Evolución de la cicatrización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 ¶ Diferencias con día 7. § Diferencias con día 10.
 § Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Como se aprecia en los resultados anteriormente expuestos, existieron diferencias significativas entre todos los tiempos de estudio a excepción de entre el día 1 y 2 y entre los días 5 y 7, lo que nos indica que se produjo un incremento paulatino del porcentaje de cicatrización en las heridas tratadas con PRGF a medida que avanzaba el tiempo de estudio.

Presencia o ausencia de infección

La evaluación del aspecto macroscópico de las heridas nos permitió valorar de forma subjetiva la presencia o ausencia de infección de las mismas (Tabla 60).

Tabla 60: Evaluación del porcentaje de infección en las heridas del grupo PRGF.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENCIA	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Tal y como ocurrió en los dos grupos anteriores, todas las heridas cutáneas presentaron un aspecto macroscópico indicativo de ausencia de infección.

Color de la cicatriz

Encontramos los correspondientes datos del grupo PRGF al color de la cicatriz en todos los tiempos de estudio en la tabla 61.

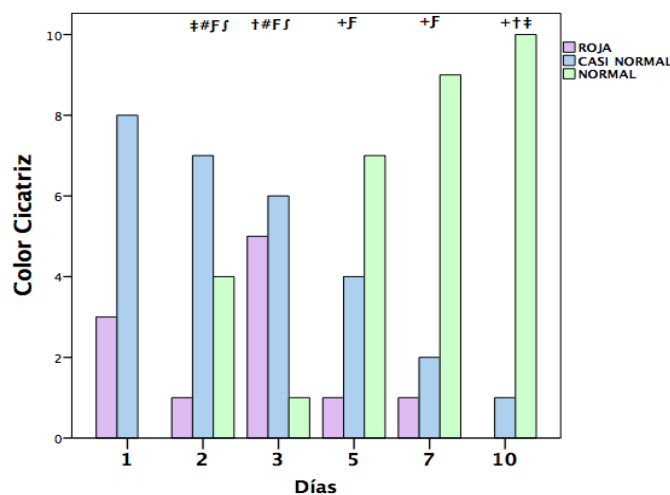
Tabla 61: Evaluación del color de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
ROJA	Recuento	3	1	5	1	1	0	11
	%	27,30%	9,10%	45,50%	9,10%	9,10%	0,00%	100,00%
CASI NORMAL	Recuento	8	7	6	4	2	1	28
	%	28,60%	25,00%	21,40%	14,30%	7,10%	3,60%	100,00%
NORMAL	Recuento	0	4	1	7	9	10	31
	%	0,00%	12,90%	3,20%	22,60%	29,00%	32,30%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Tal y como se ha realizado hasta el momento los datos obtenidos para la presente variable fueron sometidos a un estudio comparativo para valorar las diferencias significativas entre tiempos, y los resultados se muestran en la tabla 62 y gráfica 19.

Tabla 62: Estudio comparativo entre tiempos del factor color de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	34,892	10	0,000
Razón de verosimilitudes	40,965	10	0,000
Asociación lineal por lineal	20,839	1	0,000
N de casos válidos	70		

Gráfica 19: Evolución del color de la cicatriz de las heridas del grupo PRGF en el tiempo.

+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
F Diferencias con día 7. j Diferencias con día 10.

En los resultados obtenidos se muestra una evolución favorable del color de la cicatriz de las heridas infiltradas con PRGF. A medida que avanzan los tiempos de estudio, se consigue una

mejoría estadísticamente significativa del color en la mayoría de los animales entre los tiempos de estudio 5 y 10.

Grosor de la cicatriz

Con referencia al grosor de cicatriz en las heridas cutáneas, a continuación, en la tabla 63 se reflejan los resultados obtenidos para dicha variable.

Tabla 63: Evaluación del grosor de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

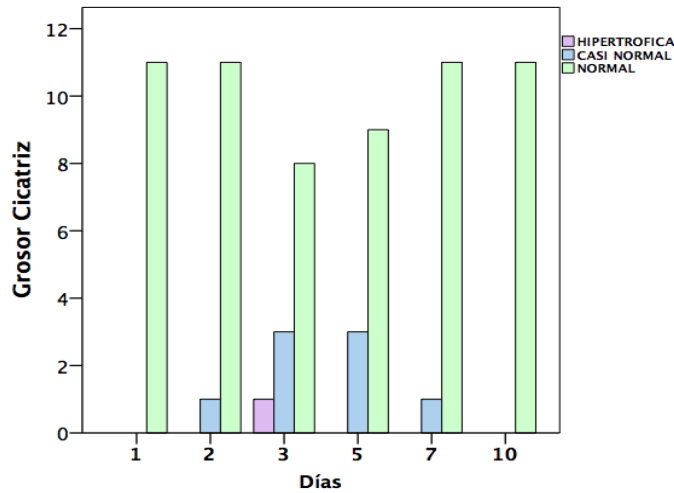
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
HIPERTRÓFICA	0	0	1	0	0	0	1	0
	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%
CASI NORMAL	0	1	3	3	1	0	8	0
	0,00%	12,50%	37,50%	37,50%	12,50%	0,00%	100,00%	0,00%
NORMAL	11	11	8	9	11	11	61	11
	18,00%	18,00%	13,10%	14,80%	18,00%	18,00%	100,00%	18,00%
TOTAL	11	12	12	12	12	11	70	11
	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%	15,70%

Los datos fueron sometidos posteriormente a un estudio estadístico comparativo entre tiempos de estudio, obteniendo los siguientes resultados reflejados en la tabla 64 y gráfica 20.

Tabla 64: Estudio comparativo entre tiempos del factor grosor de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,671	10	0,243
Razón de verosimilitudes	12,952	10	0,226
Asociación lineal por lineal	0,558	1	0,455
N de casos válidos	70		

Gráfica20: Evolución del grosor de la cicatriz de las heridas del grupo PRGF en el tiempo.



No existieron diferencias significativas entre ningún tiempo de estudio con respecto al grosor de la cicatriz en las heridas tratadas con PRGF.

Retracción de la cicatriz

La retracción de la cicatriz en las heridas cutáneas fue valorada en base a una escala numérica en la que se analizó si la retracción era severa, moderada o ausente. Los resultados se muestran en la tabla 65.

Tabla 65: Evaluación de la retracción de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

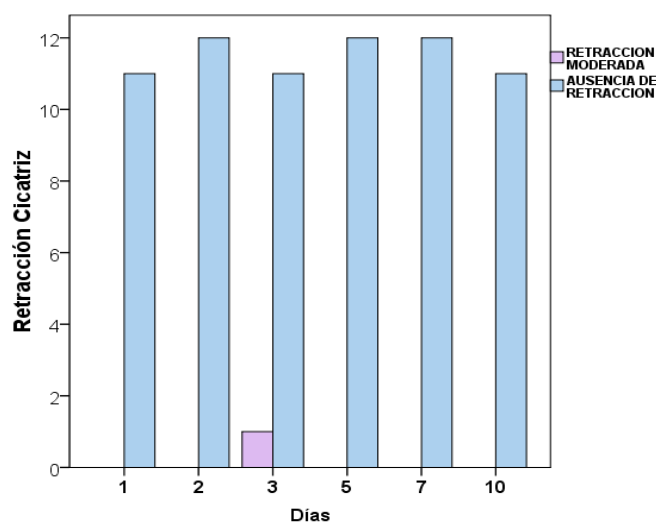
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
MODERADA	0	0	1	0	0	0	1	0
	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%	0,00%
AUSENCIA	11	12	11	12	12	11	69	11
	15,90%	17,40%	15,90%	17,40%	17,40%	15,90%	100,00%	15,90%
TOTAL	11	12	12	12	12	11	70	11
	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%	15,70%

A continuación, en la tabla 66 y gráfica 21 se muestran los resultados obtenidos de comparar los valores de cada uno de los tiempos de estudio para poder analizar la evolución de la retracción de la cicatriz en las heridas cutáneas en el tiempo.

Tabla 66: Estudio comparativo entre tiempos del factor retracción de la cicatriz en las heridas del grupo PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,903	5	0,428
Razón de verosimilitudes	3,599	5	0,609
Asociación lineal por lineal	0,292	1	0,589
N de casos válidos	70		

Gráfica 21: Evolución de la retracción de la cicatriz de las heridas del grupo PRGF en el tiempo.



Como se puede observar no existen diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a este parámetro. Apreciando en casi el 100% de los casos una ausencia de la retracción de la herida.

Estudio Microscópico

Dentro del estudio microscópico evaluamos la epitelización cutánea de las heridas, el proceso inflamatorio, la angiogénesis y el depósito de colágeno maduro.

Epitelización Cutánea

La epitelización cutánea se midió de forma directa sobre las preparaciones histológicas de hematoxilina-eosina y se expresó en forma de porcentaje. En la tabla 67 se muestran los resultados obtenidos de dicha variable.

Tabla 67: Evaluación de la epitelización cutánea en las heridas del grupo PRGF.

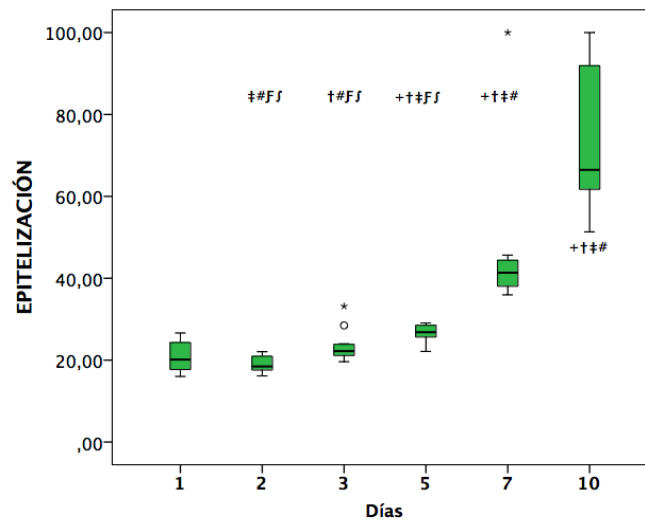
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	21,74	4,69	1,35	18,76	24,72	16,02	30,88
2	10	18,88	1,91	0,61	17,51	20,25	16,14	22,05
3	12	23,39	3,88	1,12	20,93	25,86	19,62	33,17
5	10	27,12	2,78	0,88	25,12	29,11	22,14	31,93
7	8	47,94	21,28	7,52	30,15	65,72	35,94	100
10	11	72,65	16,70	5,03	61,43	83,87	51,34	100
Total	63	34,67	22,12	2,79	29,10	40,24	16,02	100

Una vez obtenidos los datos se compararon entre cada uno de los tiempos para valorar las posibles diferencias entre los mismos. Los datos resultantes de estos estudios estadísticos se muestran en la tabla 68 y gráfica 22.

Tabla 68: Estudio comparativo entre tiempos del factor epitelización cutánea en las heridas del grupo PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	3,06	5,24	1,66	-0,69	6,81	1,85	9	0,098
DIA1-DIA3	-1,66	6,68	1,93	-5,90	2,59	-0,86	11	0,409
DIA1-DIA5	-4,86	6,38	2,02	-9,42	-0,30	-2,41	9	0,039
DIA1-DIA7	-26,21	19,37	6,85	-42,40	-10,02	-3,83	7	0,006
DIA1-DIA10	-50,39	18,52	5,59	-62,84	-37,95	-9,02	10	0,000
DIA2-DIA3	-5,01	3,86	1,22	-7,77	-2,24	-4,10	9	0,003
DIA2-DIA5	-9,03	2,99	1,00	-11,33	-6,74	-9,07	8	0,000
DIA2-DIA7	-28,99	21,83	7,72	-47,24	-10,74	-3,76	7	0,007
DIA2-DIA10	-53,30	17,80	5,93	-66,98	-39,63	-8,99	8	0,000
DIA3-DIA5	-4,11	4,29	1,36	-7,18	-1,05	-3,03	9	0,014
DIA3-DIA7	-24,12	21,81	7,71	-42,35	-5,89	-3,13	7	0,017
DIA3-DIA10	-49,26	17,59	5,30	-61,08	-37,44	-9,29	10	0,000
DIA5-DIA7	-20,44	21,96	7,76	-38,80	-2,08	-2,63	7	0,034
DIA5-DIA10	-43,99	15,73	5,24	-56,09	-31,90	-8,39	8	0,000
DIA7-DIA10	-20,34	30,12	11,38	-48,19	7,52	-1,79	6	0,124

Gráfica 22: Evolución de la epitelización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 J Diferencias con día 7. † Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Como se puede observar en los resultados anteriores, se muestra un aumento lento pero progresivo del porcentaje de epitelización cutánea en las heridas cutáneas infiltradas con PRGF a medida que avanzan los tiempos de estudio. Dicho incremento muestra diferencias estadísticamente significativas a partir del día 2 hasta el día 10 del estudio. En este caso el intervalo de tiempo en el que encontramos un porcentaje de epitelización más rápido es entre los días 5 y 10.

Inflamación

En cuanto a la valoración de la reacción inflamatoria expresada por las heridas cutáneas, se decidió evaluar la intensidad y la distribución de la reacción inflamatoria.

Intensidad Inflamatoria

En primer lugar se evaluó la intensidad del infiltrado inflamatorio en la dermis de las heridas en cada tiempo de estudio. Dichos resultados se encuentran detallados en la tabla 69.

Tabla 69: Evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo PRGF.

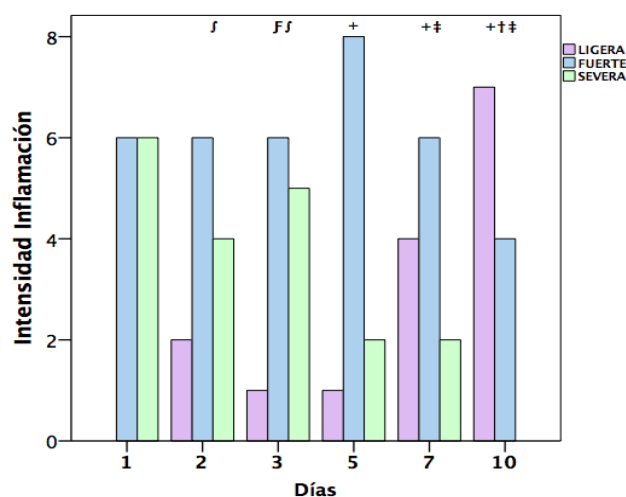
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
LIGERA	Recuento	0	2	1	1	4	7	15
	%	0,00%	13,30%	6,70%	6,70%	26,70%	46,70%	100,00%
FUERTE	Recuento	6	6	6	8	6	4	36
	%	16,70%	16,70%	16,70%	22,20%	16,70%	11,10%	100,00%
SEVERA	Recuento	6	4	5	2	2	0	19
	%	31,60%	21,10%	26,30%	10,50%	10,50%	0,00%	100,00%
TOTAL	Recuento	12	12	12	11	12	11	70
	%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	17,10%	15,70%	100,00%

Los datos obtenidos fueron sometidos a un estudio estadístico comparativo entre tiempos para el estudio de posibles diferencias significativas entre los mismos. La tabla 70 muestra en rojo la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre tiempos, las cuales se detallan gráficamente en la gráfica 23.

Tabla 70: Estudio comparativo sobre la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	23,062	10	0,011
Razón de verosimilitudes	25,29	10	0,005
Asociación lineal por lineal	17,6	1	0,000
N de casos válidos	70		

Gráfica 23: Evolución de la intensidad de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo PRGF en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
F Diferencias con día 7. J Diferencias con día 10.

Comenzamos a apreciar diferencias significativas entre tiempos mayoritariamente a partir del día 2 de estudio, donde se aprecia que al comienzo del estudio las heridas tratadas con PRGF presentaron una reacción inflamatoria fuerte y severa, la cual desciende conforme avanza el tiempo en el estudio, hasta predominar mayoritariamente la inflamación ligera a día 10 del estudio.

Distribución de la reacción inflamatoria

En segundo y último lugar con referencia a la valoración de la distribución de la inflamación, mostramos los resultados obtenidos tras el análisis de los datos para dicha variable en la tabla 71.

Tabla 71: Evaluación de la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo PRGF.

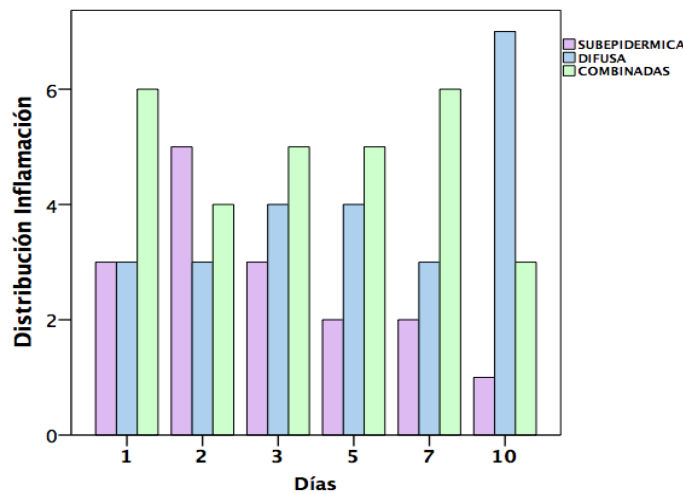
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
SUBEPIDÉRMICA	Recuento	3	5	3	2	2	1	16
	%	18,80%	31,30%	18,80%	12,50%	12,50%	6,30%	100,00%
DIFUSA	Recuento	3	3	4	4	3	7	24
	%	12,50%	12,50%	16,70%	16,70%	12,50%	29,20%	100,00%
COMBINADAS	Recuento	6	4	5	5	6	3	29
	%	20,70%	13,80%	17,20%	17,20%	20,70%	10,30%	100,00%
TOTAL	Recuento	12	12	12	11	11	11	69
	%	17,40%	17,40%	17,40%	15,90%	15,90%	15,90%	100,00%

Tras la descripción de los datos pasamos a exponer el estudio estadístico de dicha variable de forma comparativa entre tiempos en la tabla 72 y gráfica 24.

Tabla 72: Estudio comparativo sobre la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo PRGF.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,877	10	0,641
Razón de verosimilitudes	7,454	10	0,682
Asociación lineal por lineal	0,288	1	0,592
N de casos válidos	69		

Gráfica 24: Evolución de la distribución de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo PRGF en el tiempo.



En el caso de la variable distribución de la reacción inflamatoria en las heridas tratadas con PRGF no encontramos diferencias significativas entre tiempos. Se muestra una tendencia de encontrar una distribución más localizada a tiempos tempranos de estudio y acaban dando lugar a una distribución de la reacción inflamatoria más difusa.

Angiogénesis

La contabilización de la formación de nuevos vasos sanguíneos fue evaluado de forma objetiva en las preparaciones histológicas teñidas con tricrómico de masson. Los resultados se encuentran expuestos en la tabla 73.

Tabla 73: Evaluación de la angiogénesis en las heridas del grupo PRGF.

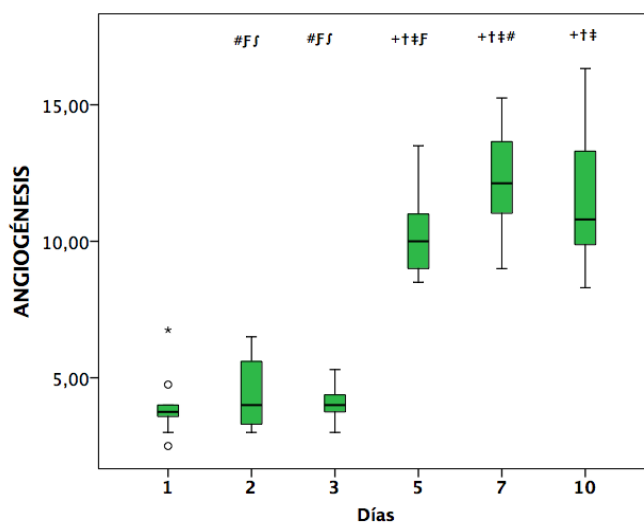
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95% Inferior	Superior	Mínimo	Máximo
1	12	4,10	1,13	0,33	3,38	4,81	2,5	6,75
2	11	4,35	1,30	0,39	3,48	5,23	3	6,5
3	11	4,06	0,62	0,19	3,64	4,47	3	5,3
5	11	9,38	2,43	0,73	7,75	11,02	4	13,5
7	12	12,09	2,40	0,69	10,57	13,62	7	15,25
10	8	11,57	2,61	0,92	9,39	13,75	8,3	16,33
Total	65	7,42	3,97	0,49	6,44	8,41	2,5	16,33

La tabla 74 y gráfica 25 muestra el estudio comparativo realizado para esta variable entre tiempos.

Tabla 74: Estudio comparativo entre tiempos del factor angiogénesis en las heridas del grupo PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95% Inferior	Superior	t	gl	Sig
DIA1-DIA2	-0,16	2,04	0,62	-1,53	1,21	-0,26	10	0,802
DIA1-DIA3	0,07	1,47	0,44	-0,92	1,06	0,16	10	0,879
DIA1-DIA5	-5,14	2,84	0,86	-7,05	-3,23	-6,01	10	0,000
DIA1-DIA7	-8,00	2,19	0,63	-9,39	-6,60	-12,63	11	0,000
DIA1-DIA10	-7,43	2,43	0,86	-9,46	-5,40	-8,65	7	0,000
DIA2-DIA3	0,33	1,31	0,42	-0,61	1,26	0,78	9	0,454
DIA2-DIA5	-5,06	3,38	1,07	-7,48	-2,63	-4,72	9	0,001
DIA2-DIA7	-8,02	3,17	0,95	-10,15	-5,89	-8,40	10	0,000
DIA2-DIA10	-7,35	3,34	1,18	-10,14	-4,55	-6,22	7	0,000
DIA3-DIA5	-5,42	2,68	0,85	-7,33	-3,50	-6,39	9	0,000
DIA3-DIA7	-8,20	2,52	0,76	-9,89	-6,50	-10,78	10	0,000
DIA3-DIA10	-7,50	2,81	0,99	-9,85	-5,16	-7,56	7	0,000
DIA5-DIA7	-2,70	3,28	0,99	-4,90	-0,49	-2,73	10	0,021
DIA5-DIA10	-2,15	3,70	1,31	-5,25	0,94	-1,65	7	0,144
DIA7-DIA10	0,75	2,25	0,79	-1,13	2,62	0,94	7	0,378

Gráfica 25: Evolución de la angiogénesis en el tiempo de las heridas del grupo AMSC+PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 † Diferencias con día 7. † Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El diagrama de cajas obtenido para el estudio de la variable angiogénesis en las heridas tratadas con PRGF muestra diferencias significativas a partir del día 3 del estudio, existe un incremento rápido de la angiogénesis, especialmente entre los 3 y 5 días de estudio, en cuyo periodo la nueva formación de vasos sanguíneos llega a duplicarse. El proceso de angiogénesis sin embargo, se mantiene estable y constante entre los intervalos de tiempo 1 y 3 y 7 y 10 días de estudio.

Porcentaje de colágeno

El depósito de colágeno maduro en las heridas cutáneas fue evaluado objetivamente a lo largo de todos los tiempos de estudio y expresado en forma de porcentaje. Los datos se encuentran expuestos en la tabla 75.

Tabla 75: Evaluación del porcentaje de colágeno en las heridas del grupo PRGF.

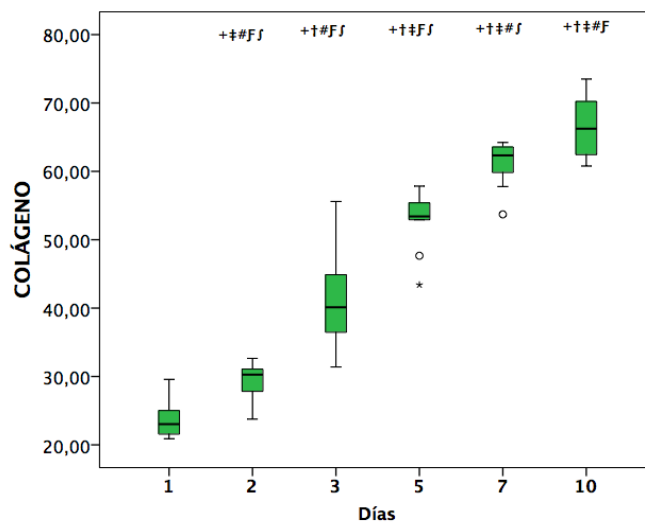
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	23,61	2,55	0,74	22,00	25,23	20,9	29,58
2	11	28,71	3,00	0,90	26,70	30,73	23,76	32,65
3	11	41,46	6,86	2,07	36,85	46,06	31,39	55,6
5	11	53,33	4,25	1,28	50,48	56,19	43,4	57,84
7	12	59,43	6,68	1,93	55,18	63,67	40,76	64,44
10	8	66,51	4,71	1,66	62,58	70,45	60,78	73,5
Total	65	44,42	16,27	2,02	40,39	48,45	20,9	73,5

La tabla 76 y la gráfica 26 muestra las diferencias significativas que encontramos entre tiempos de estudio.

Tabla 76: Estudio comparativo entre tiempos del factor porcentaje de colágeno en las heridas del grupo PRGF.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-8,90	4,42	1,47	-12,30	-5,50	-6,04	8	0,000
DIA1-DIA3	-21,47	8,87	2,96	-28,29	-14,65	-7,26	8	0,000
DIA1-DIA5	-31,26	5,85	1,95	-35,76	-26,76	-16,02	8	0,000
DIA1-DIA7	-38,68	3,95	1,14	-41,19	-36,17	-33,94	11	0,000
DIA1-DIA10	-46,06	3,83	1,15	-48,63	-43,49	-39,90	10	0,000
DIA2-DIA3	-11,27	5,87	2,22	-16,69	-5,84	-5,08	6	0,002
DIA2-DIA5	-23,27	7,21	2,73	-29,94	-16,60	-8,54	6	0,000
DIA2-DIA7	-29,42	3,93	1,31	-32,44	-26,40	-22,44	8	0,000
DIA2-DIA10	-36,73	4,14	1,38	-39,91	-33,55	-26,62	8	0,000
DIA3-DIA5	-11,59	10,20	4,17	-22,30	-0,88	-2,78	5	0,039
DIA3-DIA7	-16,53	6,83	2,28	-21,78	-11,28	-7,26	8	0,000
DIA3-DIA10	-25,27	7,63	2,70	-31,64	-18,89	-9,37	7	0,000
DIA5-DIA7	-6,52	6,53	2,18	-11,54	-1,50	-3,00	8	0,017
DIA5-DIA10	-14,07	5,67	1,89	-18,44	-9,71	-7,44	8	0,000
DIA7-DIA10	-7,84	2,77	0,84	-9,71	-5,98	-9,37	10	0,000

Gráfica 26: Evolución del porcentaje de colágeno en el tiempo en las heridas del grupo PRGF.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 † Diferencias con día 7. ‡ Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Claramente se aprecia que existen diferencias significativas entre todos los tiempos de estudio. El depósito de colágeno se incrementa de forma exponencial a medida que avanza el tiempo de estudio desde el primer día de estudio hasta el último.

Grupo Placebo: Estudio Descriptivo y Comparativo del Factor Tiempo

En este capítulo se van a exponer los resultados del grupo de heridas cutáneas tratadas con Placebo para cada una de las variables evaluadas en los diferentes tiempos de estudio de forma individual.

Estudio Macroscópico

Al igual que en los otros tres grupos se evaluó la cicatrización cutánea, la presencia/ausencia de infección, el color, el grosor y la retracción de las heridas cutáneas a lo largo del estudio experimental.

Cicatrización cutánea

Esta variable se calculó en forma de porcentaje. Se muestran los resultados obtenidos de la cicatrización en la tabla 77.

Tabla 77: Evaluación de la cicatrización cutánea en las heridas del grupo Placebo.

Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	11	13,05	3,81	1,15	10,50	15,61	8,14	18,26
2	12	20,19	4,79	1,38	17,15	23,24	14,43	28,82
3	12	27,39	5,29	1,53	24,03	30,75	16,45	34,89
5	12	29,52	4,04	1,17	26,95	32,09	21,89	35,19
7	12	39,04	9,63	2,78	32,92	45,16	22,17	54,13
10	11	64,73	18,66	5,63	52,19	77,26	42,58	100
Total	70	32,13	18,54	2,22	27,71	36,55	8,14	100

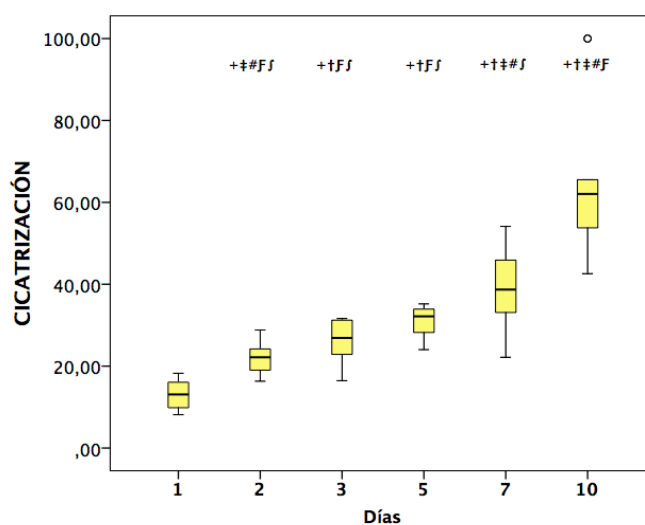
Una vez presentados los datos de forma descriptiva, se llevó a cabo el estudio comparativo entre los distintos tiempos de estudio, resaltando las diferencias significativas entre tiempos en rojo (Tabla 78).

Tabla 78: Estudio comparativo entre tiempos del factor cicatrización cutánea en las heridas del grupo Placebo.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo confianza 95% Inferior	Superior	t	gl	Sig
DIA1-DIA2	-7,25	5,29	1,60	-10,81	-3,69	-4,54	10	0,001
DIA1-DIA3	-13,97	6,77	2,04	-18,52	-9,42	-6,84	10	0,000
DIA1-DIA5	-16,73	5,62	1,70	-20,51	-12,95	-9,87	10	0,000
DIA1-DIA7	-25,39	11,46	3,45	-33,09	-17,69	-7,35	10	0,000
DIA1-DIA10	-52,55	20,05	6,34	-66,89	-38,21	-8,29	9	0,000
DIA2-DIA3	-7,20	6,31	1,82	-11,21	-3,19	-3,95	11	0,002
DIA2-DIA5	-9,32	6,51	1,88	-13,46	-5,19	-4,96	11	0,000
DIA2-DIA7	-18,85	10,20	2,94	-25,33	-12,37	-6,40	11	0,000
DIA2-DIA10	-44,04	18,51	5,58	-56,47	-31,60	-7,89	10	0,000
DIA3-DIA5	-2,13	7,51	2,17	-6,90	2,64	-0,98	11	0,347
DIA3-DIA7	-11,65	12,19	3,52	-19,39	-3,91	-3,31	11	0,007
DIA3-DIA10	-36,92	16,67	5,03	-48,12	-25,72	-7,35	10	0,000
DIA5-DIA7	-9,53	9,25	2,67	-15,40	-3,65	-3,57	11	0,004
DIA5-DIA10	-35,20	20,39	6,15	-48,89	-21,50	-5,73	10	0,000
DIA7-DIA10	-25,12	23,30	7,03	-40,77	-9,46	-3,58	10	0,005

En la gráfica 27 podemos ver de una forma más visual los resultados obtenidos así como las diferencias entre los tiempos.

Gráfica 27: Evolución de la cicatrización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo Placebo en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
†‡ Diferencias con día 7. †‡# Diferencias con día 10.
° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tiempos de estudio a excepción de entre el día 3 y 5. Lo que muestra una evolución progresiva del porcentaje de cicatrización en las heridas tratadas con placebo a lo largo del estudio.

Presencia o ausencia de infección

La tabla 79 muestra los resultados tras la evaluación de la presencia/ausencia de infección en las heridas cutáneas.

Tabla 79: Evaluación del porcentaje de infección en las heridas del grupo Placebo.

		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
AUSENCIA	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Debido a que todas las heridas carecían de signos de infección, no se realizó el estudio comparativo de dichos datos.

Color de la cicatriz

En la tabla 80 se exponen los datos correspondientes al color de la cicatriz de las heridas cutáneas en todos los tiempos de estudio para el grupo placebo.

Tabla 80: Evaluación del color de la cicatriz en las heridas del grupo Placebo.

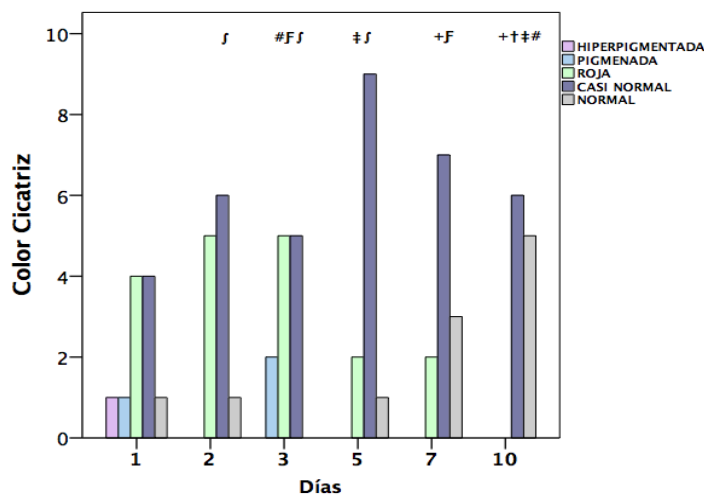
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
HIPERPIGMENTADA	Recuento	1	0	0	0	0	0	1
	%	100,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
PIGMENTADA	Recuento	1	0	2	0	0	0	3
	%	33,30%	0,00%	66,70%	0,00%	0,00%	0,00%	100,00%
ROJA	Recuento	4	5	5	2	2	0	18
	%	22,20%	27,80%	27,80%	11,10%	11,10%	0,00%	100,00%
CASI NORMAL	Recuento	4	6	5	9	7	6	37
	%	10,80%	16,20%	13,50%	24,30%	18,90%	16,20%	100,00%
NORMAL	Recuento	1	1	0	1	3	5	11
	%	9,10%	9,10%	0,00%	9,10%	27,30%	45,50%	100,00%
TOTAL	Recuento	11	12	12	12	12	11	70
	%	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

A continuación se realizó la comparación entre tiempos de dicha variable, cuyos resultados se exponen en la tabla 81, y en la gráfica 28.

Tabla 81: Estudio comparativo entre tiempos del factor color de la cicatriz en las heridas del grupo Placebo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	30,646	20	0,06
Razón de verosimilitudes	31,387	20	0,05
Asociación lineal por lineal	15,986	1	0,000
N de casos válidos	70		

Gráfica 28: Evolución del color de la cicatriz de las heridas del grupo Placebo en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 F' Diferencias con día 7. J Diferencias con día 10.

Como se observa en la gráfica anterior existen diferencias significativas en el grosor de la cicatriz de las heridas cutáneas tratadas con PCB a lo largo del estudio, observando como la gran mayoría de las heridas presentaban un grosor prácticamente normal al final del estudio.

Retracción de la cicatriz

Con referencia a la retracción de las heridas, los datos obtenidos en cada tiempo de estudio se reflejan a continuación en la tabla 84. Posteriormente, y tras el estudio estadístico de dicha variable, la comparativa entre tiempos se muestra en la tabla 85 y gráfica 30.

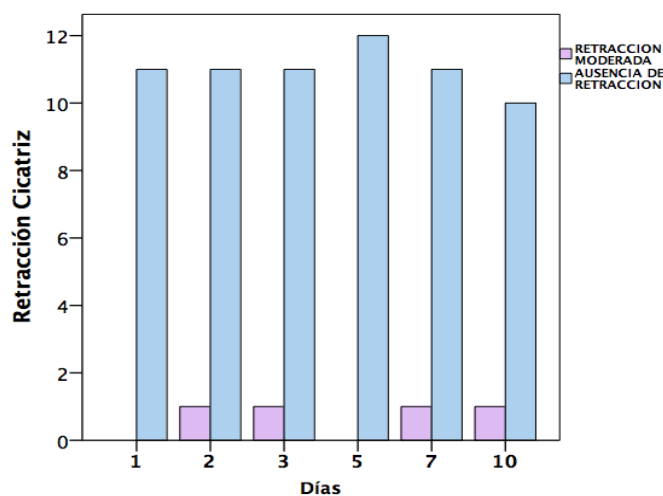
Tabla 84: Evaluación de la retracción de la cicatriz en las heridas del grupo Placebo.

	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
MODERADA	0	1	1	0	1	1	4
	0,00%	25,00%	25,00%	0,00%	25,00%	25,00%	100,00%
AUSENCIA	11	11	11	12	11	10	66
	16,70%	16,70%	16,70%	18,20%	16,70%	15,20%	100,00%
TOTAL	11	12	12	12	12	11	70
	15,70%	17,10%	17,10%	17,10%	17,10%	15,70%	100,00%

Tabla 85: Estudio comparativo entre tiempos del factor retracción de la cicatriz en las heridas del grupo Placebo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,085	5	0,837
Razón de verosimilitudes	3,31	5	0,652
Asociación lineal por lineal	0,333	1	0,564
N de casos válidos	70		

Gráfica 30: Evolución de la retracción de la cicatriz de las heridas del grupo Placebo en el tiempo.



Como podemos ver en la tabla y en la gráfica anteriores no existen diferencias significativas entre tiempos, es decir que la retracción de las heridas se mantuvo constante a lo largo del estudio.

Estudio Microscópico

Al igual que en grupos anteriores este parámetro fue evaluado mediante la medición de la epitelización cutánea, el estudio de la reacción inflamatoria, la angiogénesis y el depósito de colágeno maduro.

Epitelización Cutánea

La tabla 86 muestra los resultados obtenidos tras la evaluación de la epitelización cutánea a lo largo de los tiempos de estudio.

Tabla 86: Evaluación de la epitelización cutánea en las heridas del grupo Placebo.

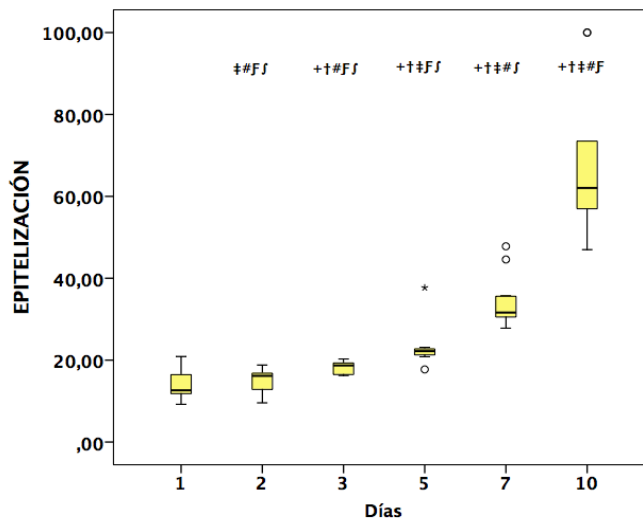
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	13,73	3,60	1,04	11,45	16,02	9,22	20,89
2	12	15,15	2,67	0,77	13,45	16,85	9,57	18,81
3	12	18,23	1,63	0,47	17,19	19,26	16,2	20,7
5	10	23,71	5,35	1,69	19,89	27,54	17,73	37,69
7	11	34,28	6,37	1,92	30,00	38,56	27,81	47,8
10	10	67,62	19,08	6,03	53,97	81,27	46,99	100
Total	67	27,70	19,87	2,43	22,85	32,54	9,22	100

Tras la comparación entre tiempos de la epitelización cutánea en el grupo placebo, obtuvimos los siguientes resultados, mostrados a continuación en la tabla 87 y gráfica 31.

Tabla 87: Estudio comparativo entre tiempos del factor epitelización cutánea en las heridas del grupo Placebo.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-1,42	3,37	0,97	-3,56	0,72	-1,46	11	0,172
DIA1-DIA3	-4,50	4,41	1,27	-7,30	-1,70	-3,53	11	0,005
DIA1-DIA5	-9,88	7,38	2,33	-15,16	-4,60	-4,23	9	0,002
DIA1-DIA7	-20,43	6,94	2,09	-25,10	-15,77	-9,76	10	0,000
DIA1-DIA10	-53,27	21,33	6,75	-68,53	-38,01	-7,90	9	0,000
DIA2-DIA3	-3,08	2,93	0,85	-4,94	-1,22	-3,64	11	0,004
DIA2-DIA5	-8,12	6,93	2,19	-13,08	-3,16	-3,71	9	0,005
DIA2-DIA7	-19,28	5,67	1,71	-23,09	-15,47	-11,28	10	0,000
DIA2-DIA10	-52,28	20,61	6,52	-67,02	-37,54	-8,02	9	0,000
DIA3-DIA5	-5,39	5,81	1,84	-9,55	-1,23	-2,93	9	0,017
DIA3-DIA7	-15,89	6,04	1,82	-19,95	-11,84	-8,73	10	0,000
DIA3-DIA10	-49,51	19,12	6,05	-63,18	-35,83	-8,19	9	0,000
DIA5-DIA7	-11,58	9,74	3,25	-19,06	-4,09	-3,57	8	0,007
DIA5-DIA10	-44,38	16,82	5,95	-58,44	-30,31	-7,46	7	0,000
DIA7-DIA10	-31,87	20,95	6,98	-47,97	-15,76	-4,56	8	0,002

Gráfica 31: Evolución de la epitelización cutánea expresada en porcentaje en las heridas del grupo Placebo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. § Diferencias con día 5.
¶ Diferencias con día 7. ★ Diferencias con día 10.

○ Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

La epitelización cutánea del grupo placebo mostró diferencias significativas a partir del día 2 de estudio, mostrando un incremento progresivo pero lento del porcentaje de epitelización de las heridas a lo largo del tiempo, con un porcentaje de epitelización más rápido entre los días 7 y 10.

Inflamación

La inflamación se muestra en forma de intensidad inflamatoria y según su distribución.

Intensidad Inflamatoria

Tras la evaluación subjetiva de la intensidad inflamatoria obtuvimos los datos que se muestran en la tabla 88.

Tabla 88: Evaluación de la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo Placebo.

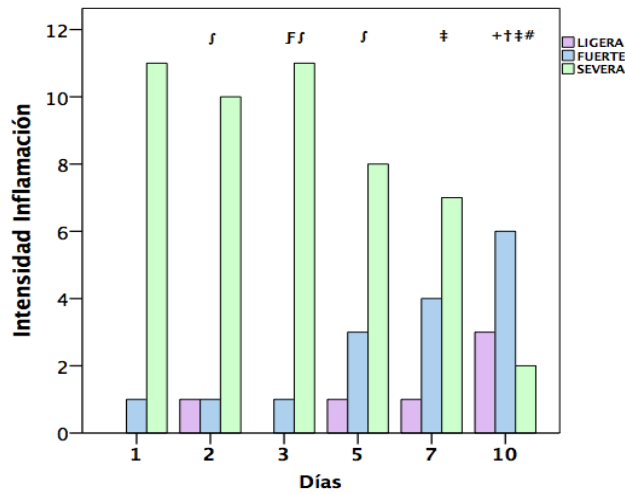
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
LIGERA	0	1	0	1	1	3	6	0
	0,00%	16,70%	0,00%	16,70%	16,70%	50,00%	100,00%	0,00%
FUERTE	1	1	1	3	4	6	16	1
	6,30%	6,30%	6,30%	18,80%	25,00%	37,50%	100,00%	6,30%
SEVERA	11	10	11	8	7	2	49	11
	22,40%	20,40%	22,40%	16,30%	14,30%	4,10%	100,00%	22,40%
TOTAL	12	12	12	12	12	11	71	12
	16,90%	16,90%	16,90%	16,90%	16,90%	15,50%	100,00%	16,90%

Una vez realizado el estudio comparativo entre tiempos, para la intensidad inflamatoria se muestra los resultados obtenidos en la tabla 89 y gráfica 32

Tabla 89: Estudio comparativo sobre la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo Placebo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	21,984	10	0,015
Razón de verosimilitudes	23,356	10	0,01
Asociación lineal por lineal	17,176	1	0,000
N de casos válidos	71		

Gráfica 32: Evolución de la intensidad de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo Placebo en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
 F Diferencias con día 7. J Diferencias con día 10.

Se pueden observar claramente una intensidad inflamatoria muy severa en la gran mayoría de las heridas cutáneas durante los primeros días de estudio, la cual va disminuyendo progresivamente y de forma estadísticamente significativa a lo largo del estudio, aún predominando al final del estudio una inflamación fuerte.

Distribución de la reacción inflamatoria

A continuación se exponen los resultados obtenidos tras la evaluación de la distribución de la reacción inflamatoria (Tabla 90).

Tabla 90: Evaluación de la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo Placebo.

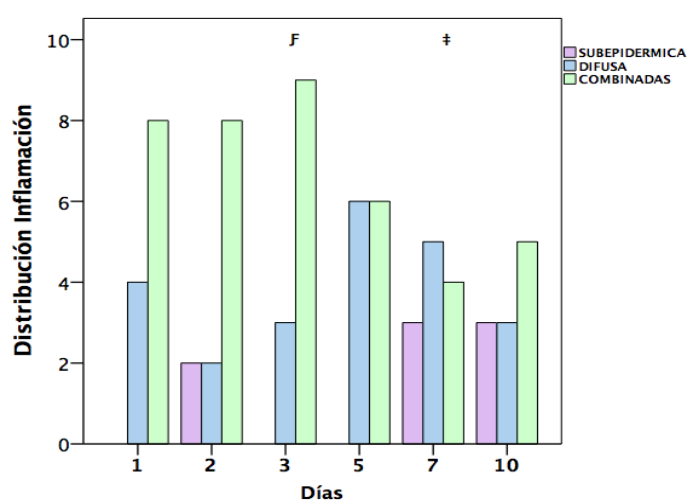
		DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 10	TOTAL
SUBEPIDÉRMICA	Recuento	0	2	0	0	3	3	8
	%	0,00%	25,00%	0,00%	0,00%	37,50%	37,50%	100,00%
DIFUSA	Recuento	4	2	3	6	5	3	23
	%	17,40%	8,70%	13,00%	26,10%	21,70%	13,00%	100,00%
COMBINADAS	Recuento	8	8	9	6	4	5	40
	%	20,00%	20,00%	22,50%	15,00%	10,00%	12,50%	100,00%
TOTAL	Recuento	12	12	12	12	12	11	71
	%	16,90%	16,90%	16,90%	16,90%	16,90%	15,50%	100,00%

La tabla 91 y la gráfica 33 muestran los resultados obtenidos tras el estudio comparativo de la presente variable.

Tabla 91: Estudio comparativo sobre la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas del grupo Placebo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	14,194	10	0,164
Razón de verosimilitudes	17,12	10	0,072
Asociación lineal por lineal	5,829	1	0,016
N de casos válidos	71		

Gráfica 33: Evolución de la distribución de la reacción inflamatoria de las heridas del grupo Placebo en el tiempo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. § Diferencias con día 5.
¶ Diferencias con día 7. ∫ Diferencias con día 10.

Tal y como se puede apreciar al principio del estudio y hasta el día tres predomina la distribución difusa y combinada del infiltrado inflamatorio y hacia el final del estudio la distribución difusa también se ve combinada con la focalizada a nivel subepidérmico, mostrando diferencias significativas entre el día 3 y 7 en el grupo placebo.

Angiogénesis

La angiogénesis se evaluó de forma objetiva en las preparaciones histológicas teñidas con tricrómico de masson, y los resultados de la misma se muestran a continuación en la tabla 92.

Tabla 92: Evaluación de la angiogénesis en las heridas del grupo Placebo.

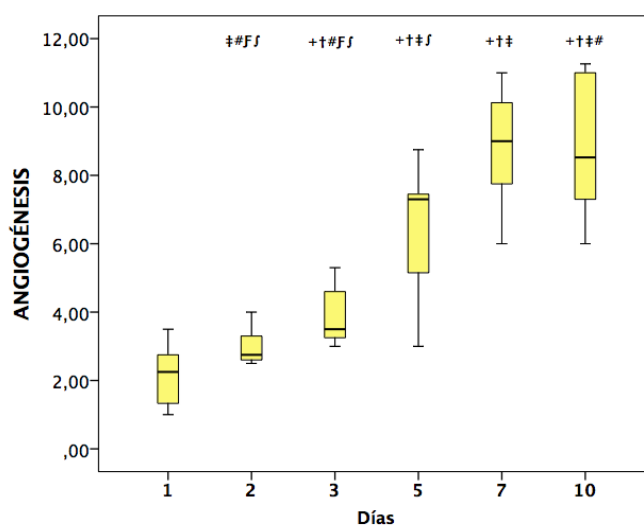
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Inferior	Superior		
1	12	2,26	1,00	0,29	1,63	2,90	1	4
2	9	2,97	0,53	0,18	2,57	3,38	2,5	4
3	9	3,89	0,86	0,29	3,23	4,55	3	5,3
5	10	6,78	1,86	0,59	5,45	8,11	3	8,75
7	12	8,51	1,95	0,56	7,27	9,75	5	11
10	11	9,06	1,83	0,55	7,82	10,29	6	11,26
Total	63	5,69	3,10	0,39	4,91	6,47	1	11,26

En la tabla 93 se observan los resultados de comparar esta variable en cada uno de los tiempos de estudio, pudiendo observar la evolución de dicho parámetro en la gráfica 34.

Tabla 93: Estudio comparativo entre tiempos del factor angiogénesis en las heridas del grupo Placebo.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95%		t	gl	Sig
				Inferior	Superior			
DIA1-DIA2	-0,29	1,05	0,35	-1,09	0,52	-0,82	8	0,434
DIA1-DIA3	-1,57	1,46	0,49	-2,68	-0,45	-3,23	8	0,012
DIA1-DIA5	-4,46	2,04	0,64	-5,92	-3,01	-6,93	9	0,000
DIA1-DIA7	-6,25	1,81	0,52	-7,40	-5,10	-11,98	11	0,000
DIA1-DIA10	-6,68	1,94	0,58	-7,98	-5,37	-11,42	10	0,000
DIA2-DIA3	-1,16	0,93	0,35	-2,03	-0,30	-3,31	6	0,016
DIA2-DIA5	-3,71	2,55	0,90	-5,84	-1,58	-4,12	7	0,004
DIA2-DIA7	-5,68	2,09	0,70	-7,29	-4,07	-8,14	8	0,000
DIA2-DIA10	-6,01	1,92	0,64	-7,49	-4,53	-9,37	8	0,000
DIA3-DIA5	-3,49	1,20	0,45	-4,60	-2,39	-7,73	6	0,000
DIA3-DIA7	-4,28	2,61	0,87	-6,29	-2,28	-4,93	8	0,001
DIA3-DIA10	-4,86	2,29	0,81	-6,77	-2,94	-6,01	7	0,001
DIA5-DIA7	-1,79	3,02	0,96	-3,95	0,38	-1,87	9	0,095
DIA5-DIA10	-2,35	2,53	0,80	-4,16	-0,54	-2,94	9	0,016
DIA7-DIA10	-0,59	2,86	0,86	-2,51	1,33	-0,68	10	0,511

Gráfica 34: Evolución de la angiogénesis en el tiempo de las heridas del grupo Placebo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
†‡ Diferencias con día 7. †‡‡ Diferencias con día 10.

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

La angiogénesis en el grupo placebo se incrementa de forma positiva y progresiva desde el día 2 hasta el día 5 del estudio, no habiendo cambios significativos entre los intervalos de días 1 y 2 y 5 y 7 de estudio.

Porcentaje de colágeno

En la tabla 94 se presentan los datos obtenidos tras la evaluación del porcentaje de colágeno en los distintos tiempos de estudio.

Tabla 94: Evaluación del porcentaje de colágeno en las heridas del grupo Placebo.

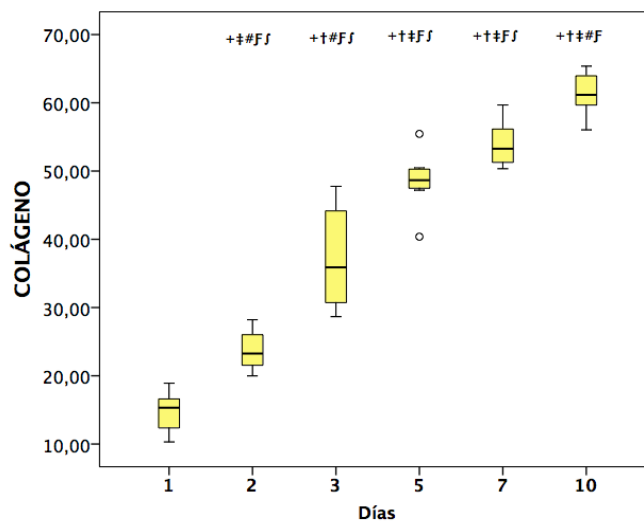
Días	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo confianza 95% Inferior	Intervalo confianza 95% Superior	Mínimo	Máximo
1	12	15,26	3,18	0,92	13,24	17,28	10,31	20,26
2	9	23,89	2,85	0,95	21,70	26,08	19,98	28,21
3	9	36,98	7,35	2,45	31,33	42,63	28,66	47,76
5	9	46,94	5,43	1,81	42,77	51,11	37,42	55,45
7	12	53,94	2,91	0,84	52,09	55,79	50,34	59,68
10	11	61,26	2,62	0,79	59,50	63,02	56,04	65,37
Total	62	39,91	17,42	2,21	35,49	44,33	10,31	65,37

Posteriormente, y al igual que para el resto de variables se realizó un estudio comparativo de dichos datos y los resultados, los cuales se muestran en la tabla 95 y gráfica 35.

Tabla 95: Estudio comparativo entre tiempos del factor porcentaje de colágeno en las heridas del grupo Placebo.

	Media	Desviación típ.	Error típ. de media	Intervalo Confianza 95% Inferior	Superior	t	gl	Sig
DIA1-DIA2	-8,90	4,42	1,47	-12,30	-5,50	-6,04	8	0,000
DIA1-DIA3	-21,47	8,87	2,96	-28,29	-14,65	-7,26	8	0,000
DIA1-DIA5	-31,26	5,85	1,95	-35,76	-26,76	-16,02	8	0,000
DIA1-DIA7	-38,68	3,95	1,14	-41,19	-36,17	-33,94	11	0,000
DIA1-DIA10	-46,06	3,83	1,15	-48,63	-43,49	-39,90	10	0,000
DIA2-DIA3	-11,27	5,87	2,22	-16,69	-5,84	-5,08	6	0,002
DIA2-DIA5	-23,27	7,21	2,73	-29,94	-16,60	-8,54	6	0,000
DIA2-DIA7	-29,42	3,93	1,31	-32,44	-26,40	-22,44	8	0,000
DIA2-DIA10	-36,73	4,14	1,38	-39,91	-33,55	-26,62	8	0,000
DIA3-DIA5	-11,59	10,20	4,17	-22,30	-0,88	-2,78	5	0,039
DIA3-DIA7	-16,53	6,83	2,28	-21,78	-11,28	-7,26	8	0,000
DIA3-DIA10	-25,27	7,63	2,70	-31,64	-18,89	-9,37	7	0,000
DIA5-DIA7	-6,52	6,53	2,18	-11,54	-1,50	-3,00	8	0,017
DIA5-DIA10	-14,07	5,67	1,89	-18,44	-9,71	-7,44	8	0,000
DIA7-DIA10	-7,84	2,77	0,84	-9,71	-5,98	-9,37	10	0,000

Gráfica 35: Evolución del porcentaje de colágeno en el tiempo en las heridas del grupo Placebo.



+ Diferencias con día 1. † Diferencias con día 2. ‡ Diferencias con día 3. # Diferencias con día 5.
F Diferencias con día 7. f Diferencias con día 10.

○ Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El estudio estadístico del porcentaje de colágeno muestra diferencias significativas entre todos los tiempos de estudio. El depósito de fibras de colágeno maduras en las heridas tratadas con placebo muestra una evolución positiva y creciente a lo largo del estudio.

Estudio comparativo del factor tratamiento

Con el fin de poder evaluar las diferencias que existieron entre cada uno de los grupos en todos los tiempos de estudio, se realizó un estudio comparativo entre ellos con el test no paramétrico de la prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes.

Los resultados obtenidos en cada una de las variables en los cuatro grupos y en los seis tiempos de estudio se muestran a continuación en forma de tabla. Seguidamente se muestran tablas en las que se valoran las diferencias entre grupos para cada uno de los tiempos de estudio.

Estudio macroscópico

En primer lugar se realizó un estudio macroscópico de cada una de las heridas cutáneas en los 6 tiempos de estudio. El presente estudio consistió en la medición individual del grado de cicatrización cutánea, evaluación de la existencia de infección, valoración del color, grosor y retracción de la cicatriz cutánea.

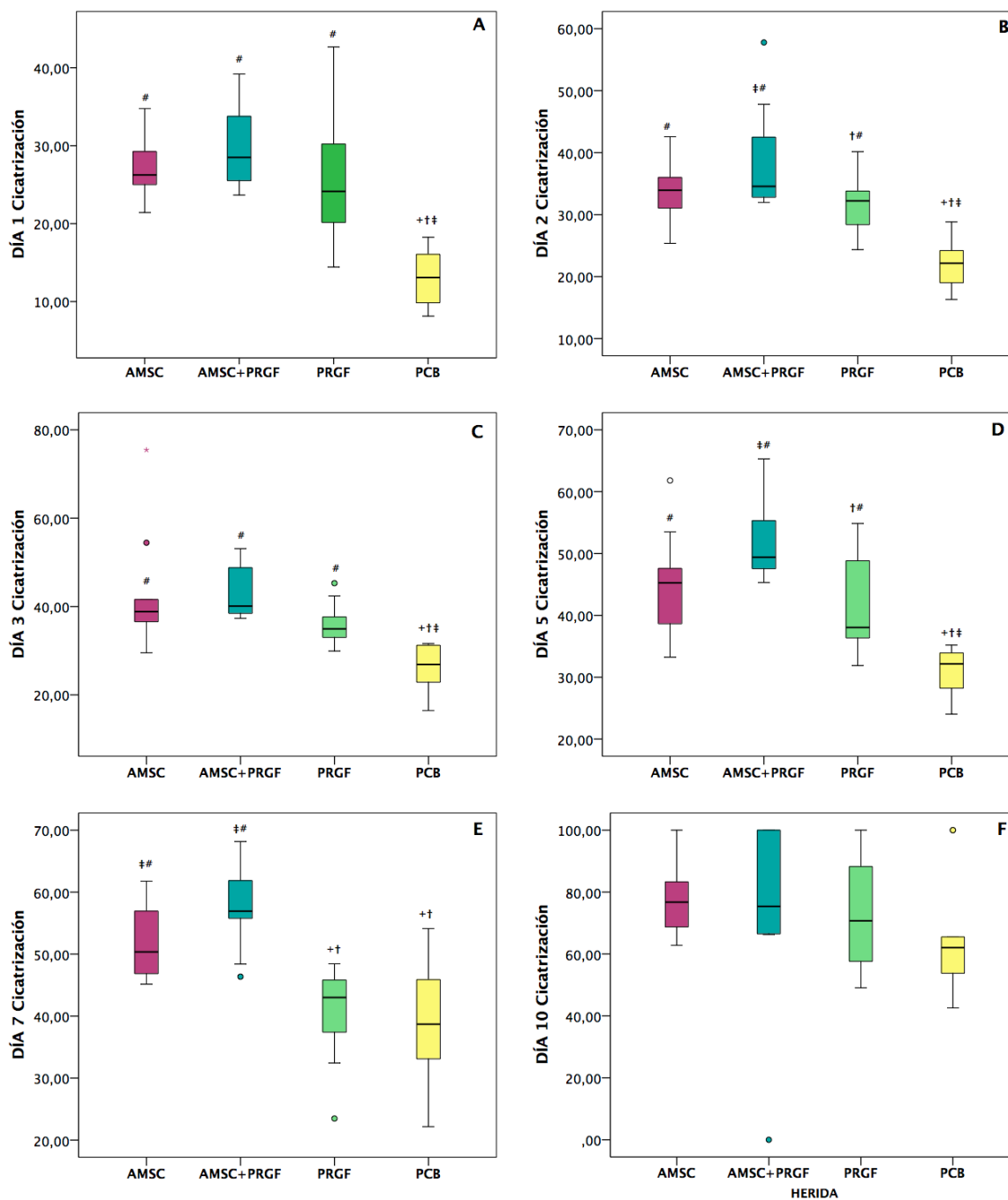
Cicatrización Cutánea

En la tabla 96 y en la gráfica 36 se exponen los datos obtenidos de la cicatrización cutánea comparando cada uno de los cuatro grupos de estudio en cada uno de los tiempos valorados. Reflejando las diferencias significativas entre tratamientos en rojo, y en la gráfica se detallan las diferencias entre grupos en cada día de estudio.

Tabla 96: Comparación entre tratamientos de la cicatrización cutánea de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio.

	Grupo	N	Media	Desviación típica	Error típico	IC 95%		Sig
						Lim inf	Lim Sup	
DÍA 1	AMSC	10	26,94	4,80	1,52	23,51	30,38	0,000
	AMSC+PRGF	11	29,72	5,25	1,58	26,19	33,24	
	PRGF	11	25,85	8,41	2,54	20,20	31,50	
	PCB	11	13,05	3,81	1,15	10,50	15,61	
	Total	43	23,82	8,64	1,32	21,16	26,48	
DÍA 2	AMSC	12	33,51	4,65	1,34	30,56	36,47	0,000
	AMSC+PRGF	12	38,66	7,94	2,29	33,62	43,71	
	PRGF	12	30,43	5,12	1,48	27,18	33,69	
	PCB	12	20,19	4,79	1,38	17,15	23,24	
	Total	48	30,70	8,82	1,27	28,14	33,26	
DÍA 3	AMSC	11	42,70	12,80	3,86	34,10	51,30	0,000
	AMSC+PRGF	12	46,07	6,81	1,97	41,75	50,40	
	PRGF	12	36,57	5,00	1,44	33,39	39,74	
	PCB	12	27,39	5,29	1,53	24,03	30,75	
	Total	47	38,09	10,56	1,54	34,99	41,19	
DÍA 5	AMSC	12	44,48	8,10	2,34	39,34	49,63	0,000
	AMSC+PRGF	12	50,53	6,04	1,74	46,69	54,37	
	PRGF	12	42,57	8,58	2,48	37,12	48,02	
	PCB	12	29,52	4,04	1,17	26,95	32,09	
	Total	48	41,77	10,24	1,48	38,80	44,75	
DÍA 7	AMSC	12	51,75	5,92	1,71	47,99	55,51	0,000
	AMSC+PRGF	11	55,85	6,71	2,02	51,35	60,36	
	PRGF	12	42,63	7,85	2,27	37,64	47,62	
	PCB	12	39,04	9,63	2,78	32,92	45,16	
	Total	47	47,14	10,06	1,47	44,18	50,09	
DÍA 10	AMSC	10	78,13	13,14	4,15	68,73	87,53	0,445
	AMSC+PRGF	11	75,71	28,82	8,69	56,35	95,07	
	PRGF	11	70,28	17,18	5,18	58,73	81,82	
	PCB	11	64,73	18,66	5,63	52,19	77,26	
	Total	43	72,07	20,37	3,11	65,80	78,34	

Gráfica 36: Comparación entre tratamientos de la cicatrización cutánea de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

En base a los resultados obtenidos, observamos diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en casi todos los tiempos de estudio (día 1, 2, 3, 5 y 7). A día 1 y 3 del estudio existen porcentajes de cicatrización significativamente superiores en cualquiera de las heridas tratadas (AMSC, AMSC+PRGF o PRGF) comparado con el grupo placebo. Adicionalmente, a días 2 y 5 además de encontrar diferencias entre el grupo placebo y los grupos de heridas tratadas,

también existen diferencias entre el grupo PRGF y AMSC+PRGF mostrando porcentajes de cicatrización superiores en aquellas heridas infiltradas con ambos tratamientos. Por último a día 7 del estudio encontramos un porcentaje de cicatrización significativamente mayor en el grupo tratado con AMSC+PRGF comparado con placebo y PRGF, y diferencias entre el grupo AMSC con el grupo PRGF y placebo, apreciando mayores porcentajes en el grupo AMSC.

Presencia o ausencia de infección

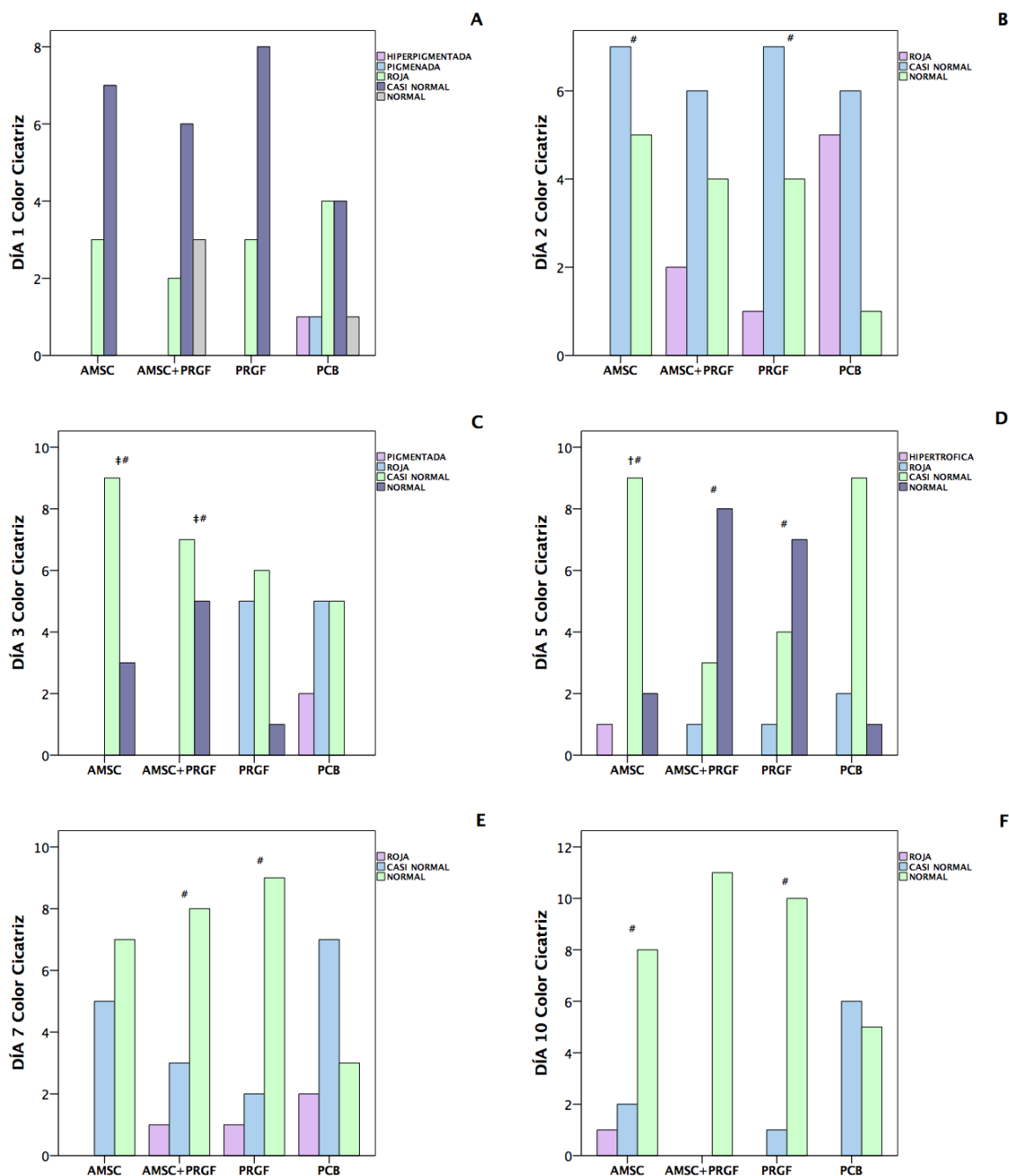
Debido a que todas las heridas del estudio carecían de características compatibles con la presencia de infección de las mismas, todas fueron clasificadas como heridas cutáneas con ausencia de infección, por lo que se consideró innecesario el realizar un estudio comparativo entre grupos de dicha variable.

Color de la cicatriz

En la gráfica 37 se exponen los resultados obtenidos en la comparación entre grupos con respecto al color de la cicatriz en los seis tiempos de estudio.

Como observamos en las gráficas expuestas encontramos diferencias significativas a partir del día 2 del estudio y hasta el final. Encontramos una mayor incidencia de cambio de color entre los grupos AMSC+PRGF y AMSC con respecto al grupo placebo, encontrando en todos los casos un mayor número de cicatrices con un color más semejante al de una cicatriz fisiológica en el grupo AMSC+PRGF a partir del día 3 de estudio. A días 2, 5, 7 y 10 también encontramos diferencias en cuanto al color entre el grupo de heridas PRGF y placebo.

Gráfica 37: Comparación entre tratamientos del color de la cicatriz de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



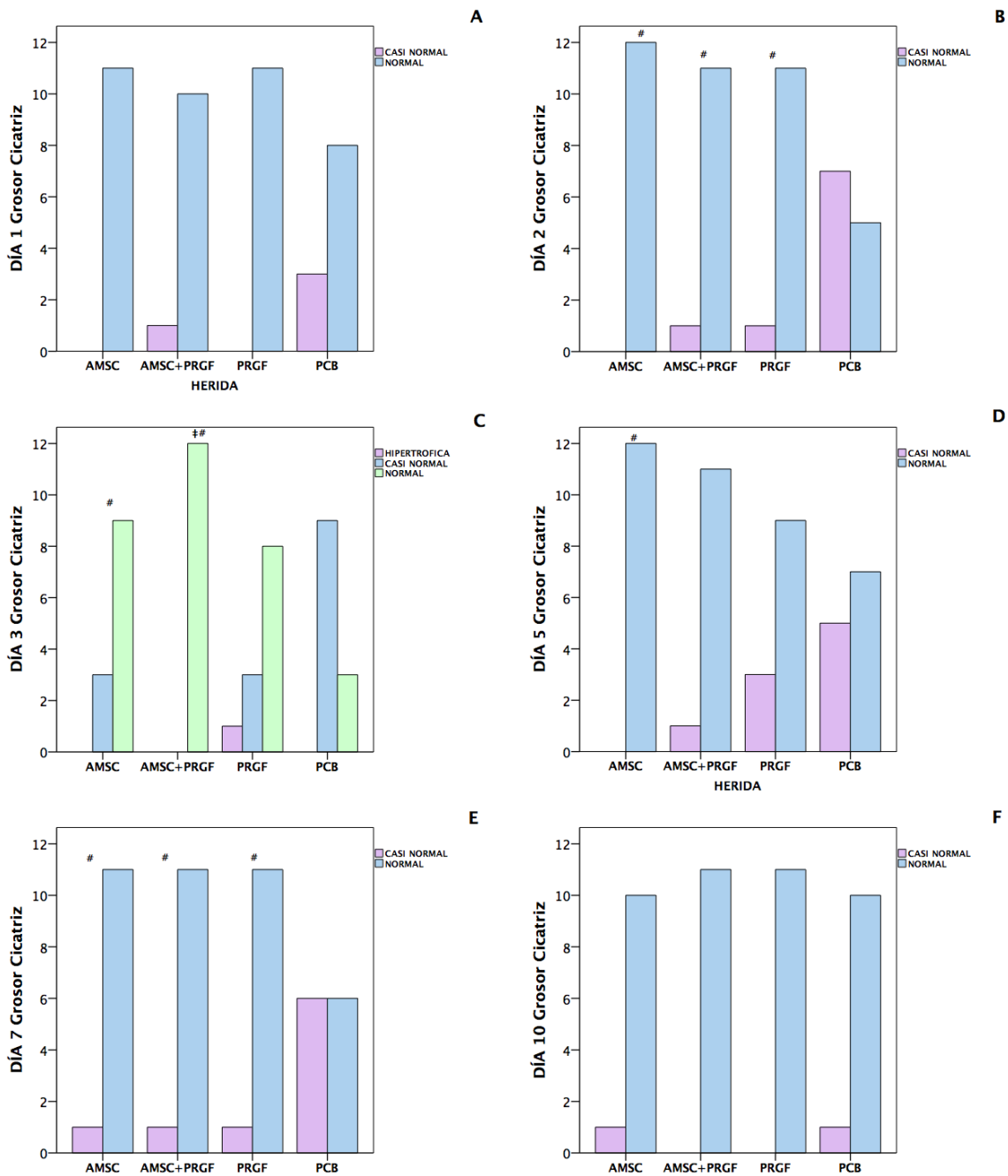
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Grosor de la cicatriz

En la siguiente gráfica 38 se representa la comparación entre grupos del grosor de la cicatriz en las heridas cutáneas de los cuatro grupos de estudio a los largo de los distintos tiempos.

Gráfica 38: Comparación entre tratamientos del grosor de la cicatriz de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

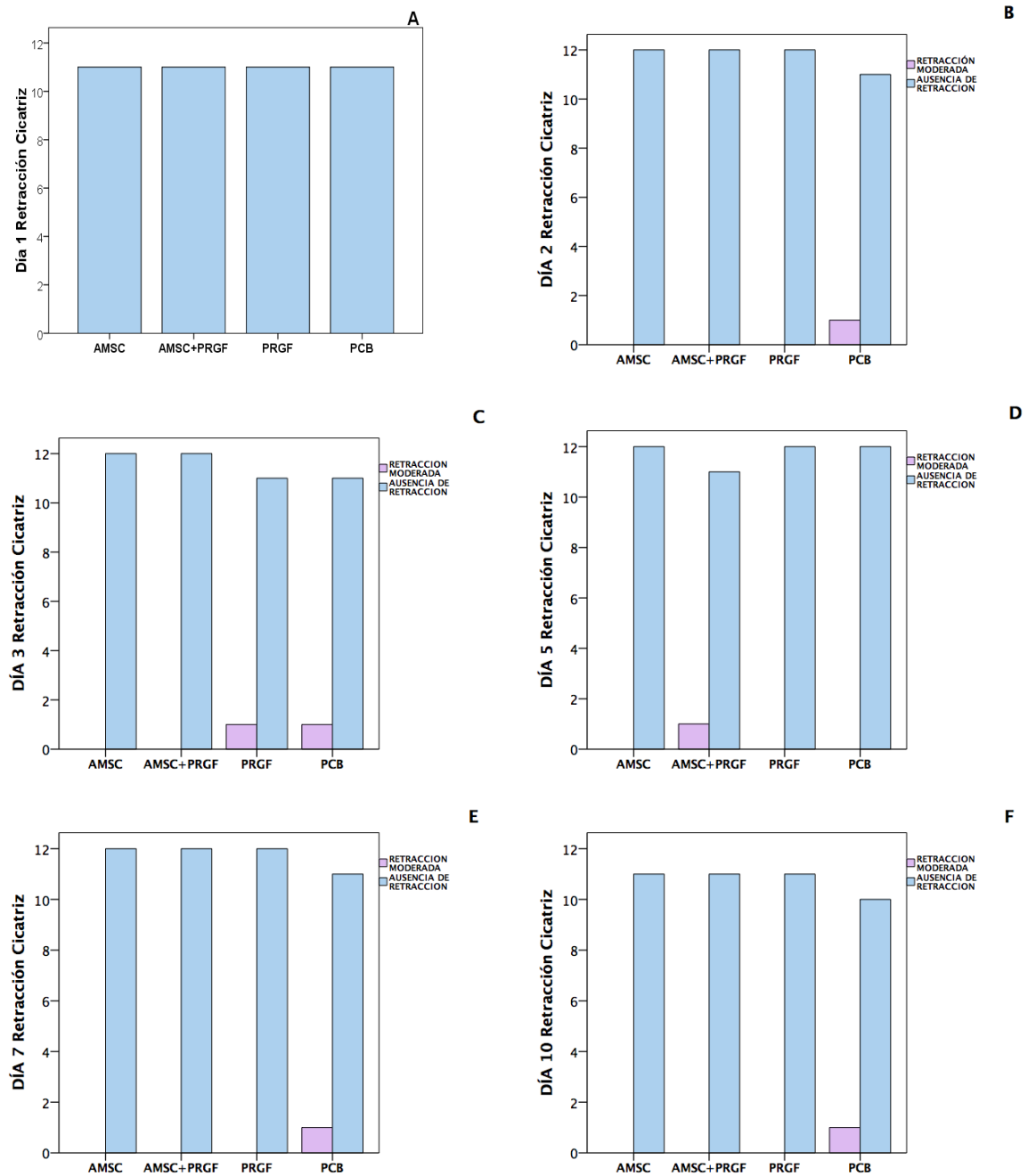
Se muestran diferencias entre tratamientos en el grosor de la cicatriz desde el día 2 del estudio hasta el día 7. En todos los casos el grupo placebo presenta diferencias con al menos uno de los grupos de heridas tratados con células, PRGF o ambos. A día 2, el grupo placebo es diferente a los restantes tres grupos y a medida que avanzan los tiempos de estudio es el grupo AMSC+PRGF seguido del grupo AMSC y por último del grupo PRGF los que presentan un grosor

de cicatriz más similar al de una cicatriz normal, siendo el grupo PCB el que obtuvo peores resultados.

Retracción de la cicatriz

En la gráfica 39 se compara la retracción de las heridas cutáneas a lo largo del estudio experimental entre grupos.

Gráfica 39: Comparación entre tratamientos de la retracción de la cicatriz en las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Tal y como se muestran en las gráficas, los resultados no muestran diferencias significativas en ninguno de los tiempos evaluados, con lo que se trata de una variable que se mantiene estable a lo largo del estudio.

Estudio Microscópico

El estudio microscópico fue llevado a cabo mediante el cálculo de la epitelización cutánea, la valoración de la reacción inflamatoria, evaluación del proceso de angiogénesis y por último el porcentaje de colágeno maduro depositado en las heridas.

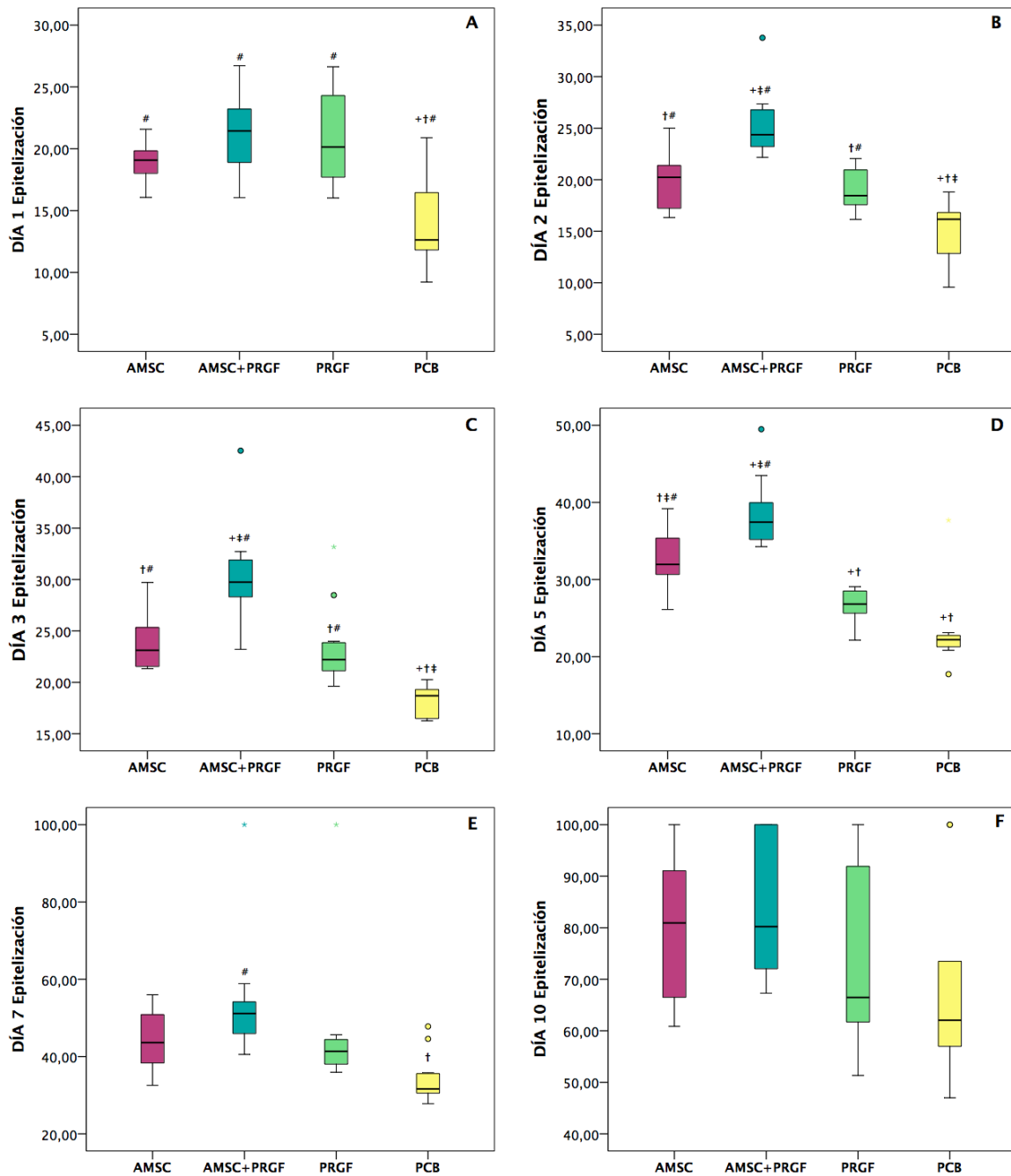
Epitelización Cutánea

Los resultados obtenidos de la comparación entre grupos de la variable epitelización cutánea se exponen a continuación en la tabla 97 y gráfica 40.

Tabla 97: Comparación entre tratamientos de la epitelización cutánea de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio.

	Grupo	N	Media	Desviación típica	Error típico	IC 95%		Sig
						Lim inf	Lim Sup	
DÍA 1	AMSC	11	18,78	2,473	0,74	17,12	20,44	0,000
	AMSC+PRGF	12	21,31	3,1	0,89	19,33	23,29	
	PRGF	12	21,73	4,68	1,35	18,75	24,71	
	PCB	12	13,73	3,59	1,03	11,44	16,01	
	Total	47	18,89	4,75	0,69	17,49	20,29	
DÍA 2	AMSC	12	19,87	2,68	0,77	18,16	21,58	0,000
	AMSC+PRGF	10	25,87	3,34	1,05	23,47	28,26	
	PRGF	10	18,88	1,91	0,60	17,51	20,25	
	PCB	12	15,15	2,67	0,77	13,45	16,85	
	Total	44	19,72	4,64	0,70	18,31	21,13	
DÍA 3	AMSC	12	24,57	3,19	0,92	22,54	26,61	0,000
	AMSC+PRGF	12	29,44	4,85	1,40	26,35	32,52	
	PRGF	12	23,39	3,87	1,12	20,92	25,85	
	PCB	12	18,22	1,62	0,47	17,19	19,26	
	Total	48	23,91	5,32	0,76	22,36	25,45	
DÍA 5	AMSC	12	32,54	3,98	1,15	30,01	35,08	0,000
	AMSC+PRGF	10	38,70	4,75	1,50	35,30	42,10	
	PRGF	10	27,11	2,78	0,88	25,12	29,10	
	PCB	10	23,71	5,34	1,69	19,89	27,53	
	Total	42	30,61	6,99	1,07	28,43	32,79	
DÍA 7	AMSC	12	44,15	7,54	2,17	39,35	48,94	0,015
	AMSC+PRGF	10	54,21	17,00	5,37	42,04	66,38	
	PRGF	8	47,93	21,27	7,52	30,14	65,72	
	PCB	11	34,27	6,37	1,92	29,99	38,55	
	Total	41	44,69	14,99	2,34	39,96	49,42	
DÍA 10	AMSC	11	77,47	16,23	4,89	66,56	88,38	0,138
	AMSC+PRGF	11	84,15	13,46	4,05	75,10	93,19	
	PRGF	11	72,65	16,69	5,03	61,43	83,86	
	PCB	10	67,61	19,07	6,03	53,96	81,26	
	Total	43	75,65	16,96	2,58	70,43	80,87	

Gráfica 40: Comparación entre tratamientos de la epitelización cutánea de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Como se puede apreciar en la tabla 97, existen diferencias entre grupos a todos los días de estudio a excepción de a día 10. Todos los diagramas de cajas y en especial los días de estudio 2, 3 y 5 muestran un porcentaje de epitelización cutánea significativamente más elevado en los grupos PRGF, AMSC y la combinación de ambos que el grupo placebo. Concretamente, a día 5 de estudio el grupo AMSC mostró diferencias además de con el grupo placebo con el grupo PRGF,

presentando porcentajes de epitelización significativamente superiores. A día uno de estudio solo existen diferencias entre el grupo placebo y los restantes tres grupos, mostrando estos tres grupos mayores porcentajes de epitelización que el placebo.

Inflamación

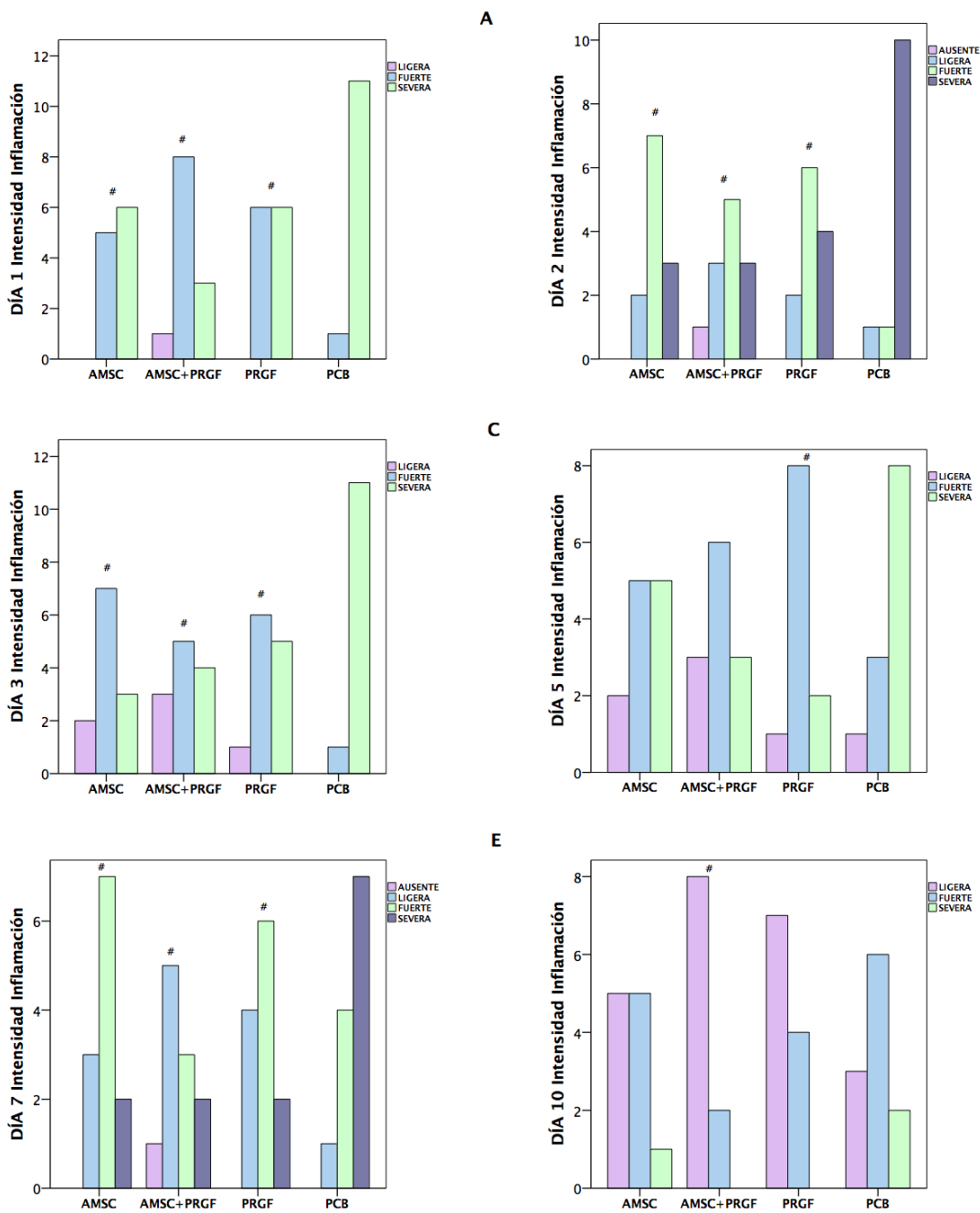
Dentro de la inflamación, uno de los parámetros a evaluar fue la intensidad de la reacción inflamatoria y el otro la distribución de la reacción inflamatoria.

Intensidad Inflamatoria

La gráfica 41 muestra el resultado de la comparación entre grupos con respecto a la intensidad inflamatoria de las heridas cutáneas en cada uno de los tiempos evaluados.

En los resultados obtenidos observamos que, desde el principio del estudio, es decir desde el día 1 y hasta el final, existieron diferencias significativas entre grupos. A día 1, 2, 3 y 7 el grupo AMSC, AMSC+PRGF y PRGF son diferentes al grupo placebo, por lo que presentan una reacción inflamatoria más leve. Cabe destacar que al final del estudio, a día 10, solo existen diferencias entre el grupo AMSC+PRGF y placebo, mostrando el grupo dos una predominancia de reacción inflamatoria leve mientras que la gran mayoría de las heridas tratadas con placebo a día 10 presentaban una reacción inflamatoria fuerte.

Gráfica 41: Comparación entre tratamientos de la intensidad de la reacción inflamatoria en las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



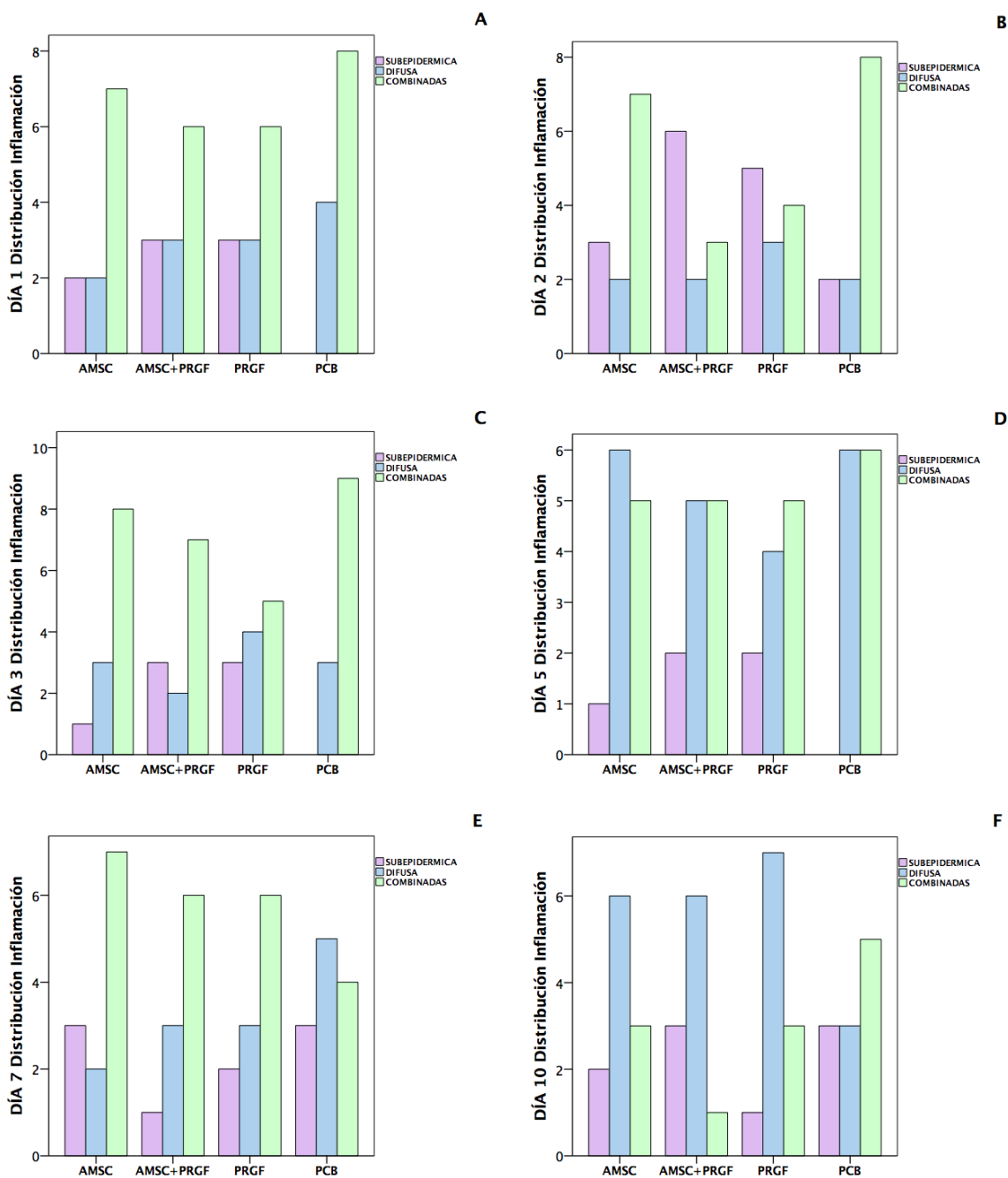
Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

o Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Distribución de la reacción inflamatoria

Tras la comparativa entre grupos de la distribución de la reacción inflamatoria obtuvimos los resultados que se muestran en la gráfica 42 en base a cada uno de los tiempos de estudio.

Gráfica 42: Comparación entre tratamientos de la distribución de la reacción inflamatoria en las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Con respecto a la distribución de la reacción inflamatoria, como podemos observar en las gráficas anteriores, no existen diferencias entre grupos a ninguno de los tiempos de estudio. Por lo que la distribución de la intensidad inflamatoria fue similar en todos los tratamientos a lo largo del tiempo.

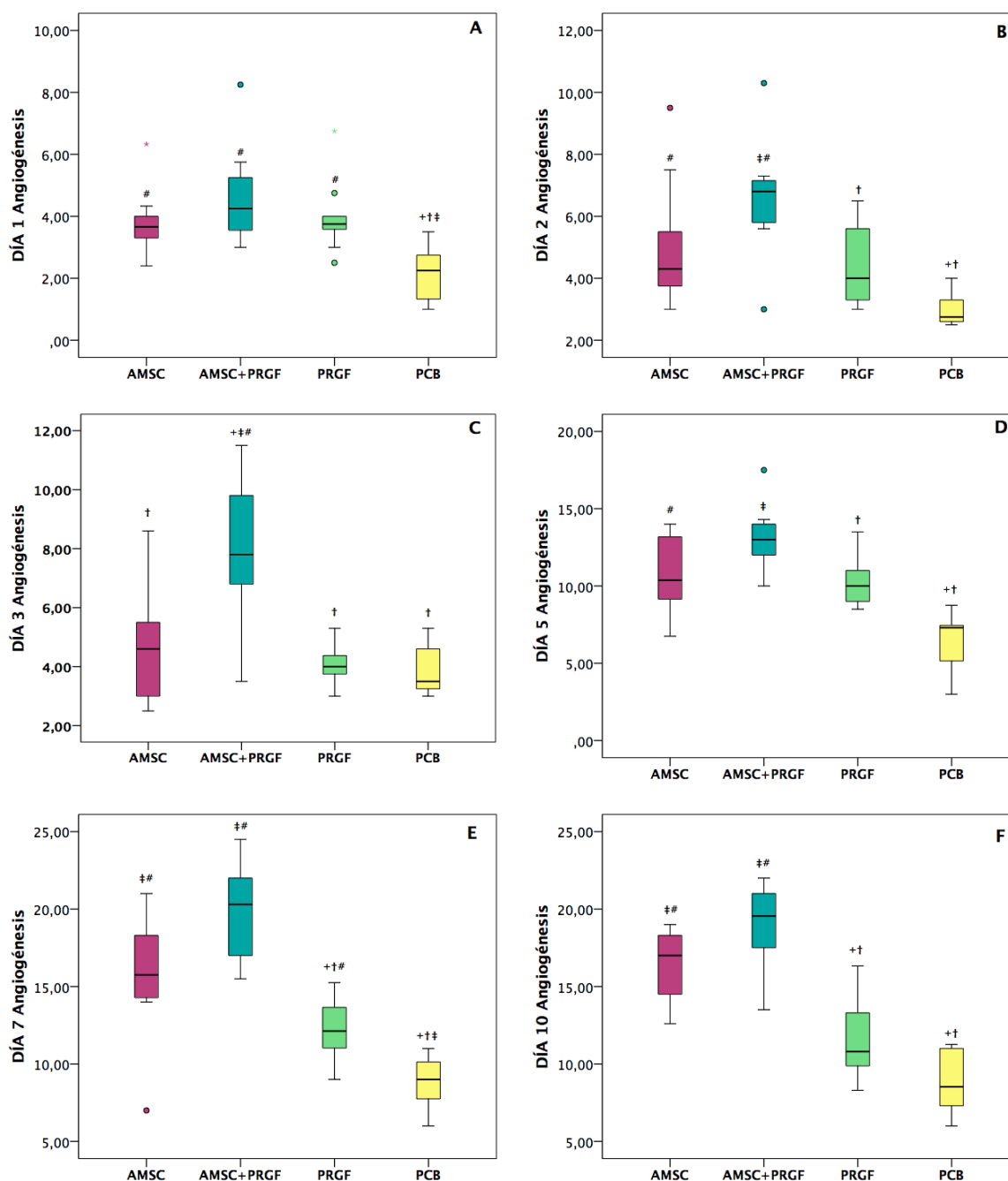
Angiogénesis

En la tabla 98 y gráfica 43 quedan reflejadas las diferencias obtenidas entre grupos en la valoración de la angiogénesis y, por lo tanto, de la neovascularización de la zona en cada uno de los tiempos de estudio.

Tabla 98: Comparación entre tratamientos de la angiogénesis de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio.

	Grupo	N	Media	Desviación típica	Error típico	IC 95%		Sig
						Inferior	Superior	
DÍA 1	AMSC	11	3,94	1,10	0,33	3,21	4,68	0,000
	AMSC+PRGF	12	4,76	1,53	0,44	3,79	5,74	
	PRGF	12	4,10	1,13	0,33	3,38	4,81	
	PCB	12	2,26	1,00	0,29	1,63	2,90	
	Total	47	3,76	1,50	0,22	3,32	4,20	
DÍA 2	AMSC	11	4,95	1,99	0,60	3,61	6,28	0,001
	AMSC+PRGF	10	6,31	1,89	0,60	4,96	7,66	
	PRGF	11	4,35	1,30	0,39	3,48	5,23	
	PCB	9	2,97	0,53	0,18	2,57	3,38	
	Total	41	4,69	1,91	0,30	4,08	5,29	
DÍA 3	AMSC	10	5,14	2,17	0,69	3,58	6,70	0,000
	AMSC+PRGF	8	7,98	2,57	0,91	5,83	10,12	
	PRGF	11	4,06	0,62	0,19	3,64	4,47	
	PCB	9	3,89	0,86	0,29	3,23	4,55	
	Total	38	5,13	2,26	0,37	4,38	5,87	
DÍA 5	AMSC	12	10,71	2,35	0,68	9,22	12,20	0,000
	AMSC+PRGF	11	12,71	2,89	0,87	10,77	14,65	
	PRGF	11	9,38	2,43	0,73	7,75	11,02	
	PCB	10	6,78	1,86	0,59	5,45	8,11	
	Total	44	9,99	3,16	0,48	9,02	10,95	
DÍA 7	AMSC	12	15,91	3,63	1,05	13,60	18,22	0,010
	AMSC+PRGF	12	18,71	3,56	1,03	16,45	20,96	
	PRGF	12	12,09	2,40	0,69	10,57	13,62	
	PCB	12	8,51	1,95	0,56	7,27	9,75	
	Total	48	13,80	4,84	0,70	12,40	15,21	
DÍA 10	AMSC	10	16,45	2,46	0,78	14,68	18,21	0,000
	AMSC+PRGF	10	18,86	2,77	0,88	16,88	20,84	
	PRGF	8	11,57	2,61	0,92	9,39	13,75	
	PCB	11	9,06	1,83	0,55	7,82	10,29	
	Total	39	13,98	4,64	0,74	12,48	15,48	

Gráfica 43: Comparación entre tratamientos de la angiogénesis de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con + (grupo AMSC), † (grupo AMSC+PRGF), ‡ (grupo PRGF), # (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

Respecto al proceso de angiogénesis como podemos apreciar, existen diferencias entre grupos en todos los tiempos de estudio. Cabe destacar que es el grupo AMSC+PRGF el que presenta una mayor angiogénesis en todos los tiempos, especialmente a días 2, 5, 7 y 10. El grupo AMSC+PRGF presenta un nivel de angiogénesis estadísticamente superior al grupo placebo y al grupo PRGF, e incluso a día 3 también es diferente al grupo AMSC. Sin embargo, a

día 1 del estudio todas las heridas cutáneas que recibieron algún tratamiento regenerativo con PRGF, AMSC o una combinación de ambos presentaron mayores niveles de angiogénesis que el grupo placebo.

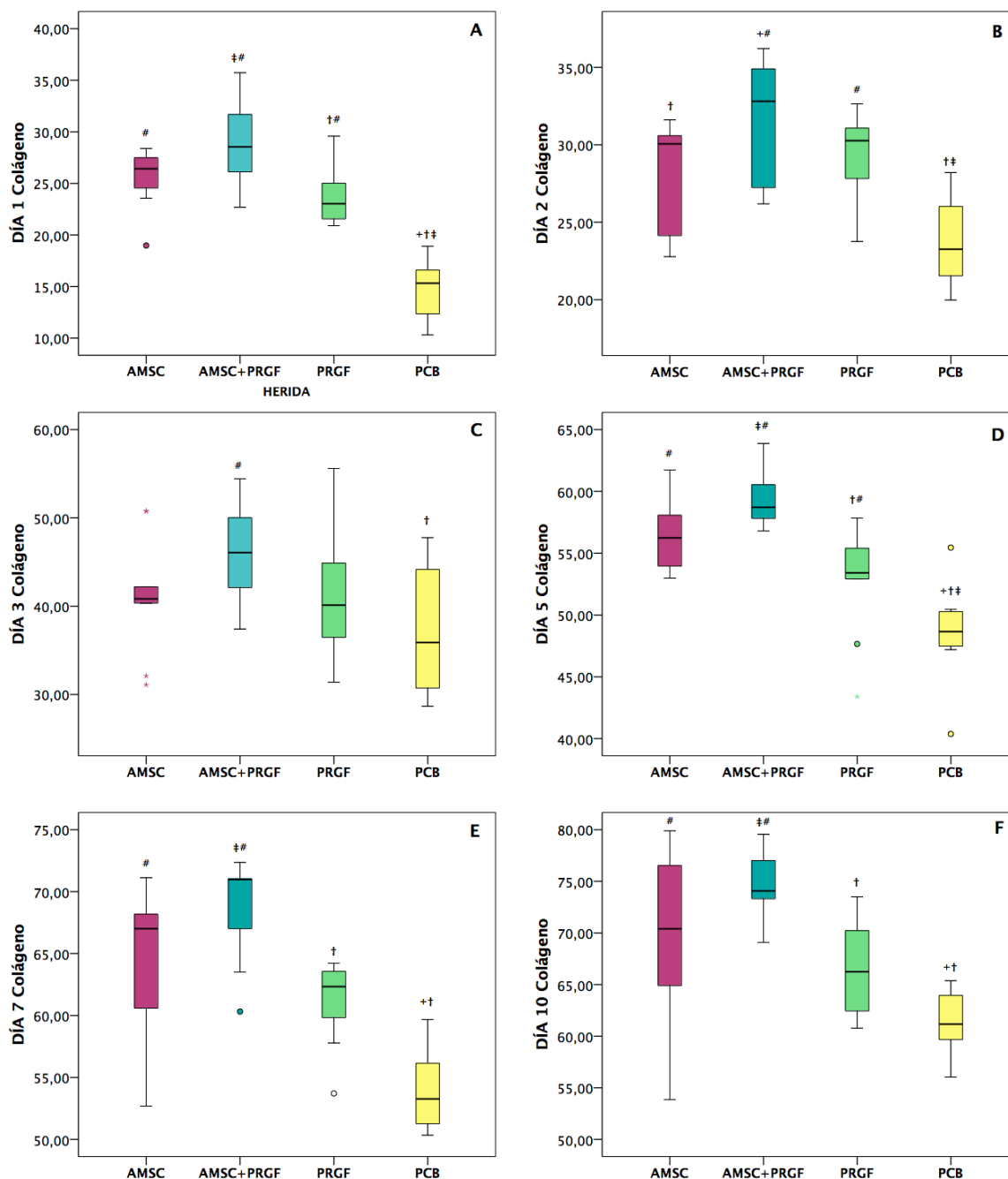
Porcentaje de colágeno

Para finalizar, los datos obtenidos con respecto al porcentaje de colágeno también fueron sometidos a un estudio comparativo entre grupos y los resultados junto con las diferencias en cada uno de los tiempos de estudio se exponen en rojo en la tabla 99, y de forma más detallada a nivel de diferencias entre grupos las encontramos en la gráfica 44.

Tabla 99: Comparación entre tratamientos del porcentaje de colágeno de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio.

	Grupo	N	Media	Desviación típica	Error típico	IC 95%		Sig
						Lim inf	Lim Sup	
DÍA 1	AMSC	12	25,67	2,86	0,83	23,85	27,48	0,000
	AMSC+PRGF	12	29,08	4,13	1,19	26,46	31,70	
	PRGF	12	23,61	2,55	0,74	22,00	25,23	
	PCB	12	15,26	3,18	0,92	13,24	17,28	
	Total	48	23,40	6,02	0,87	21,66	25,15	
DÍA 2	AMSC	11	27,87	3,52	1,06	25,51	30,24	0,000
	AMSC+PRGF	10	32,15	4,06	1,28	29,25	35,05	
	PRGF	11	28,71	3,00	0,90	26,70	30,73	
	PCB	9	23,89	2,85	0,95	21,70	26,08	
	Total	41	28,27	4,34	0,68	26,90	29,64	
DÍA 3	AMSC	10	42,02	7,05	2,23	36,98	47,07	0,075
	AMSC+PRGF	8	46,03	5,76	2,04	41,21	50,84	
	PRGF	11	41,46	6,86	2,07	36,85	46,06	
	PCB	9	36,98	7,35	2,45	31,33	42,63	
	Total	38	41,51	7,23	1,17	39,13	43,88	
DÍA 5	AMSC	12	56,33	2,77	0,80	54,57	58,09	0,000
	AMSC+PRGF	11	58,81	2,68	0,81	57,01	60,61	
	PRGF	11	53,33	4,25	1,28	50,48	56,19	
	PCB	9	46,94	5,43	1,81	42,77	51,11	
	Total	43	54,23	5,65	0,86	52,49	55,97	
DÍA 7	AMSC	12	64,54	5,47	1,58	61,06	68,02	0,000
	AMSC+PRGF	12	67,17	4,36	1,26	64,39	69,94	
	PRGF	12	59,43	6,68	1,93	55,18	63,67	
	PCB	12	8,51	1,95	0,56	7,27	9,75	
	Total	48	13,80	4,84	0,70	12,40	15,21	
DÍA 10	AMSC	10	16,45	2,46	0,78	14,68	18,21	0,000
	AMSC+PRGF	10	18,86	2,77	0,88	16,88	20,84	
	PRGF	8	11,57	2,61	0,92	9,39	13,75	
	PCB	11	9,06	1,83	0,55	7,82	10,29	
	Total	39	13,98	4,64	0,74	12,48	15,48	

Gráfica 44: Comparación entre tratamientos del porcentaje de colágeno de las heridas en cada uno de los tiempos de estudio (A: Día 1, B: Día 2, C: Día 3, D: Día 5, E: Día 7, F: Día 10).



Las diferencias entre grupos aparecen marcadas con † (grupo AMSC), ‡ (grupo AMSC+PRGF), # (grupo PRGF), * (grupo PLACEBO).

° Círculos outlier. ★ Datos anómalos (quedan fuera del estudio estadístico).

El depósito de fibras de colágeno maduras en las heridas cutáneas del presente estudio, mostró diferencias significativas entre grupos a lo largo de todos los tiempos de estudio. El grupo AMSC+PRGF presentó un mayor porcentaje de colágeno maduro a lo largo del estudio, siendo este grupo diferente a placebo en los días 1, 2, 3, 5, 7 y 10, y adicionalmente al grupo PRGF en todo los tiempos de estudio con excepción del día 3 donde sólo es diferente al placebo

y a día 2 donde además de ser diferente a placebo también es diferente al grupo AMSC. En cambio, el grupo placebo muestra niveles de depósito de fibras de colágeno maduro muy inferiores al resto de grupos en todos los tiempos de estudio.

DISCUSIÓN

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Heridas cutáneas y proceso de cicatrización

La presente tesis doctoral se fundamenta en el uso de terapias regenerativas, como es el caso del PRGF y de las AMSC, en el tratamiento de heridas cutáneas. La piel es el órgano más grande del cuerpo de los vertebrados, ya que supone el 10% del total de la masa corporal de los mismos y recubre completamente toda su superficie (Borena et al., 2015). Se trata de un tejido con capacidad regenerativa y autorreparadora que forma una importante barrera protectora frente al ambiente externo, por lo que cualquier daño en la piel puede debilitarla ocasionando una herida (Williams et al., 1995). Cada lesión cutánea supone una pérdida de integridad de la piel que ocasionan un desequilibrio funcional que, si las lesiones son suficientemente graves, puede acarrear discapacidad o incluso la muerte (Theoret, 2009).

Millones de pacientes en el mundo sufren heridas agudas o crónicas como consecuencia de cirugías, laceraciones accidentales, infecciones, quemaduras y úlceras por presión, venosas o diabéticas (Teng et al., 2014). De los 150 millones de pacientes diabéticos en el mundo, el 15% presenta úlceras complicadas en los pies que frecuentemente acaban convirtiéndose en heridas crónicas, que no cicatrizan (Boulton et al., 2005). El 3-5% de las heridas que evolucionan a

úlceras, requieren amputaciones parciales o incluso totales de miembros inferiores (Beckrich and Aronovitch, 1999). En EEUU, 2 millones de personas sufren quemaduras cutáneas cada año, este hecho acarrea importantes pérdidas de productividad o incluso la muerte de muchos pacientes (Branski et al., 2009). Los tratamientos para estas heridas cutáneas crónicas (no cicatrizantes) suponen grandes inversiones económicas ya que, además, se requieren tratamientos repetitivos. El gasto médico anual destinado al tratamiento de úlceras y sus complicaciones asociadas asciende a 6-15 billones de dólares en los Estados Unidos (Markova and Mostow, 2012). En Europa prácticamente el 3% del presupuesto de sanidad se invierte en el manejo de heridas crónicas (Posnett et al., 2009). Todos estos datos sugieren una creciente necesidad de desarrollar nuevas estrategias y terapias para el tratamiento de estas heridas cutáneas.

Además del impacto económico que ocasionan las heridas cutáneas complicadas, que causa una gran carga financiera, también es importante resaltar que afectan de forma muy significativa a la calidad de vida de los pacientes, en los que el dolor es la principal complicación (Vileikyte, 2001).

El proceso de cicatrización cutánea comprende una serie de eventos complejos y coordinados que se apoyan en una fase de hemostasia, seguida por un proceso inflamatorio y que finaliza mediante una etapa de regeneración tisular. Incluso bajo las mejores condiciones, los resultados de este proceso son habitualmente la formación de fibrosis o cicatriz y, dada la compleja naturaleza de dicho proceso, hay algunos pasos a lo largo del camino que pueden afectar el resultado final (Hanson, 2012).

Hoy en día, las terapias empleadas para el tratamiento de heridas cutáneas se pueden clasificar en terapias convencionales o regenerativas. Tras el uso de tratamientos convencionales nos encontramos ante la formación de cicatrices cutáneas (Kraft and Lynde, 2012). El uso de terapias regenerativas en heridas cutáneas es un área de la investigación biomédica novedosa y de rápido desarrollo que tiene como objetivo promover el proceso de cicatrización cutánea y restaurar las células dañadas junto con el tejido cutáneo sin la formación de cicatriz (Edlich et al., 1983).

En los últimos años, tanto en medicina humana como en veterinaria, existe un incremento en el número de enfermedades crónicas degenerativas asociadas con el aumento de la edad de nuestros pacientes y esta situación conlleva a la aparición de heridas crónicas y de difícil manejo, lo que ha estimulado el desarrollo de nuevas estrategias efectivas para la reparación o regeneración de las mismas (Formigli et al., 2012). Las terapias regenerativas actuales van

encaminadas a estimular la angiogénesis, el depósito de colágeno y modular la reacción inflamatoria, entre otras cosas, con el fin de promover la cicatrización cutánea (Borena et al., 2015).

Por todo esto, con nuestro estudio, pretendemos potenciar el uso de nuevas terapias regenerativas con PRGF y AMSC como alternativa a terapias convencionales con el objetivo de mejorar la calidad de vida de nuestros pacientes.

Evaluación del modelo experimental

En primer lugar, desde un punto de vista ético y científico, cabe destacar la importancia de mantener a los animales incluidos en el estudio, en condiciones sanitarias y ambientales correctas, debido a que existen multitud de factores que pueden afectar la calidad de vida de la población a estudiar, alterando de esta manera los resultados obtenidos (Carrillo, 2002). Ante este hecho, tal y como se ha detallado en el apartado de materiales y métodos, durante el estudio experimental se han seguido las normas asociadas al bienestar y experimentación animal exigidas por la legislación vigente.

Son numerosos los modelos animales empleados para el estudio de la cicatrización cutánea, entre ellos destacan el cerdo (Fu et al., 2006; Fu et al., 2007; Liu et al., 2008; Blanton et al., 2009), el ratón (Falanga et al., 2007; Chen et al., 2008; Chen et al., 2009; Hamou et al., 2009; Argolo Neto et al., 2012; Huang et al., 2012a), la rata (Nambu et al., 2007; Maharlooei et al., 2011; Nie et al., 2011) y el perro (Kim et al., 2009a; Kim et al., 2012). En el caso particular de nuestro estudio experimental, los motivos de utilización del conejo como modelo experimental son científicos. Es decir elegimos el conejo por ser un buen modelo, ampliamente referenciado y

útil para este tipo de trabajo (Molina-Minano et al., 2009b, a; Steinberg et al., 2012; Abegao et al., 2015; Pelizzo et al., 2015).

Además, el grupo investigador tiene amplia experiencia en su uso, es de fácil manejo y adecuado en tamaño para la obtención de muestras (tanto de sangre para los PRGF, como de grasa para las AMSC). El uso del conejo como modelo en el estudio del proceso de cicatrización cutánea ha sido ampliamente empleado por otros investigadores, por lo que se aprueba su uso en dicho proceso (Volk et al., 2007; Molina-Minano et al., 2009b; Stoff et al., 2009; Borena et al., 2010; Steinberg et al., 2012; Shi et al., 2013; Abegao et al., 2015; Pelizzo et al., 2015).

En un 78% de los artículos publicados en los últimos años se han empleado roedores como modelo animal para el estudio del proceso de cicatrización cutánea en heridas incisionales, excisionales y quemaduras por su fácil manejo, su disponibilidad y bajo coste (Isakson et al., 2015). Debemos de tener en cuenta las diferencias anatómicas y fisiológicas que existen en cada uno de los estratos que forman la piel entre especies animales (Wong et al., 2011) y, por lo tanto, las diferencias que se producen en el proceso de cicatrización (Sullivan et al., 2001) a la hora de interpretar los resultados. Por ejemplo en animales con la piel más flácida como puede ser el ejemplo de ratas, ratones y conejos, el proceso de cicatrización es más rápido debido a la contracción de la herida ocasionada por el "*musculus panniculus carnosus*" en el tejido subcutáneo, mientras que en especies con la piel más tensa, como el humano y el cerdo, que carecen de dicho músculo, el proceso de contracción cutánea no es tan rápido, por lo que la piel cicatriza principalmente por el proceso de re-epitelización (Theoret and Wilmink, 2013).

Una vez escogido un modelo animal en el que podemos reproducir modelos de heridas cutáneas y que, gracias a tu tamaño, nos permite obtener cantidades óptimas tanto de sangre para la preparación de PRGF autólogo como de biopsias de tejido graso para poder cultivarlas y obtener AMSC suficientes para los 72 animales, podemos analizar nuestros resultados para intentar acercarnos a la situación clínica en medicina veterinaria y medicina humana, teniendo en cuenta las diferencias anatómicas y evolutivas de nuestro modelo experimental.

Otro de los factores que debemos de tener en cuenta es la edad de los animales. Es importante que estos animales hayan finalizado su crecimiento, ya que el proceso de cicatrización cutánea se ve afectado por la edad. En mamíferos adultos el proceso de cicatrización cutánea es imperfecto y menos eficaz que en animales jóvenes o embriones (Kawasumi et al., 2013). Los embriones de mamíferos, incluso tienen la capacidad de reparar heridas sin la formación de cicatriz y con una completa restitución de la arquitectura fisiológica de la piel (Whitby et al., 1991). Las heridas en animales jóvenes cicatrizan con menos reacción

inflamatoria (Wulff et al., 2012), producción más rápida de componentes de la matriz extracelular, como fibronectina, poseen un mayor contenido en ácido hialurónico y diferentes concentraciones de factores de crecimiento (Cowin et al., 2001). La utilización de animales adultos en nuestro estudio reduce la influencia de todos estos factores y nos permite comparar de forma más fiable y homogénea los resultados obtenidos.

Con respecto al modelo de herida para el estudio de la cicatrización, se describen fundamentalmente tres tipos de heridas experimentales en los estudios realizados: las incisionales, excisionales y quemaduras. El 65% de los estudios revisados en los últimos años utiliza heridas excisionales como modelo experimental (Isakson et al., 2015). En nuestro caso optamos igualmente por heridas cutáneas realizadas por excisión, para ello utilizamos un punch de biopsia para lograr una lesión de espesor completo simulando así a las úlceras cutáneas, en las que todas las capas que componen la piel se ven afectadas. Como hemos comentado, son numerosos los estudios que emplean heridas excisionales de espesor completo como modelo experimental para aplicar tratamientos y evaluar la cicatrización cutánea (Tsuboi et al., 1995; Altman et al., 2008; Chen et al., 2009; Molina-Minano et al., 2009b; Borena et al., 2010; Shi et al., 2013). Estas heridas se realizan en la zona dorsal, toracolumbar, de los animales, practicando varias lesiones en cada individuo, de forma que una de ellas era utilizada como control y el resto para aplicar los distintos tratamientos estudiados (Molina-Minano et al., 2009b; Abegao et al., 2015; Ostvar et al., 2015). Al igual que Steinberg y colaboradores, utilizamos punch de biopsia de 8mm, de esta forma obtenemos unas lesiones suficientemente grandes para nuestro propósito, homogéneas y perfectamente reproducibles con total fiabilidad en todos los animales. La estandarización de las heridas es un factor muy importante a tener en cuenta (Steinberg et al., 2012; Abegao et al., 2015).

Los tiempos de estudio empleados en nuestro trabajo doctoral fueron 1, 2, 3, 5, 7 y 10 días tomando como 0 el de la realización de las heridas cutáneas. Estos periodos fueron establecidos en base a los estudios de diversos investigadores, los cuales no suelen exceder los 21 días de supervivencia (Rajkumar et al., 2006; Molina-Minano et al., 2009b; Argolo Neto et al., 2012; Abegao et al., 2015; Ostvar et al., 2015). Dado que nuestro objetivo es estudiar los pasos tempranos del proceso de cicatrización cutánea, optamos por limitar nuestro trabajo a los primeros 10 días post-lesión. No obstante, para obtener la mayor cantidad de información posible, los periodos de supervivencia son muy cercanos en el tiempo, con una separación de 24 horas en los primeros días (grupos 1, 2 y 3), 48 horas en los siguientes (grupos 3, 5 y 7) y 72 entre los 2 últimos (grupos 7 y 10).

Uso de Células Madre Derivadas de Grasa (AMSC)

Introducción y tipos de células madre

El uso de células madre es cada vez más frecuente en las distintas disciplinas que forman la medicina actual. Una búsqueda rápida en Pubmed con las palabras clave “*stem cells*” en el año 2015 , devuelve 23985 artículos, en el año 2000 se habían publicado alrededor de 4691 (Cuervo, 2015), lo que demuestra el creciente interés por estas terapias en medicina. Si afinamos más la búsqueda centrándola en la aplicación de células madre en el campo de la dermatología “*stem cells in skin wound healing*”, encontramos un total de 170 artículos publicados en el año 2015, lo cual nos indica que se trata de un campo en medicina en el que comienza a considerarse su uso.

Las células madre poseen las propiedades de autorrenovación y división de forma indefinida sin perder sus propiedades (Fortier, 2005) y esto las convierte en candidatas prometedoras para terapias celulares en el tratamiento de heridas cutáneas crónicas (Isakson et al., 2015). Existen diversas clasificaciones para las células madre en función de su origen y de su capacidad de diferenciación (Kolios and Moodley, 2013).

Con referencia al origen de las mismas, las células madre adultas (ASC) son más accesibles por disponibilidad y plantean menos problemas éticos que las células madre de origen embrionario (ESC), por este motivo son idóneas como tipo celular de elección para su aplicación en regeneración tisular (Aznar Lucea and Martinez, 2012; Isakson et al., 2015). Estas consideraciones nos hicieron optar en nuestro estudio por el uso de ASC y no de ESC. De todos los tipos de ASC que hay descritos en la literatura, dos de ellos poseen una relevancia particular para su uso en heridas cutáneas: las Células Mesenquimales Derivadas de Médula Ósea (BMSC) y las Células Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC). La médula ósea fue la primera fuente en la que se descubrieron MSC (Pittenger et al., 1999). A pesar de ello, la obtención de estas células es más compleja y se obtienen bajas concentraciones celulares. En cambio, las AMSC, que presentan un potencial multinaje similar al de las BMSC, se pueden obtener fácilmente de la fracción vascular estromal del tejido adiposo tras su digestión y centrifugación (McArdle et al., 2014). En el año 2001 Zuk y colaboradores demostraron que el tejido adiposo humano obtenido tras lipoaspirado contenía células madre multilinaje, que han demostrado ser capaces de someterse a procesos de adipogénesis, osteogénesis, condrogénesis y miogénesis tanto in vivo como in vitro (Zuk et al., 2001). Adicionalmente estas células pueden ser criopreservadas hasta 6 meses con garantía de que éstas sean accesibles para su uso funcional y terapéutico (Gonda et al., 2008).

En nuestro caso hemos escogido las AMSC ya que como hemos comentado con anterioridad, proceden de un organismo adulto, plantean menos problemas éticos y además evitamos situaciones de rechazo al tratarse de células que provienen de la misma especie a tratar (conejo), no como el caso de las ESC, ya que en un porcentaje elevado de casos pueden crear problemas de rechazo, debiendo ser tratados estos pacientes con terapias inmunosupresoras previamente (Aznar Lucea and Martinez, 2012). Otro motivo por el cual nos decidimos por el uso de AMSC, es la abundancia de tejido adiposo que existe de forma fisiológica en el organismo del animal adulto, lo que nos permite una recolección sencilla.

El tejido adiposo en medicina humana se obtiene a través del procedimiento de liposucción, preferentemente se opta por la toma de grasa a nivel abdominal, ya que es la técnica que menores molestias ocasiona al paciente (Mizuno, 2009). Por el contrario, en el campo de la medicina veterinaria, el tejido adiposo necesario para el cultivo celular de las AMSC se obtiene mediante procedimientos quirúrgicos abiertos o bien a través de laparoscopia. En nuestro caso concreto del conejo, el tejido adiposo se suele obtener de la zona inguinal mediante una técnica quirúrgica abierta directa (Steinberg et al., 2012; Pelizzo et al., 2015), técnica que utilizamos en nuestro desarrollo experimental, debido a la facilidad de acceso a la zona, las mínimas molestias

para el paciente y la rápida obtención de dichas muestras. Tal y como se ha observado en perros (Astor et al., 2013), la región inguinal posee un elevado rendimiento celular, con un mayor número de células viables por gramo.

Con referencia a las características positivas que poseen las AMSC, su capacidad multipotencial es mayor que la de otros tejidos (Schipper et al., 2008; Schwarz et al., 2011). El tejido adiposo posee un elevado rendimiento, ya que mediante pequeñas cantidades de tejido graso, podemos obtener un elevado número de células madre funcionales (Mizuno, 2009; Hassan et al., 2014). Además de otras características, se ha visto que las AMSC tienen la capacidad de promover la angiogénesis, secreción de factores de crecimiento y diferenciarse en múltiples linajes celulares. Por lo que pueden promover la proliferación fibroblástica dérmica en humanos mediante el contacto directo con células y la activación de forma paracrina de la fase de reepitelización en el proceso de cicatrización cutánea (Kim et al., 2007).

Además de existir variaciones en las técnicas de aislamiento celular, los métodos de administración de las células madre tampoco están estandarizados en la literatura. Se describe su administración tanto de forma tópica como sistémica y han demostrado ser efectivas en todos los casos. Dentro de las formas de administración tópica podemos citar la inyección de forma intradérmica, subcutánea o mediante sistemas de spray (Chen et al., 2009; Gao et al., 2011; Dabiri et al., 2013), y con respecto a su administración sistémica se cita la forma intramuscular e intravenosa (Sasaki et al., 2008; Ebrahimian et al., 2009). En nuestro estudio optamos por la administración local de AMSC alogénicas en las heridas de forma perilesional, subcutánea, para poder comprobar el efecto a nivel local de estas células sobre el proceso de cicatrización cutánea al igual que con los PRGF. Estudios publicados recientemente consideran que tanto las células MSC alogénicas como las autólogas actúan de forma positiva en el proceso de reparación de heridas tanto en humanos como en animales (Maxson et al., 2012).

Existe discrepancia y falta de homogenicidad con respecto a la dosis efectiva a infiltrar en la herida para conseguir el efecto terapéutico, lo cual es crucial para poder ofrecer unos buenos resultados además de prevenir posibles efectos adversos. Ju Won Kim y colaboradores aplicaron distintas concentraciones de MSC en heridas cutáneas de espesor completo en la especie canina (1.10^4 , 1.10^5 , 1.10^6 y 1.10^7 cél/cm²) y no observaron diferencias estadísticamente significativas, obteniéndose resultados positivos similares (Kim et al., 2013). Sin embargo, un estudio clínico previo realizado en humana demostró que existía una fuerte correlación entre la concentración de células a administrar y el índice de cicatrización cutánea, y concluyeron que era necesario un mínimo de 1.10^6 células/cm² en la herida para conseguir un efecto terapéutico estadísticamente

significativo (Falanga, 2005). En nuestro estudio experimental optamos por la infiltración de un mínimo de 1.10^6 AMSC por cada una de las heridas de 8mm ($0,502 \text{ cm}^2$).

Variables estudiadas

Tal y como ha sido detallado en el apartado de materiales y métodos, las heridas fueron evaluadas macroscópicamente y microscópicamente. En primer lugar discutiremos los resultados obtenidos a nivel macroscópico seguidos de los mismos a nivel microscópico.

Las MSC están involucradas en cada una de las fases del proceso de cicatrización cutánea. También repercuten en la capacidad de la herida para progresar más allá de la fase inflamatoria y no evolucionar hacia una herida crónica. Por lo que pueden regular eventos específicos que tienen lugar a lo largo de las diferentes fases durante el proceso de cicatrización cutánea (Maxson et al., 2012).

Los resultados macroscópicos de nuestro estudio experimental muestra que las AMSC infiltradas de forma perilesional aceleran y promueven la cicatrización de las heridas cutáneas experimentales de espesor completo de forma significativa a días 1, 2, 3, 5 y 7, consiguiendo una cicatrización exponencial y positiva a lo largo del tiempo comparándolas con las heridas placebo, e incluso a día 7 podemos apreciar que no solo cicatrizan de forma más temprana que las heridas placebo sino también comparándolas con las heridas tratadas con PRGF. Conseguimos un porcentaje de cicatrización superior al 50% a día 7, mientras que las heridas tratadas con PRGF y placebo no alcanzan el 50% de cicatrización cutánea. Son numerosos los estudios que también muestran estos resultados (Kim et al., 2007; Wu et al., 2007; Sasaki et al., 2008; Altman et al., 2009; Maharlooei et al., 2011; Nie et al., 2011; Huang et al., 2012b; Pelizzo et al., 2015; Tartarini and Mele, 2015). El verdadero mecanismo de acción por el que las MSC aceleran la cicatrización de las heridas no se conoce en detalle. Actualmente se piensa que las MSC estimulan la cicatrización de heridas principalmente mediante dos mecanismos: aportando el ambiente necesario para la cicatrización cutánea mediante la síntesis de mediadores inflamatorios, junto con citoquinas clave y factores de crecimiento y mediante la diferenciación de las mismas en diferentes tipos celulares necesarios para el cierre de las heridas (Isakson et al., 2015).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en referencia a la evaluación de la infección en las heridas cutáneas, ya que ninguna presentó signos de infección independientemente del tratamiento administrado y en principio sería lo esperado ya que las heridas fueron realizadas bajo condiciones asépticas aunque podrían haberse infectado en la

estabulación. Es importante destacar el efecto antibacteriano que presentan las MSC, ya que desencadenan la liberación de péptidos como IL-37 el cual posee un potencial efecto antimicrobiano (Krasnodembskaya et al., 2010; Sutton et al., 2016) e indirectamente estimulan la secreción de factores inmunomoduladores, que regulan el proceso de fagocitosis (Mei et al., 2010).

En medicina humana existe una creciente demanda en el campo de la medicina estética por mejorar el aspecto físico (Kozlik and Wojcicki, 2014). El principal interés en el uso de las AMSC en cirugía plástica se centra en la cicatrización cutánea y en el reemplazo de defectos tisulares. Por otro lado, los efectos paracrinos de estas células (como pueden ser la estimulación de la deposición de matriz extracelular y el reclutamiento de células residentes) han sido aplicados en rejuvenecimiento de piel (Hanson et al., 2010). En nuestro trabajo evaluamos macroscópicamente el color, grosor, y retracción de la cicatriz con cada uno de los tratamientos administrados. En el caso de las heridas tratadas con AMSC, tanto el color como el grosor de la cicatriz muestran diferencias significativas a partir del día 2 de estudio con respecto al grupo placebo. Además a día 3 de estudio, se observan diferencias significativas con el grupo PRGF, apreciando un color más fisiológico en las heridas infiltradas con AMSC que con PRGF en la coloración de la cicatriz, mientras que la retracción de las heridas se mantuvo estable a lo largo del estudio sin diferencias entre grupos ni tiempos.

Los tratamientos convencionales empleados para el envejecimiento de la piel, como los retinoides tópicos o la terapia láser, carecen del potencial de inducir la activación de fibroblastos y la síntesis de colágeno de una manera parecida a como lo hacen las AMSC, tal y como se documenta en exámenes *in vitro* y estudio preclínicos, en los que se observa un incremento en la producción de colágeno tipo I y, de una gran variedad de factores de crecimiento (Park et al., 2008). También se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la aplicación de AMSC retrasa la aparición de arrugas (Hassan et al., 2014). Un estudio experimental con ratas demostró que existía un retraso en la formación de arrugas tras la administración de AMSC supuestamente por los efectos paracrinos de dichas células (Kim et al., 2009b). Otros estudios con AMSC también hayaron resultados muy similares a los nuestros, Yuan y colaboradores (Yuan et al., 2008) observaron que tras cultivar keratinocitos epidérmicos humanos con AMSC, éstos mostraban un incremento en la migración comparado con los controles. Otro estudio mostró que tras la aplicación tópica y sistémica de MSC en heridas de espesor completo en ratas, todas las heridas cicatrizaron sin la formación de cicatriz y sin presentar retracción alguna (Mansilla et al., 2005). Podemos deducir que las heridas cutáneas tratadas con AMSC cicatrizan más rápido y además

forman una menor cantidad de cicatriz, no induciendo la formación de queloides, con lo que conseguimos cicatrices más estéticas macroscópicamente.

Si nos centramos en el estudio microscópico, aunque no existe una escala histológica estandarizada para evaluar el proceso de cicatrización cutánea, la deposición de colágeno, el proceso de neovascularización y la infiltración celular son considerados factores válidos y representativos (Isakson et al., 2015). Tras el estudio histológico de nuestras muestras apreciamos una clara aceleración de la epitelización cutánea de las heridas tratadas con AMSC desde el día 1 del estudio hasta el día 5 incluido de forma progresiva si las comparamos con las heridas control, incluso a día 5 del estudio las heridas infiltradas con AMSC no solo epitelizan más rápido que las heridas control sino también se diferencian significativamente de las heridas tratadas con PRGF, es decir que a día 5 las AMSC potencian más la epitelización cutánea y por lo tanto el cierre de las heridas que las heridas con PRGF.

La evaluación de la intensidad inflamatoria a nivel microscópico también nos muestra importantes resultados estadísticamente significativos con respecto al grupo control ya que desde el día 1 del estudio hasta el día 7 las AMSC muestran un efecto antiinflamatorio gradual, son muchos los animales que, especialmente a día 1, presentan un infiltrado celular inflamatorio intenso, el cual gradualmente va descendiendo a lo largo del estudio, apareciendo más heridas con una reacción inflamatoria más leve a medida que avanza el tiempo. Sin embargo la distribución de la reacción inflamatoria en la dermis se muestra constante sin grandes cambios a lo largo del estudio.

Debemos destacar el potente efecto angiogénico de las AMSC observado en nuestro estudio tras su infiltración en las heridas cutáneas a lo largo de todo el estudio comparado con las heridas control, podemos confirmar que las AMSC estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, llegando a duplicar la neoformación de vasos en muchos de los tiempos de estudio. A días 7 y 10 del estudio incluso podemos decir que las AMSC poseen un efecto angiogénico más potente que los PRGF. Por último, se evaluó la deposición de colágeno maduro en las heridas, al respecto podemos decir que las AMSC aceleran y estimulan la deposición de colágeno de forma significativa con respecto al grupo control a días 1, 5, 7 y 10 de forma progresiva.

Una vez evaluado en conjunto tanto el estudio microscópico como el macroscópico podemos decir que, en nuestro estudio, las AMSC aceleran la cicatrización de las heridas estimulando la cicatrización y epitelización de las mismas, reduciendo la fase inflamatoria, estimulando la deposición de colágeno maduro y ejerciendo un efecto angiogénico sobre las heridas. Estos resultados son similares a muchos estudios que emplean el estudio histológico como

herramienta de valoración del efecto de las MSC en heridas cutáneas (Rasulov et al., 2005; Nambu et al., 2009; Maharlooei et al., 2011; Argolo Neto et al., 2012; Rustad et al., 2012; Hou et al., 2013). Se ha demostrado que las MSC disminuyen de forma significativa la producción de citoquinas proinflamatorias en la fase aguda de la inflamación cuando los niveles de las mismas pueden ser perjudiciales y son capaces de aumentarlas en fases más tardías del estadio de regeneración (Galindo et al., 2011). Existen estudios que han analizado la composición de los medios de cultivo de las MSC y han observado que contienen varias citoquinas y quimiocinas como la IL-8, IL-6, TGF- β y VEGF, las cuales son todas esenciales para la cicatrización fisiológica de las heridas (Yoon et al., 2010). En otro estudio (Park et al., 2008) se analizó la composición del medio de las AMSC y se observó que estas células secretaban TGF- β , VEGF, KGF, FGF-2, PDGF, HGF, fibronectina y colágeno tipo I, y todos estos componentes ya han demostrado previamente que estimulan el proceso de cicatrización fisiológico y en heridas crónicas (Hassan et al., 2014). Otros estudios proponen que las AMSC pueden afectar a otros tipos celulares específicos de la piel de forma paracrina (Brunt and Klausner, 1988; Cross and Mustoe, 2003; Galiano et al., 2004).

Al igual que en nuestro trabajo, varios autores han observado que el proceso de epitelización cutánea también se encuentra acelerado tras la administración de MSC en distintas especies (Badiavas et al., 2007; Falanga et al., 2007; Kim et al., 2013), por ejemplo Kim y colaboradores (Kim et al., 2013) observaron el cierre más rápido de las heridas tratadas con MSC gracias a una aceleración y estímulo del proceso de reepitelización. Se sugiere que este hecho se debe al estímulo de la migración y proliferación de queratinocitos por parte de las MSC, y este mismo concepto fue demostrado en el trabajo mediante la observación de una proliferación de queratinocitos más activa en las heridas tratadas con MSC que en las heridas control. Las MSC también actúan durante la fase de proliferación de la cicatrización cutánea y promueven la formación de tejido de granulación y la epitelización favoreciendo la expresión de factores de crecimiento como el VEGF, BFGF, y KGF (Hassan et al., 2014). Nakagawa y colaboradores propusieron que las MSC junto con BFGF, aceleraban la cicatrización de defectos cutáneos, mostrando como las MSC humanas se diferenciaban en epitelio en un modelo de rata (Nakagawa et al., 2005).

Adicionalmente, las AMSC son aisladas fácilmente, presentan una gran capacidad de proliferación y, además, poseen la capacidad de secretar factores de crecimiento pro-angiogénicos, lo cual las hace ideales para su uso en heridas cutáneas que no cicatrizan (Cherubino et al., 2011; McLaughlin and Marra, 2013; Toyserkani et al., 2015). En un estudio

llevado a cabo con AMSC en heridas cutáneas de espesor completo en ratas se observó al igual que en nuestro estudio un estímulo del proceso de neovascularización (Nie et al., 2011).

Se ha descrito una mejoría en el proceso de re-epitelización, asociado a un menor infiltrado inflamatorio, y un incremento en la deposición de colágeno en biopsias de heridas tratadas con AMSC alogénicas y autólogas comparadas con BMSC autólogas y heridas control (Pelizzo et al., 2015). En las heridas tratadas con AMSC se apreció, una mayor proliferación celular. La inoculación de AMSC aceleró el cierre de las heridas en comparación con BMSC y los controles, además las áreas tratadas con las AMSC mostraron unas fibras de colágeno con orientación, tamaño y forma más similar a las de una la piel normal, lo cual sugiere que las AMSC mejoran la restauración de la arquitectura cutánea durante el proceso de cicatrización (Pelizzo et al., 2015). Los resultados obtenidos por Kim y colaboradores también coincidieron con los de nuestro estudio al observar una mayor deposición de colágeno en las heridas tratadas con MSC, lo que indica que existe un estímulo de la proliferación de fibroblastos (Kim et al., 2013). Estos mismos hallazgos también han sido detectados por otros autores (Javazon et al., 2007; Chen et al., 2008; Branski et al., 2009). Como ya sabemos el colágeno es el componente más abundante de la piel y le confiere resistencia a aquel tejido que lo contenga, en nuestro caso, la piel, por lo que el acúmulo de grandes cantidades de colágeno incrementa la fuerza ténsil de las heridas (Fuchs and Segre, 2000).

Uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)

Introducción y metodologías

El PRGF es una mezcla de proteínas autólogas obtenidas a partir de un determinado volumen de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) (Molina-Minano et al., 2009b). Proporcionan una fuente autóloga de factores de crecimiento y otras proteínas biológicamente activas como el fibrinógeno, la fibronectina o la vitronectina, localizadas en los gránulos alfa de las plaquetas y en el plasma (Anitua et al., 2004).

El PRP ha sido empleado en múltiples disciplinas para conseguir una aceleración de los procesos fisiológicos de curación. Estas sustancias presentan la gran ventaja, al proceder del mismo paciente, de eliminar los riesgos potenciales de padecer una reacción inmunológica adversa (Cole et al., 2010).

El término PRGF ha sido empleado y de forma poco específica para englobar una gran variedad de productos biológicos obtenidos a partir de sangre del propio paciente, con una concentración plaquetaria por encima de los niveles basales, lo que ha creado mucha confusión

y debates ante la falta de homogeneidad en las técnicas de obtención (Dohan Ehrenfest et al., 2014).

Son numerosos los estudios que muestran resultados positivos tras la administración de PRP en lesiones cutáneas favoreciendo los procesos de cicatrización en piel (Saaristo et al., 2006; Hom et al., 2007; Lee et al., 2008; Mehta and Watson, 2008; Salemi et al., 2008; Weinstein-Oppenheimer et al., 2010; Ostvar et al., 2015). A pesar de ello, hay una falta de homogeneidad a la hora de procesar la sangre para obtener el PRP. Existen múltiples protocolos para su aislamiento, que difieren en puntos tan esenciales como el volumen de sangre necesario, la técnica de centrifugado empleada, el volumen de PRP aislado o la metodología de fraccionamiento y, como resultado, se obtienen productos sanguíneos con concentraciones plaquetarias y celulares muy diferentes (Appel et al., 2002; Weibrich and Kleis, 2002; Weibrich et al., 2003; Anitua et al., 2009). En resumen, cada sistema de aislamiento dará lugar a productos completamente distintos, con diferentes concentraciones de factores de crecimiento, citoquinas y otros componentes celulares, asociados a diferencias cualitativas y cuantitativas que desencadenarán respuestas biológicas diferentes y, por lo tanto, influenciarán de manera muy diferente el proceso de cicatrización tisular.

En la presente tesis doctoral hemos empleado PRGF (Plasma Rico en Factores de crecimiento), un tipo de PRP cuya metodología fue descrita por Anitua y colaboradores en el centro BTI® Biotechnology Institute de Vitoria (Anitua, 1999). Su primer uso fue en 1999 y se definió como una fracción de plasma autóloga con una concentración plaquetaria superior a la basal, sin presencia de leucocitos ni eritrocitos, obtenida mediante una única centrifugación, con citrato sódico como anticoagulante y cloruro cálcico como activador plaquetario (Anitua, 1999). Optamos por el uso de PRGF porque es un producto de uso clínico y experimental con el que trabajamos en nuestro grupo de investigación, por lo tanto tenemos experiencia y hemos obtenido resultados favorables en su aplicación en cartílago y hueso (Serra, 2006; Soler, 2006; Damiá, 2012; Cuervo, 2015), además se trata de un producto autólogo y protocolizado (este hecho incrementa su seguridad y presenta certificaciones sanitarias europeas (marcado CE) y norteamericanas (FDA approval) para su uso como medicamento en humana, recibiendo el nombre comercial Endoret® PRGF®) (Cuervo, 2015).

Con respecto a las diferencias entre el PRGF y el resto de preparados de PRP descritos en la bibliografía, observamos que el PRGF no contiene leucocitos, ya que durante el proceso de pipeteado se evita la capa leucocitaria, con lo que evitamos daños tisulares por sus efectos pro-inflamatorios (Anitua et al., 2012). Adicionalmente, el PRGF presenta una concentración de plaquetas que oscila entre 2-3 veces la concentración de la sangre periférica, lo que ha

demostrado desencadenar un efecto biológico óptimo, ya que elevadas concentraciones de plaquetas pueden ocasionar efectos inhibitorios y, en sentido contrario concentraciones bajas pueden producir efectos estimulantes (Weibrich et al., 2004).

Con nuestro protocolo de trabajo, todos los procedimientos de pipeteo y fraccionamiento del PRGF se realizaron en campana de flujo laminar. La contaminación bacteriana puede aparecer cuando se emplean protocolos de obtención abiertos (Vasconcelos et al., 2003). En nuestro estudio no se observó la aparición de signos de infección en las heridas de ninguno de los animales, por lo que podemos decir que El PRGF resultó ser un producto biológicamente seguro en el presente estudio experimental.

Además de la variedad de métodos de obtención del PRP, se describen distintas formas de aplicación. Existen estudios que lo aplican en forma de gel (Man et al., 2001; Kim et al., 2009a; Iacopetti et al., 2012; Ostvar et al., 2015), otros mediante inyección perilesional (Karayannopoulou et al., 2014; Karayannopoulou et al., 2015), e incluso mediante métodos más complejos, como el uso de scaffolds fabricados específicamente (Zielins et al., 2014). En nuestro caso, procedimos a realizar una inyección perilesional de PRGF autólogo en cada una de las heridas seleccionadas. Esta técnica fue descrita por primera vez por Dionyssiou y colaboradores (2013) en un estudio experimental en conejos y en uno clínico en humanos sobre heridas crónicas, los cuales dieron lugar a resultados prometedores (Dionyssiou et al., 2013). Al administrar dicho producto de forma intralesional prevenimos la pérdida de PRP, en especial a través de la absorción de los apósitos y vendajes (Karayannopoulou et al., 2015).

La pauta de aplicación de estos tratamientos con PRP es otro de los importantes aspectos que deben ser tratados en futuras investigaciones, ya que en la actualidad existen estudios que realizan una única infiltración de PRP por especie, como es nuestro caso, mientras que otros hacen varias aplicaciones (Zayni et al., 2015). También es importante saber qué volumen administrar, dependiendo de la localización anatómica de la lesión, por ejemplo Karayannopoulou y colaboradores (2015) infiltraron de forma perilesional 1ml en heridas de 2cm por 2cm obteniendo resultados favorables en cuanto a la mejoría del proceso de cicatrización (Karayannopoulou et al., 2015), mientras que en nuestro estudio 0,1ml fueron suficientes ya que las heridas tan solo medían 8mm de diámetro.

Variables estudiadas

Los PRP han sido empleados en una gran variedad de tratamientos clínicos y procedimientos quirúrgicos, específicamente en el campo de las úlceras en tejidos blandos y en patologías

cutáneas crónicas. El PRP contiene más de 20 factores de crecimiento distintos, como el PDGF, VEGF y TGF-B1 (Eppley et al., 2004). Estos factores de crecimiento no solo regulan la migración celular y su proliferación sino que también remodelan la matriz extracelular y promueven el proceso de angiogénesis, creando un ambiente beneficioso que estimula el proceso de cicatrización (Demidova-Rice et al., 2012b).

Con referencia a las variables estudiadas en esta tesis doctoral, destaca a nivel macroscópico la aceleración del proceso de cicatrización en las heridas tratadas con PRGF desde el día 1 de estudio hasta el día 7 comparado con las heridas control, por lo que podemos intuir que el PRGF estimula y favorece el proceso de cicatrización de las heridas por sí solo. Hay que destacar que a días 2, 5 y 7 las heridas tratadas con PRGF + AMSC cicatrizan significativamente más rápido que las heridas que solo recibieron PRGF, y a día 7 el grupo AMSC presenta una aceleración significativa de la cicatrización comparada con el grupo PRGF. Por otro lado, el aspecto estético de las heridas también se ve afectado por la administración de PRGF. En los días de estudio 2, 5, 7 y 10 el color de la cicatriz de las heridas tratadas con PRGF es más normal si lo comparamos con las heridas control, también observamos resultados similares tras la evaluación del grosor de la cicatriz a lo largo del estudio ya que las heridas tratadas con PRGF presentan un menor grosor de cicatriz que las heridas control, con lo que obtenemos un mejor aspecto estético a corto plazo y una vez más al igual que con el uso de AMSC no inducen la formación de queloides.

El estudio microscópico de las heridas infiltradas con PRGF mostró una aceleración del proceso de epitelización desde el día 1 del estudio hasta el día 5, comparado con las heridas control. Aunque a partir del día 2 de estudio, como ocurre con el caso de la cicatrización cutánea a nivel macroscópico, las heridas tratadas con PRGF presentan una epitelización significativamente inferior y más lenta que las heridas tratadas con PRGF + AMSC, además a día 5 el grupo AMSC epiteliza más rápidamente que el grupo PRGF. Durante todos los tiempos de estudio, hasta el día 7, observamos una reducción de la intensidad inflamatoria en las heridas tratadas con PRGF comparadas con las heridas control, por lo que el PRGF ejerce un efecto antiinflamatorio sobre las heridas además de potenciar y estimular la epitelización cutánea. La angiogénesis en las heridas tratadas con PRGF se ve estimulada de forma significativa en comparación con el grupo control a día 1 y 7 del estudio, aunque el incremento de la misma a lo largo del tiempo es progresiva y siempre superior al grupo control, por lo que podemos deducir que existe un estímulo del proceso de neovascularización. Es importante destacar que hacia el final del estudio, días 7 y 10, son los grupos AMSC y AMSC+PRGF los que presentan un mayor potencial angiogénico con un incremento significativo de la angiogénesis comparado al grupo PRGF. Por último, existe un incremento significativo en la deposición de fibras de colágeno en las

heridas tratadas con PRGF de forma progresiva desde el día 1 hasta el día 5 con respecto a las heridas control, por lo que el PRGF estimula la formación de colágeno corto plazo en la zona dañada.

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores, como Francesco-Molina y colaboradores que llevaron a cabo un estudio experimental con conejos similar al nuestro, en los que practicaron heridas cutáneas de espesor completo en la zona del dorso de los mismos y aplicaron PRGF (método Anitua) en una de las heridas mientras que la otra permaneció como herida control, en este caso se estudiaron distintos parámetros histopatológicos a 7 y 28 días. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al proceso de reepitelización e inflamatorio a día 7, con lo que se concluyó que el PRGF estimulaba y, por lo tanto, aceleraba el proceso de epitelización y, además, reducía la inflamación de la zona consiguiendo un cierre temprano de las heridas (Molina-Minano et al., 2009b). Estos mismos resultados, que se asemejan a los conseguidos en nuestro trabajo, también fueron observados por otros autores (Kimura et al., 2005; Anitua et al., 2007). También nos podemos remitir al estudio de López Jornet y colaboradores en el que crearon experimentalmente heridas cutáneas en lengua de conejos y aplicaron PRGF, obteniendo una aceleración del proceso de epitelización además de una reducción del proceso inflamatorio (Lopez-Jornet et al., 2009).

Es importante recalcar la importancia de evaluar el efecto del tratamiento tanto macroscópicamente como microscópicamente, tal y como se llevó a cabo en nuestro estudio y en el de otros autores (Ostvar et al., 2015; Jee et al., 2016). Ostvar y colaboradores evaluaron la aplicación de PRP en gel sobre heridas cutáneas de espesor completo en conejos tanto a nivel macroscópico como microscópico a días 7, 14 y 21 y apreciaron una aceleración del proceso de epitelización y por tanto de cicatrización de las heridas comparadas con las heridas control. Además, se produjo una mayor deposición de fibras de colágeno, un incremento en la producción de nuevos vasos sanguíneos y de fibroblastos además de una menor reacción inflamatoria en las heridas tratadas con PRP (Ostvar et al., 2015). Son numerosos los estudios clínicos tanto en medicina humana como en veterinaria los que han demostrado el efecto positivo de las plaquetas sobre la restauración de la integridad tisular en el proceso natural de cicatrización cutánea (Kiritsy et al., 1993; Crovetti et al., 2004; Jeffcoate et al., 2004; Saldalamacchia et al., 2004). Cuando éstas se aplican tópicamente, aceleran la cicatrización del tejido y la promueven en heridas con retraso de la misma (Knox et al., 2006).

En medicina veterinaria, el PRP también ha sido empleado con frecuencia en otras especies, como el perro y el caballo, en heridas cutáneas. Carter y colaboradores (2003) y DeRossi y colaboradores llevaron a cabo un estudio en caballos en el que observaron que el uso de PRP

en forma de gel promovía la cicatrización cutánea y estimulaba la diferenciación y regeneración epitelial (Carter et al., 2003; DeRossi et al., 2009). También se ha visto su eficacia en heridas de gran tamaño (Iacopetti et al., 2012). En contraste a los hallazgos mencionados anteriormente y observados en nuestro estudio, Monteiro y colaboradores no observaron este estímulo en el proceso de cicatrización en heridas distales en miembro pelviano de caballo, sino lo contrario y, además, apreciaron un exceso de formación de tejido de granulación (Monteiro et al., 2009). También encontramos estudios en perros, como el de Kim y col (Kim et al., 2009a) los cuales estudiaron el efecto curativo del PRP autólogo sobre lesiones grandes, y describieron una evolución positiva. Debido a la gran variedad de protocolos empleados para la obtención de PRP aparecen resultados muy variables, lo que debemos de tener muy en cuenta a la hora de comparar entre estudios y de valorar la efectividad de dichos productos.

Diversos factores de crecimiento están implicados en el proceso de neovascularización, VEGF, bFGF, PDGF y TGF- β , todos ellos poseen la capacidad de mejorar la microcirculación, y por lo tanto, la vascularización de la zona y con ello disminuyen el edema local (Ishiguro et al., 1994; Vourtsis et al., 2012; Park et al., 2013). El VEGF juega un papel primordial en la angiogénesis y linfangiogénesis (Barrientos et al., 2008). Así, diferentes estudios han documentado incrementos en la angiogénesis y mayores niveles de VEGF o de PDGF en heridas cutáneas tratadas con PRP e incluso en colgajos cutáneos (Takikawa et al., 2011; Li et al., 2012). El estudio llevado a cabo en perros por Karayannopoulou y colaboradores aplicaba PRP infiltrándolo en colgajos cutáneos experimentales. Observó una supervivencia estadísticamente superior en aquellos colgajos infiltrados con PRP comparados con los control, gracias a un estímulo del proceso de angiogénesis con una mayor formación de nuevos vasos y una significativa dilatación de los vasos sanguíneos ya existentes, lo que ocurre como respuesta a un incremento en la producción de óxido nítrico (agente vasodilatador) inducido por el VEGF (Khan et al., 2004; Booi et al., 2008; Karayannopoulou et al., 2014). También se ha visto la eficacia del uso de VEGF en heridas cutáneas de diabéticos, en las que la aplicación de dicho factor acelera el cierre de estas heridas promoviendo la angiogénesis de la zona y la linfangiogénesis. La generación de nuevos vasos linfáticos aporta una rápida salida para el exceso de fluidos y leucocitos y, con ellos, una reducción del edema e inflamación de la zona afectada (Saaristo et al., 2006). El incremento en la perfusión tisular, gracias al tratamiento de heridas con PRP, favorece la formación de tejido de granulación y, en general, el proceso cicatricial debido al aporte de nutrientes y oxígeno al lugar del daño cutáneo (Schreml et al., 2010).

Cada factor de crecimiento que alberga el PRP pueden tener varios efectos sobre el proceso de cicatrización de heridas. Estos efectos celulares incluyen quimiotaxis, promoción de la mitosis

(propiedades mitogénicas), estimulación y activación celular y propiedades regulatorias sobre diferentes componentes del proceso de cicatrización (Pavletic M, 2010a). El EGF juega un papel vital en la diferenciación, proliferación, migración y adhesión de queratinocitos. Su aplicación es efectiva para inducir el proceso de epitelización y formación de tejido de granulación. El KGF también induce la proliferación y migración de queratinocitos y células epiteliales (Enoch et al., 2006b).

Las heridas crónicas se caracterizan por la persistencia del proceso inflamatorio, debido a un desequilibrio entre citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, y por un nivel bajo de factores de crecimiento. También puede producirse un desequilibrio en la concentración de oxidantes y antioxidantes, mientras que los factores de crecimiento y las citoquinas juegan un papel crucial en el control del daño oxidativo (Schreml et al., 2010; Behm et al., 2012), y esto explica porqué el PRP ejerce un efecto antiinflamatorio.

Es importante resaltar el uso del PRP en cirugía plástica y reconstructiva, el PRP se asocia a una disminución significativa de infecciones y del tiempo de cirugía y recuperación del paciente. Principalmente el empleo de PRP en este campo se ha centrado en pacientes con pérdidas de piel y tejidos blandos a causa de accidentes o patologías crónicas (Valbonesi et al., 2002). Tras la aplicación tópica o la inyección subcutánea del PRP, se producen importantes cambios sobre la piel envejecida: restaura la vitalidad cutánea, aumenta su grosor, recupera la consistencia elástica, mejora la afluencia vascular, estimulan las secreciones e incrementa la tersura y apariencia de la piel, ya que regula la remodelación de la epidermis y de la dermis (Mehta and Watson, 2008). En medicina estética se está empleando el PRP en la inyección subdérmica (en depresiones cicatriciales o surcos pronunciados, entre otros), en mesoterapia (para el tratamiento de arrugas principalmente), en peelings (para favorecer la regeneración dérmica y epidérmica) entre otras aplicaciones (Arquero, 2009). El TGF-B3 reduce la deposición de colágeno en la fase de remodelado y proliferativa ayudando a conservar el aspecto macroscópico de la herida, (por ejemplo el grosor) (Enoch et al., 2006b). Este hecho se corresponde con lo observado en nuestro estudio.

Con referencia a la deposición de colágeno en las heridas podemos analizar con más detalle las funciones de los factores de crecimiento más importantes. El PDGF ejerce una fuerte acción quimiotáctica y mitógena sobre los fibroblastos, lo que estimula la síntesis de colágeno y la angiogénesis (Rajkumar et al., 2006). El TGF-B estimula el crecimiento y proliferación de células endoteliales, epiteliales y mesenquimales. El EGF promueve la proliferación de fibroblastos y de células epiteliales y epidérmicas, obteniendo como resultado la reepitelización, formación de matriz extracelular e incremento de angiogénesis de la zona (Enoch et al., 2006b). Se ha

observado, en diferentes estudios, una mayor deposición de colágeno en heridas tratadas con PRP, al igual que ocurrió en el nuestro, comparadas con las heridas control, obteniendo incluso una mejor arquitectura con las fibras de colágeno depositadas de forma organizada, lo que indica un tejido de granulación maduro y un incremento de la fuerza tensil de la herida (Karayannopoulou et al., 2015). En el estudio desarrollado por Choo-Hee y colaboradores (2016) en perros se obtuvo, una vez más, mayores concentraciones de colágeno en las heridas tratadas con PRP comparadas con las heridas control además de una buena organización de las fibras de colágeno de forma paralela (Jee et al., 2016).

Podríamos resumir todo lo anterior, afirmando que numerosos trabajos, incluido el nuestro, atribuyen al PRGF una serie de características que mejoran la cicatrización de las heridas: efecto angiogénico, antiinflamatorio, antibacteriano, estimulante sobre la epitelización/cicatrización cutánea y deposición de colágeno tanto en cantidad como en calidad.

Asociación de PRGF y AMSC

Introducción

En los últimos años, el incremento general del número de enfermedades degenerativas crónicas asociadas a la edad ha estimulado el desarrollo de estrategias alternativas efectivas para la reparación y regeneración de los tejidos dañados (Formigli et al., 2012). Siguiendo esta misma dirección, la terapia celular con células madre autólogas o alogénicas es hoy en día una de las alternativas más prometedoras para conseguir este objetivo. Las MSC derivadas de tejidos adultos están consideradas como las candidatas perfectas en medicina regenerativa, gracias a sus características únicas que son muy útiles cuando se trasladan a su aplicación clínica (Bianco and Robey, 2001). Las MSC participan en el proceso de cicatrización cutánea mediante su diferenciación, mecanismos paracrinós, autocrinós o a través de una acción inmuno-reguladora (Roubelakis et al., 2014). Por otro lado se encuentra PRP el que, como hemos visto, se emplea frecuentemente en procesos de reparación tisular, ya que promueve el proceso de re-epitelización cutánea (Marx, 2004). Los factores de crecimiento que contiene el PRP no solo

regulan la migración y proliferación celular sino que también remodelan la matriz extracelular y promueven la angiogénesis dando lugar a un ambiente beneficioso que estimula la cicatrización cutánea (Demidova-Rice et al., 2012b).

El uso conjunto de PRGF y AMSC en estudios tanto in vivo como in vitro es muy novedoso y actualmente existen muy pocos trabajos que empleen ambas terapias combinadas en piel, por lo que se trata de un tratamiento innovador. Hasta el momento se ha observado que la asociación de PRGF y AMSC en medio de cultivo favorece la proliferación y adherencia de las MSC, dando lugar a un mayor rendimiento celular (Rodríguez-Jimenez et al., 2012).

Variables estudiadas

Las heridas tratadas con AMSC+PRGF de forma combinada fueron las que mostraron mejores resultados en la gran mayoría de los parámetros evaluados, de forma que obtuvieron procesos de cicatrización mejores y más rápidos. Concretamente, el porcentaje de cicatrización de las heridas tratadas con AMSC+PRGF a días 2, 5 y 7 era significativamente superior no solo al grupo placebo como ocurre en el resto de los tiempos de estudio sino también al grupo de heridas tratadas únicamente con PRGF. En el caso del porcentaje de epitelización a nivel microscópico también se observa una epitelización cutánea significativamente superior en heridas tratadas con PRGF+AMSC tanto en comparación con las heridas placebo hasta el día 7 de estudio como con los grupos de heridas tratados de forma aislada con PRGF y AMSC respectivamente entre los tiempos 2 y 5 días. Podemos deducir que existe un efecto sinérgico del PRGF sobre las AMSC y viceversa, ya que el PRGF estimula la proliferación y migración de las AMSC y la producción de factores de crecimiento que a su vez, potencian la cicatrización cutánea. Además diversos estudios plantean que las MSC pueden diferenciarse en otro tipo de células dentro de el tejido dañado con el objetivo de promover la reparación y regeneración de la piel (Schneider et al., 2010). Estos resultados coinciden con Lian y colaboradores los cuales observaron una mejor curación de las heridas de espesor completo en ratas en el grupo tratado con MSC+PRP comparado con aquellas que solo fueron tratadas con PRP o solo con MSC (Lian et al., 2014).

A nivel del campo de la medicina estética no hemos encontrado estudios que utilicen de forma combinada PRP y células madre para tratar defectos cutáneos, no obstante con nuestro estudio hemos obtenido ciertos resultados que podrían resultar de interés en dicho campo. Las heridas tratadas con PRGF y AMSC mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en el color como en el grosor de cicatriz. A lo largo del estudio las heridas tratadas con AMSC+PRGF demostraron ser diferentes al grupo placebo y, además, a día 3 del estudio presentaron un color de cicatriz mas cercano al normal que el grupo de heridas tratado con

PRGF de manera más temprana. Además, también a día 3 el grosor de las heridas tratadas con AMSC+PRGF es menor que el grupo PRGF y placebo, pudiendo por lo tanto concluir que la asociación de PRGF con AMSC aporta un mejor aspecto estético a las heridas en un menor periodo de tiempo sin riesgo alguno de estimular la formación de cicatrices hipertróficas ni queloides.

El estudio microscópico de las heridas tratadas con PRGF+AMSC revela resultados muy positivos. Existe un efecto sinérgico entre el PRGF y las AMSC el cual potencia el proceso de angiogénesis y la deposición de fibras de colágeno en las heridas cutáneas. En el caso de la angiogénesis desde el día 2 del estudio, este grupo de heridas es el que presenta una mayor formación de nuevos vasos sanguíneos. Es decir, existe un estímulo del proceso de neovascularización de forma significativa con referencia a los grupos control y PRGF (observándose también una mejora estadísticamente significativa con respecto al grupo AMSC a día 3), duplicando el número de vasos en cada tiempo frente al resto de grupos. Adicionalmente, como hemos comentado, existe una mayor deposición de colágeno a medida que avanza el estudio, que es significativamente superior en la mayoría de los tiempos de estudio a los grupos control y PRGF y, específicamente, al grupo AMSC a día 2 del estudio, con lo que se produce una temprana formación del tejido de granulación, necesario para la cicatrización de las heridas.

En el estudio mencionado anteriormente, realizado por Lian y colaboradores, también se obtuvieron unos resultados acorde con los nuestros, ya que observaron una estimulación por parte de MSC+PRP en la formación de vasos sanguíneos en heridas quirúrgicas llevadas a cabo en ratas diabéticas. Sin embargo ellos observaron que el número de nuevos vasos sanguíneos formados en las heridas tratadas con PRGF+MSC era 0,5 veces superior a los que se encontraban en las heridas tratadas con MSC, y incluso 3 veces superior al grupo placebo (Lian et al., 2014). La respuesta angiogénica es crucial para el proceso de cicatrización, y es necesaria para incrementar la concentración de oxígeno y el aporte de nutrientes y, con ellos, asegurar la supervivencia de los queratinocitos y el mantenimiento del nuevo tejido de granulación formado. Además, como hemos mencionado ya con anterioridad, el PRP es una fuente rica en factores de crecimiento que estimula la angiogénesis en heridas (Ting et al., 2008).

Los fibroblastos reparan y remodelan las heridas y la migración de los queratinocitos promueve la reepitelización durante el proceso de cicatrización. En el estudio de Lian y colaboradores (2014) se obtuvo un incremento del TGF- β 1 en las heridas tratadas con PRP+MSC mayor que en los grupos PRP y MSC de forma aislada. El incremento de dicho factor de crecimiento promueve la síntesis de colágeno, fibronectina e integrina por los fibroblastos y, por lo tanto, estimula la migración celular epitelial (Atiba et al., 2011). Lian y colaboradores una vez

más, sugieren que el PRP asociado a MSC estimula la proliferación de células del tejido de granulación, promoviendo el incremento de células epiteliales e incrementan la expresión de TGF-B1 durante la fase temprana del proceso de cicatrización. Estas afirmaciones parten de la observación, al igual que en nuestro estudio, de una mayor densidad y número de fibras de colágeno (Lian et al., 2014). Estos mismos resultados también fueron observados por Elsharawy y colaboradores (2012) (Elsharawy et al., 2012).

Argolo Neto y colaboradores también obtuvieron resultados similares al los de nuestro estudio, en este caso las lesiones infiltradas con PRP y MSC fueron las que obtuvieron una concentración superior de fibras de colágeno, lo cual indica que existe una acción fibroblástica intensa y que los fibroblastos son una de las principales células involucradas en el reemplazo de la fibronectina y proteoglicanos, parte de la matriz extracelular, que forma el componente principal del tejido cicatricial (Argolo Neto et al., 2012).

No hay que olvidar que la inflamación es esencial para conseguir una buena cicatrización cutánea. Una fase inflamatoria prolongada o excesiva puede conducir a heridas cutáneas crónicas que no cicatrizan y permanecen en un estado de inflamación persistente. En nuestro estudio se ha demostrado que tanto el PRGF como las AMSC poseen efectos antiinflamatorios. Cuando ambos tratamientos son administrados en las heridas de forma conjunta siguen ejerciendo un potente efecto antiinflamatorio comparado con las heridas control pero dicho efecto no es significativamente más potente que cuando estas terapias se administran por separado. Se sabe que las MSC liberan una gran cantidad de factores solubles que interfieren con el comportamiento de las células inflamatorias (Nauta and Fibbe, 2007; Morrison and Spradling, 2008). Uno de los principales factores antiinflamatorios solubles producidos por las MSC es la indolamina 2, 3 dioxigenasa (IDO) (Takahashi et al., 2007), por lo que es posible que dicho factor haya contribuido a la reducción de la reacción inflamatoria durante el proceso de re-epitelización. Adicionalmente, los PRP han demostrado experimentalmente que inhiben reacciones inflamatorias excesivas y tempranas e interactúan con los macrófagos para mejorar la cicatrización tisular y la regeneración (Mishra and Pavelko, 2006).

Por último insistir en que se ha demostrado que el PRP es capaz de preservar la viabilidad de las MSC, de estimular su proliferación y migración, además de activar su actividad (Formigli et al., 2012). Diferentes concentraciones de PRP, desde 2% al 20%, pueden desencadenar efectos positivos sobre la proliferación y migración de células, además de poderse emplear para comprobar la eficacia de los PRP (Formigli et al., 2012). Factores expresados de forma frecuente y en elevadas concentraciones como el PDGF y MMP9 actúan de forma positiva, induciendo la migración de estas células (Formigli et al., 2012; Roubelakis et al., 2014). Estudios recientes (Wu

et al., 2007; Roubelakis et al., 2014) muestran que el PRP puede ser una herramienta útil para atraer poblaciones de células, como las MSC al área de la herida.

CONCLUSIONES

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio y bajo las condiciones establecidas en el mismo, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. Las Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) potencian el proceso de cicatrización y pueden considerarse un tratamiento efectivo en el manejo de heridas cutáneas agudas.
2. El uso de las Células Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) en heridas agudas al igual que el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) promueven la cicatrización mejorando todos los parámetros macroscópicos y microscópicos estudiados comparado con el grupo control, superando las AMSC los efectos del PRGF en cuanto a la epitelización cutánea, angiogénesis y aspecto estético de la herida.
3. La aplicación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) es un tratamiento sencillo, que mejora sustancialmente los resultados obtenidos con tratamientos convencionales, obteniendo una mejora tanto macroscópica como microscópica de las heridas tras su utilización.

4. La utilización de Células Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) de forma aislada o conjunta con PRGF, permite obtener los mejores resultados estéticos. En cambio, a nivel microscópico se observa que su asociación con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) mejora la epitelización, la angiogénesis y el depósito de colágeno en fases iniciales de la cicatrización cutánea.
5. La asociación de ambas terapias, Células Mesenquimales Derivadas de Grasa junto con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (AMSC+PRGF) en inyección única cutánea perilesional, ha demostrado ser la opción más efectiva tanto a nivel macroscópico como microscópico para el tratamiento de heridas cutáneas agudas.
6. El empleo de Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC) alogénicas ha sido efectivo en el tratamiento de heridas cutáneas agudas y no ha resultado en la aparición de reacciones adversas dentro de las condiciones de nuestro estudio.
7. Si bien el tratamiento con Células Mesenquimales Derivadas de Grasa (AMSC), de forma aislada o conjunta con PRGF, ha demostrado ser más efectivo que el empleo de PRGF de forma aislada, la disponibilidad de dicha terapia (AMSC) puede limitar su uso en heridas cutáneas agudas, indicando en su caso el uso de PRGF en una primera fase del tratamiento teniendo en cuenta los resultados de nuestro estudio.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Limitaciones del Estudio

Desde un punto de vista crítico, es necesario revisar la metodología de trabajo empleada e identificar las posibles limitaciones del mismo para poder realizar una interpretación más correcta de los resultados y de esta forma, aprender de las mismas para mejorar en futuros trabajos de investigación en esta línea.

En el presente estudio podemos identificar una serie de limitaciones que deben ser consideradas. Una de las limitaciones del estudio fue la necesidad de emplear células alogénicas procedentes de un solo conejo, cuando en la clínica diaria se suelen emplear MSC autólogas, aunque los resultados fueron igualmente positivos y prometedores. La realización de heridas cutáneas quirúrgicas y por lo tanto agudas también puede ser considerado como limitación en el caso de querer extrapolar nuestros resultados a heridas complicadas (úlceras cutáneas), ya que el proceso de cicatrización difiere entre ambas, pero aporta datos y opciones terapéuticas que pueden ser importantes en estudios futuros.

Con referencia al tratamiento con PRGF o AMSC, se optó por una sola administración de forma perilesional pero, como hemos visto, existen diferentes formas de aplicación de dichas terapias y una gran controversia con respecto al volumen y concentración efectiva en el proceso de cicatrización cutánea. De manera que no conocemos el efecto que tendría sobre el proceso de cicatrización cutánea la aplicación de más o menos inyecciones de PRGF o AMSC con mayores o menores concentraciones de células y factores de crecimiento respectivamente. Tampoco se ha evaluado cuál sería el efecto que tendría sobre la cicatrización cutánea el acortar o alargar el periodo entre aplicaciones en el caso de realizar más de una infiltración.

Otra limitación de este trabajo se relaciona con la formulación del PRGF. En la especie humana, Anitua y colaboradores (1999) han tipificado y detallado con precisión la composición del PRGF obtenido según la metodología que ellos han desarrollado. Por el momento, no se han realizado estudios cuantitativos en la especie cunícula que determinen la composición y concentración de los diferentes factores de crecimiento que componen el PRGF, por lo que futuros estudios deberían indagar en esta cuestión.

En el caso de querer extrapolar integramente los resultados del presente estudio al campo de la dermatología humana, como hemos comentado en el apartado de la discusión, el conejo, al igual que otras especies como los roedores, no es el modelo experimental de elección para estudiar el proceso de cicatrización cutánea debido a pequeñas diferencias anatómicas. Es el cerdo el que posee una arquitectura cutánea más similar al ser humano, salvo la ausencia de glándulas sudoríparas, no obstante son numerosos los estudios realizados en conejos que estudian la aplicación de diferentes terapias para promover la cicatrización cutánea y estos son aceptados y validados. No obstante, las primeras aplicaciones terapéuticas han de realizarse en modelos animales más simples, accesibles y que permitan trabajar con un número suficiente de individuos. De esta manera podemos detallar mucho mejor las pautas a seguir en futuros estudios experimentales en otras especies más próximas a la humana y en estudios clínicos posteriores.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Futuras líneas de investigación

Una vez finalizada la presente tesis doctoral, analizados sus resultados y evaluadas sus limitaciones, se plantean nuevos interrogantes que pueden servir de base para futuros trabajos de investigación en esta línea de trabajo en terapias regenerativas.

El presente trabajo analiza los resultados de tratar heridas agudas. Si bien estas lesiones son importantes en la clínica diaria, lo son mucho más las heridas crónicas. Por este motivo sería muy interesante llevar a cabo un estudio clínico y experimental en animales con heridas crónicas, como resultado de patologías concretas como diabetes o asociadas a traumatismos, evaluando la efectividad de las terapias regenerativas utilizadas en nuestro trabajo.

En cuanto a la terapia con células madre, es muy interesante para un futuro próximo, el plantear otras vías de administración de las mismas, como por ejemplo la vía intravenosa, para así poder evaluar la capacidad que tienen estas células de migrar al lugar lesionado y llevar a cabo su mecanismo de acción. Esto facilitaría sustancialmente su uso en una gran variedad de patologías.

La tipificación tanto cualitativa como cuantitativa del PRGF en la especie cunícula facilitaría trabajos en una líneas futuras que pretendan utilizar esta especie para el estudio de terapias regenerativas.

Por otro lado, también podríamos plantear el uso de otros modelos animales de experimentación, como puede ser el cerdo en el caso de que buscásemos una especie animal lo más semejante anatómica y fisiológicamente a la piel del ser humano, en el caso de querer extrapolar de forma más precisa los resultados obtenidos.

La creación de un banco de tejidos para poder conservar grasa y de ella obtener células madre alogénicas o autólogas podría considerarse una muy buena opción para poder ofrecer dicho servicio a todos los pacientes sin necesidad de tener que ser sometidos a una cirugía, y mediante una disponibilidad inmediata.

Por último también sería de interés el evaluar la asociación de estas terapias regenerativas con otros tipos de terapias como puede ser la terapia en vacío (VAC) o diferentes tipos de curas, además de su utilización en cirugía plástica.

RESUMEN

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Resumen

La piel es el órgano más grande del cuerpo, además de constituir la barrera anatómica y fisiológica entre el individuo y el ambiente. Se trata de un tejido con capacidad regenerativa y autorreparadora que forma una importante barrera protectora frente al ambiente externo. Cualquier daño en la piel da lugar a efectos debilitantes en esta, dando lugar a la formación de heridas.

En los últimos años, se ha producido un incremento en la prevalencia de aparición de heridas cutáneas agudas y crónicas con problemas de cicatrización tanto en medicina humana como en veterinaria, debido mayoritariamente a un incremento de la esperanza de vida en nuestros pacientes. Millones de personas en el mundo sufren heridas agudas o crónicas como consecuencia de cirugías, laceraciones accidentales, infecciones, quemaduras, úlceras por presión, venosas o diabéticas. Los tratamientos para estas heridas cutáneas suponen grandes inversiones económicas. Por ello, resulta necesario desarrollar nuevos abordajes terapéuticos para el tratamiento de estas heridas. Estos, además, deben de ser económicos y aplicables a gran escala.

El uso de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) y Células Madre Mesenquimales (MSC) en el campo de la medicina regenerativa se considera hoy en día como referencia terapéutica. Cada vez se tiende a ser menos traumático a la hora de reparar lesiones tisulares y se opta por terapias regenerativas, sencillas de obtener y a la vez inocuas.

El objetivo del presente trabajo ha sido la evaluación del efecto de las AMSC y el PRGF, así como de la asociación entre ambos, en heridas cutáneas experimentales, empleando como modelo animal el conejo.

Para llevar a cabo dicho estudio se seleccionaron un total de 72 hembras sanas de la especie cunícula, que fueron sometidas a una breve exploración física y analítica sanguínea para comprobar su estado de salud. Una vez incluidos en el estudio, se dividieron de forma aleatoria en 6 grupos de estudio, que contenían un total de 12 animales por grupo. A continuación, cada uno de los animales fue sometido a anestesia general para la realización de 4 heridas quirúrgicas escisionales de espesor completo en la zona dorsal toracolumbar (previa preparación con rasurado y desinfección de la zona) mediante el uso de *punch* de biopsia de 8 mm. Adicionalmente, tras la obtención de PRGF autólogo y AMSC alogénico, se llevó a cabo una única infiltración intraquirúrgica de cada uno de los tratamientos en las heridas correspondientes siguiendo el mismo patrón en cada conejo.

Posteriormente, se estudió la evolución macroscópica (aspecto estético y cicatrización) y microscópica (epitelización, inflamación, angiogénesis y deposición de colágeno) a días 1, 2, 3, 5, 7 y 10 tras el proceso quirúrgico. El estudio histológico se llevó a cabo mediante las tinciones de hematoxilina eosina y tricrómica de Masson.

Tras el análisis estadístico de las variables estudiadas, se obtuvieron los resultados que se exponen a continuación. Respecto a la cicatrización cutánea macroscópica de las heridas, aquellas que fueron infiltradas con AMSC (de forma aislada o asociada con PRGF) obtuvieron mayores porcentajes de cicatrización cutánea que las heridas tratadas únicamente con PRGF o las placebo. De esta forma, se consigue una aceleración estadísticamente significativa del proceso de cicatrización. Los mejores valores se obtuvieron en las heridas tratadas con PRGF+AMSC. Ante la evaluación del aspecto estético de las heridas, aquellas que reciben tratamiento con células son las que consiguen una coloración y grosor de cicatriz más similar al de una cicatriz fisiológica a corto plazo. Los resultados son incluso mejores cuando las AMSC se asocian a los PRGF.

En cuanto a la valoración microscópica de las heridas cutáneas, se observa claramente un fuerte estímulo de la epitelización cutánea de las heridas de forma estadísticamente significativa

a lo largo de los tiempos de estudio en las heridas que fueron tratadas con AMSC (de forma aislada o conjunta con PRGF), especialmente a corto plazo (en los primeros 5 días). Los mejores resultados se apreciaron en las heridas que recibieron como tratamiento la asociación de AMSC con PRGF. Todas las heridas que recibieron tratamiento con células o PRGF presentaron un mayor efecto antiinflamatorio con respecto a las del grupo heridas placebo, por lo que tanto las AMSC como los PRGF disminuyen de forma significativa la intensidad de la reacción inflamatoria, consiguiendo potenciar este efecto cuando se asocian ambas terapias, mientras que la distribución del proceso inflamatorio en las heridas se mantuvo estable sin diferencias entre grupos. El proceso de neovascularización se encuentra potenciado en aquellas heridas tratadas con AMSC (de forma aislada o conjunta con PRGF). Cabe destacar el grupo PRGF+AMSC que muestra un incremento estadísticamente significativo a lo largo del estudio en la formación de nuevos vasos sanguíneos, y llega incluso a duplicar la creación de nuevos vasos sanguíneos con respecto al resto de grupos a día 3 del estudio. Por último, apreciamos una mayor deposición de fibras de colágeno maduro en las heridas tratadas con PRGF+AMSC de forma significativa y progresiva a lo largo del estudio, siendo estadísticamente superior al grupo PRGF y al grupo placebo.

Tras analizar los resultados logrados en el estudio, podemos decir que la mejor terapia regenerativa para conseguir acelerar los tiempos de cicatrización cutánea (gracias a una mayor angiogénesis en la zona, menor inflamación y mayor deposición de fibras de colágeno) y lograr un mejor aspecto estético de las heridas es la asociación de AMSC y PRGF, ya que existe un efecto sinérgico entre ambas terapias.

ABSTRACT

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

Abstract

The skin is the largest organ in the body, as well as the main anatomical and physiological barrier between the individual and the environment. It can regenerate and self-repair, which makes it an important protective barrier from the external environment. Any skin injury weakens it, giving rise to wounds.

During the last years, acute and chronic skin wound prevalence has increased in both human and veterinary medicine, mostly due to an increase in our patient's life expectancy. Millions of humans all over the world suffer from acute and chronic wounds as a result of surgeries, accidental lacerations, infections, burns, pressure ulcers, diabetic or venous ulcers. The treatments of these injuries involves a high economic cost. For this reason, there is an increasing need for the development of new inexpensive therapeutic approaches to treat these wounds.

The use of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) and Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (AMSC) are today the gold-standard in regenerative medicine. The trend nowadays is to

avoid using traumatic techniques for tissue repair and choose instead regenerative therapies, which are both easy to perform and harmless, are preferred.

The aim of this study is to evaluate the effect of AMSC, PRGF and the combination of both on experimental acute cutaneous wounds in rabbits.

A total of 72 healthy females were used in the study. General physical examinations and basic blood tests were carried out in order to check their health state. Once the animals were included in the study, they were randomly divided into 6 different groups depending on their survival time. Each of these groups included 12 rabbits. Following this, the animals were anaesthetised, and four identical surgical wounds were performed over the dorsal thoracolumbar area of each of the rabbits, using an 8 mm biopsy punch. Just after obtaining the PRGF and the allogenic AMSC, they were injected into the corresponding wounds.

The macroscopic (wound healing percentage and aesthetic aspect) and microscopic (epithelization, angiogenesis, collagen deposition and inflammation) evolution of all wounds was studied 1, 2, 3, 5, 7 and 10 days after the experimental surgery. The histological study was carried out using hematoxylin-eosin stain and Masson's Trichrome stain.

Once the statistical study was carried out, the following results were obtained: regarding the macroscopic wound healing process, those wounds treated with AMSC (alone or together with PRGF) show higher wound healing percentages compared to wounds which were just treated with PRGF or control wounds, and therefore showing a statistically significant acceleration of the healing process. The PRGF+AMSC group showed the best results. When evaluating the aesthetic aspect of the wounds, those treated with AMSC had a better colour and were thinner, more similar to a physiological scar in a short term. The results were even better as for when AMSC were injected together with PRGF.

As for the microscopic evaluation of the wounds, it can be clearly seen that the epithelization process was stimulated by AMSC (alone, or together with PRGF) specially during the first 5 days. Once again even higher epithelisation rates were obtained in those wounds which were treated with AMSC+PRGF. Every wound treated with either cells or PRGF or the combination of both showed a statistically significant decrease on the inflammatory process compared to the control group. The neovascularization process was more powerful on those wounds treated with AMSC (alone or together with PRGF). The AMSC+PRGF group clearly stands out showing a significant statistical increase on the new blood vessel formation process, doubling the number of newly formed blood vessels at day 3 compared to the rest of the groups. Finally, a higher deposition of mature collagen fibres on wounds treated with AMSC+PRGF could also be

progressively appreciated along the study, being significantly higher than the PRGF and the control group.

To conclude, the best regenerative therapy to accelerate the wound healing process and to achieve a better aesthetic aspect is the association of AMSC+PRGF.

BIBLIOGRAFÍA

Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento Autólogo en Asociación con Células Madre Mesenquimales Derivadas de Grasa en el Tratamiento de Heridas Experimentales en el Conejo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abegao, K.G., Bracale, B.N., Delfim, I.G., Santos, E.S., Laposy, C.B., Nai, G.A., Giuffrida, R., Nogueira, R.M., 2015. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 30, 209-215.
- Ackermann, M.R., 2011. Inflammation and healing. In: Zachary, F.J., McGavin, D.M. (Eds.), *Pathologic basis of veterinary disease*. Elsevier, Missouri, 60-88.
- Aflatoonian, B., Moore, H., 2005. Human primordial germ cells and embryonic germ cells, and their use in cell therapy. *Current opinion in biotechnology* 16, 530-535.
- Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
- Ahn, J.O., Coh, Y.R., Lee, H.W., Shin, I.S., Kang, S.K., Youn, H.Y., 2015. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells inhibit melanoma growth in vitro and in vivo. *Anticancer research* 35, 159-168.
- Al-Attar, A., Mess, S., Thomassen, J.M., Kauffman, C.L., Davison, S.P., 2006. Keloid pathogenesis and treatment. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 286-300.
- Al-Bagdadi, F., 2013. The integument. In: Elsevier (Ed.), *Miller's anatomy of the dog*. Missouri.

- Al-Bagdadi, F.A., Titkemeyer, C.W., Lovell, J.E., 1977. Hair follicle cycle and shedding in male beagle dogs. *Am J Vet Res* 38, 611-616.
- Alio, J.L., Colecha, J.R., Pastor, S., 2008. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 2008. *Ophthalmic Res* 39, 124-129.
- Altman, A.M., Matthias, N., Yan, Y., Song, Y.H., Bai, X., Chiu, E.S., Slakey, D.P., Alt, E.U., 2008. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 29, 1431-1442.
- Altman, A.M., Yan, Y., Matthias, N., Bai, X., Rios, C., Mathur, A.B., Song, Y.H., Alt, E.U., 2009. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem cells* 27, 250-258.
- Amat, A., Mazo, R., García, M., 2009. Estructura y función cutánea, cicatrización. In: Sopena, J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 3-30.
- Andia, I., Abate, M., 2015. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert opinion on biological therapy* 15, 987-999.
- Andree, C., Swain, W.F., Page, C.P., Macklin, M.D., Slama, J., Hatzis, D., Eriksson, E., 1994. In vivo transfer and expression of a human epidermal growth factor gene accelerates wound repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12188-12192.
- Anitua, E., 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 14, 529-535.
- Anitua, E., 2001. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). *Gaceta Dental* 123, 50-54.
- Anitua, E., Andia, I., 2000. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). . In: Anitua, E., Andia, I. (Eds.), *Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF)*. Vitoria, 13-55.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T., 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis* 91, 4-15.
- Anitua, E., Andia, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zaldueño, M., de la Fuente, M., Nurden, P., Nurden, A.T., 2005. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23, 281-286.
- Anitua, E., Prado, R., Sanchez, M., Gorka, O., 2012. Platelet-Rich Plasma: Preparation and formulation. *Oper Tech Orthop* 22, 25-32.
- Anitua, E., Sanchez, M., Orive, G., Andia, I., 2007. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 28, 4551-4560.
- Anitua, E., Sanchez, M., Orive, G., Andia, I., 2008. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends in pharmacological sciences* 29, 37-41.
- Anitua, E., Sanchez, M., Orive, G., Andia, I., 2009. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *Journal of biomedical materials research. Part A* 90, 1262-1263.

- Ansurudeen, I., Sunkari, V.G., Grunler, J., Peters, V., Schmitt, C.P., Catrina, S.B., Brismar, K., Forsberg, E.A., 2012. Carnosine enhances diabetic wound healing in the db/db mouse model of type 2 diabetes. *Amino acids* 43, 127-134.
- Antoniades, H.N., Stathakos, D., Scher, C.D., 1975. Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 2635-2639.
- Appel, T.R., Potzsch, B., Muller, J., von Lindern, J.J., Berge, S.J., Reich, R.H., 2002. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clinical oral implants research* 13, 522-528.
- Argolo Neto, N.M., Del Carlo, R.J., Monteiro, B.S., Nardi, N.B., Chagastelles, P.C., de Brito, A.F., Reis, A.M., 2012. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clin Exp Dermatol* 37, 544-553.
- Arnas, M., Ballester, J., Molinos, J., 2002. Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. *Odontostomatología de implantes* 10, 202-208.
- Arnás, M., Ballester, J., Molinos, J., 2002. Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. *Odontostomatología de implantes* 10, 202-208.
- Arquero, P., 2009. Plasma rico en plaquetas en cirugía estética. *Cir Estet Plas* 5, 42-48.
- Arrick, B.A., Lopez, A.R., Elfman, F., Ebner, R., Damsky, C.H., Derynck, R., 1992. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *The Journal of cell biology* 118, 715-726.
- Assoian, R.K., Sporn, M.B., 1986. Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *The Journal of cell biology* 102, 1217-1223.
- Astor, D.E., Hoelzler, M.G., Harman, R., Bastian, R.P., 2013. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. *Can J Vet Res* 77, 177-182.
- Atiba, A., Nishimura, M., Kakinuma, S., Hiraoka, T., Goryo, M., Shimada, Y., Ueno, H., Uzuka, Y., 2011. Aloe vera oral administration accelerates acute radiation-delayed wound healing by stimulating transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor production. *American journal of surgery* 201, 809-818.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.
- Atri, S.C., Misra, J., Bisht, D., Misra, K., 1990. Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers. *Surgery* 108, 508-512.
- Attinger, C.E., Janis, J.E., Steinberg, J., Schwartz, J., Al-Attar, A., Couch, K., 2006. Clinical approach to wounds: debridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 72S-109S.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Lopez-Casillas, F., Massague, J., 1994. TGF-beta receptors and actions. *Biochimica et biophysica acta* 1222, 71-80.
- Aznar Lucea, J., Martinez, M., 2012. [Ethical reflections on cell reprogramming]. *Cuad Bioet* 23, 287-299.

- Bacha, J.W., Bacha, L., 2001. Tegumento. In: Bacha, J.W., Bacha, L. (Eds.), Atlas color de histología veterinaria. Inter-médica, Buenos Aires, Argentina, 87-120.
- Badiavas, E.V., Falanga, V., 2003. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. Archives of dermatology 139, 510-516.
- Badiavas, E.V., Ford, D., Liu, P., Kouttab, N., Morgan, J., Richards, A., Maizel, A., 2007. Long-term bone marrow culture and its clinical potential in chronic wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 15, 856-865.
- Balaguer, A., Berrocal, A., 1999. Factores de crecimiento hemopoyético y anafilaxia . Medicina clínica 112.
- Balbino, C.A., Pereira, L.M., Curi, R., 2005. Mechanisms involved in wound healing. Rev. Bras. Cienc. Farm 41, 27-51.
- Banfi, G., Corsi, M.M., Volpi, P., 2006. Could platelet rich plasma have effects on systemic circulating growth factors and cytokine release in orthopaedic applications? British journal of sports medicine 40, 816.
- Banks, W., 1993. Applied veterinary histology. Mosby year book Texas.
- Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., Brem, H., 2009. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. The Journal of surgical research 153, 347-358.
- Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 1999. Growth factor regulation of fracture repair. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 14, 1805-1815.
- Barrandon, Y., Green, H., 1987. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. Cell 50, 1131-1137.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 16, 585-601.
- Barzilay, R., Melamed, E., Offen, D., 2009. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. Stem Cells 27, 2509-2515.
- Bauer, S.M., Bauer, R.J., Velazquez, O.C., 2005. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. Vascular and endovascular surgery 39, 293-306.
- Baum, C.L., Arpey, C.J., 2005. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. Dermatol Surg 31, 674-686; discussion 686.
- Bazzoni, G., Dejana, E., Del Maschio, A., 1991. Platelet-neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. Haematologica 76, 491-499.
- Beal, M.W., Brown, D.C., Shofer, F.S., 2000. The effects of perioperative hypothermia and the duration of anesthesia on postoperative wound infection rate in clean wounds: a retrospective study. Veterinary surgery : VS 29, 123-127.
- Beck, L.S., Deguzman, L., Lee, W.P., Xu, Y., McFatridge, L.A., Amento, E.P., 1991. TGF-beta 1 accelerates wound healing: reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. Growth factors 5, 295-304.

- Beckrich, K., Aronovitch, S.A., 1999. Hospital-acquired pressure ulcers: a comparison of costs in medical vs. surgical patients. *Nurs Econ* 17, 263-271.
- Behm, B., Babilas, P., Landthaler, M., Schreml, S., 2012. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 26, 812-820.
- Bennett, N.T., Schultz, G.S., 1993a. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *American journal of surgery* 165, 728-737.
- Bennett, N.T., Schultz, G.S., 1993b. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *American journal of surgery* 166, 74-81.
- Berman, B., Maderal, A., Raphael, B., 2016. Keloids and Hypertrophic Scars: Pathophysiology, Classification, and Treatment. *Dermatol Surg*.
- Bernuzzi, G., Tardito, S., Bussolati, O., Adorni, D., Cantarelli, S., Fagnoni, F., Rossetti, A., Azzarone, M., Ficarelli, E., Caleffi, E., Gazzola, G., Franchini, M., 2010. Platelet gel in the treatment of cutaneous ulcers: the experience of the Immunohaematology and Transfusion Centre of Parma. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 8, 237-247.
- Bianco, P., Robey, P.G., 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414, 118-121.
- Bigham-Sadegh, A., Mirshokraei, P., Karimi, I., Oryan, A., Aparviz, A., Shafiei-Sarvestani, Z., 2012. Effects of adipose tissue stem cell concurrent with greater omentum on experimental long-bone healing in dog. *Connective tissue research* 53, 334-342.
- Bing, M., Da-Sheng, C., Zhao-Fan, X., Dao-Feng, B., Wei, L., 2007. Randomized, multicenter, double-blind, and placebo-controlled trial using topical recombinant human acidic fibroblast growth factor for deep partial-thickness burns and skin graft donor site. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 795-799.
- Black, L.L., Gaynor, J., Adams, C., Dhupa, S., Sams, A.E., Taylor, R., Harman, S., Gingerich, D.A., Harman, R., 2008. Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary therapeutics : research in applied veterinary medicine* 9, 192-200.
- Blanton, M.W., Hadad, I., Johnstone, B.H., Mund, J.A., Rogers, P.I., Eppley, B.L., March, K.L., 2009. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 123, 56S-64S.
- Blasi, A., Martino, C., Balducci, L., Saldarelli, M., Soleti, A., Navone, S.E., Canzi, L., Cristini, S., Invernici, G., Parati, E.A., Alessandri, G., 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular cell* 3, 5.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *The New England journal of medicine* 342, 1350-1358.
- Bodnar, R.J., 2013. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Advances in wound care* 2, 24-29.
- Bohling, M.W., Henderson, R.A., Swaim, S.F., Kincaid, S.A., Wright, J.C., 2004. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Veterinary surgery : VS* 33, 579-587.

- Bonewald, L.F., Mundy, G.R., 1990. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clinical orthopaedics and related research*, 261-276.
- Booi, D.I., Debats, I.B., Boeckx, W.D., van der Hulst, R.R., 2008. A study of perfusion of the distal free-TRAM flap using laser Doppler flowmetry. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 61, 282-288.
- Border, W.A., Ruoslahti, E., 1992. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *The Journal of clinical investigation* 90, 1-7.
- Borena, B.M., Martens, A., Broeckx, S.Y., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L., Spaas, J.H., 2015. Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 36, 1-23.
- Borena, B.M., Pawde, A.M., Amarpal, Aithal, H.P., Kinjavdekar, P., Singh, R., Kumar, D., 2010. Evaluation of autologous bone marrow-derived nucleated cells for healing of full-thickness skin wounds in rabbits. *International wound journal* 7, 249-260.
- Boulton, A., Vileikyte, L., Ragnarson-Tennvall, G., 2005. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* 12;366, 1719-1724.
- Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L., Grotendorst, G.R., 1991. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *The Journal of cell biology* 114, 1285-1294.
- Branski, L.K., Gauglitz, G.G., Herndon, D.N., Jeschke, M.G., 2009. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns* 35, 171-180.
- Braun, S., Krampert, M., Bodo, E., Kumin, A., Born-Berclaz, C., Paus, R., Werner, S., 2006. Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents. *Journal of cell science* 119, 4841-4849.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., Nischt, R., 2009. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 132, 1-10.
- Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation* 117, 1219-1222.
- Broughton, G., 2nd, Janis, J.E., Attinger, C.E., 2006. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 12S-34S.
- Brown, D.L., Kane, C.D., Chernaused, S.D., Greenhalgh, D.G., 1997. Differential expression and localization of insulin-like growth factors I and II in cutaneous wounds of diabetic and nondiabetic mice. *The American journal of pathology* 151, 715-724.
- Brown, G.L., Curtsinger, L., Jurkiewicz, M.J., Nahai, F., Schultz, G., 1991. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plastic and reconstructive surgery* 88, 189-194; discussion 195-186.
- Brown, G.L., Nanney, L.B., Griffen, J., Cramer, A.B., Yancey, J.M., Curtsinger, L.J., 3rd, Holtzin, L., Schultz, G.S., Jurkiewicz, M.J., Lynch, J.B., 1989. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *The New England journal of medicine* 321, 76-79.
- Brown, R.L., Breeden, M.P., Greenhalgh, D.G., 1994. PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *The Journal of surgical research* 56, 562-570.

- Brunt, J.V., Klausner, a., 1988. Growth factors speed wound healing. *Nat Biotechnol* 6, 25-30.
- Buckley, A., Davidson, J.M., Kamerath, C.D., Woodward, S.C., 1987. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. *The Journal of surgical research* 43, 322-328.
- Burgess, A.W., 1989. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *British medical bulletin* 45, 401-424.
- Butler, K.L., Goverman, J., Ma, H., Fischman, A., Yu, Y.M., Bilodeau, M., Rad, A.M., Bonab, A.A., Tompkins, R.G., Fagan, S.P., 2010. Stem cells and burns: review and therapeutic implications. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* 31, 874-881.
- Cahan, P., Daley, G.Q., 2013. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 357-368.
- Canalis, E., 1992. Clinical review 35: Growth factors and their potential clinical value. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 75, 1-4.
- Canalis, E., McCarthy, T., Centrella, M., 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *The Journal of clinical investigation* 81, 277-281.
- Canalis, E., McCarthy, T.L., Centrella, M., 1991. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annual review of medicine* 42, 17-24.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 641-650.
- Carrillo, J.M., 2002. Estudio experimental de la utilización de implantes de poliamida en la resolución de fracturas oblicuas de fémur en conejo. *Medicina y Cirugía animal. Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, España.*
- Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, C.E., Sr., Hendren, D.G., Kane, C.J., 2003. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and molecular pathology* 74, 244-255.
- Castellanos, G., Rodriguez, G., Iregui, C., 2005. Estructura histológica normal del perro. *Revista de medicina veterinaria* 10, 109-122.
- Centrella, M., Massague, J., Canalis, E., 1986. Human platelet-derived transforming growth factor-beta stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvariae. *Endocrinology* 119, 2306-2312.
- Chan, B.P., Fu, S., Qin, L., Lee, K., Rolf, C.G., Chan, K., 2000. Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta orthopaedica Scandinavica* 71, 513-518.
- Chan, R.K., Garfein, E., Gigante, P.R., Liu, P., Agha, R.A., Mulligan, R., Orgill, D.P., 2007. Side population hematopoietic stem cells promote wound healing in diabetic mice. *Plastic and reconstructive surgery* 120, 407-411; discussion 412-403.
- Chan, T.W., Dalinka, M.K., Steinberg, M.E., Kressel, H.Y., 1991. MRI appearance of femoral head osteonecrosis following core decompression and bone grafting. *Skeletal radiology* 20, 103-107.
- Charge, S.B., Rudnicki, M.A., 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological reviews* 84, 209-238.

- Chen, F.M., Zhang, M., Wu, Z.F., 2010. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials* 31, 6279-6308.
- Chen, L., Tredget, E.E., Liu, C., Wu, Y., 2009. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PLoS one* 4, e71119.
- Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y., Wu, Y., 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS one* 3, e1886.
- Cherry, A.B., Daley, G.Q., 2012. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell* 148, 1110-1122.
- Cherubino, M., Rubin, J.P., Miljkovic, N., Kelmendi-Doko, A., Marra, K.G., 2011. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Annals of plastic surgery* 66, 210-215.
- Cheryl S, H., 2009. Cirugía del sistema tegumentario. In: Welch Fossum, T. (Ed.), *Cirugía en pequeños animales*. Elsevier, Barcelona, España, 159-259.
- Chopra, R., Anastassiades, T., 1998. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *The Journal of rheumatology* 25, 1578-1584.
- Chung, C.S., Fujita, N., Kawahara, N., Yui, S., Nam, E., Nishimura, R., 2013. A Comparison of Neurosphere Differentiation Potential of Canine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*.
- Chung, T.H., Baek, D.S., Kim, N., Park, J.H., Park, C., 2015. Topical allogeneic platelet-rich plasma treatment for a massive cutaneous lesion induced by disseminated intravascular coagulation in a toy breed dog. *Irish veterinary journal* 68, 4.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.J., Johnson, J., Meisner, L., Lanza, R., 2006. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216-219.
- Cianforlini, M., Mattioli-Belmonte, M., Manzotti, S., Chiurazzi, E., Piani, M., Orlando, F., Provinciali, M., Gigante, A., 2015. Effect of Platelet Rich Plasma Concentration on Skeletal Muscle Regeneration: An Experimental Study. *J Biol Regul Homeost Agents* 29, 47-55.
- Clark, D.A., Coker, R., 1998. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 293-298.
- Clark, R.A., 1996. Wound repair, overview and general considerations. In: Clark, R. (Ed.), *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum press, New York, 257-288.
- Cohen, S., 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *The Journal of biological chemistry* 237, 1555-1562.
- Cole, B.J., Seroyer, S.T., Filardo, G., Bajaj, S., Fortier, L.A., 2010. Platelet-rich plasma: where are we now and where are we going? *Sports health* 2, 203-210.
- Conway, K., Price, P., Harding, K.G., Jiang, W.G., 2006. The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 14, 2-10.

- Corral, C.J., Siddiqui, A., Wu, L., Farrell, C.L., Lyons, D., Mustoe, T.A., 1999. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Archives of surgery* 134, 200-205.
- Cowin, A.J., Holmes, T.M., Brosnan, P., Ferguson, M.W., 2001. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol* 11, 424-431.
- Crane, S.W., 1989. Nutritional aspects of wound healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 4, 263-267.
- Cross, K.J., Mustoe, T.A., 2003. Growth factors in wound healing. *The Surgical clinics of North America* 83, 531-545, vi.
- Crovetti, G., Martinelli, G., Issi, M., Barone, M., Guizzardi, M., Campanati, B., Moroni, M., Carabelli, A., 2004. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 30, 145-151.
- Crowder, S.W., Horton, L.W., Lee, S.H., McClain, C.M., Hawkins, O.E., Palmer, A.M., Bae, H., Richmond, A., Sung, H.J., 2013. Passage-dependent cancerous transformation of human mesenchymal stem cells under carcinogenic hypoxia. *FASEB J* 27, 2788-2798.
- Cuervo, B., 2015. Estudio clínico multicéntrico del efecto de la aplicación de células mesenquimales de grasa (CMG), plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), y la combinación de ambos en el tratamiento de la enfermedad degenerativa articular en perro., *Medicina y cirugía animal. Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia, esPAÑA*.
- Cui, Q., Xiao, Z., Li, X., Saleh, K.J., Balian, G., 2006. Use of genetically engineered bone-marrow stem cells to treat femoral defects: an experimental study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 88 Suppl 3, 167-172.
- Cullinane, A.B., O'Callaghan, P., McDermott, K., Keohane, C., Cleary, P.E., 2002. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healing in an animal model. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 240, 35-41.
- Dabiri, G., Heiner, D., Falanga, V., 2013. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds. *Expert Opin Emerg Drugs* 18, 405-419.
- Damiá, E., 2012. Estudio experimental sobre la influencia del PRGF en la concentración sérica de IGF-1 y la proteína C-reactiva en la especie canina *Medicina y cirugía animal. CEU Cardenal Herrera, Valencia*.
- Davidson, R.K., Waters, J.G., Kevorkian, L., Darrach, C., Cooper, A., Donell, S.T., Clark, I.M., 2006. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis research & therapy* 8, R124.
- De La Mata, J., 2013. Platelet rich plasma. A new treatment tool for the rheumatologist? *Reumatol Clin* 9, 166-171.
- Delgado, A.V., McManus, A.T., Chambers, J.P., 2005. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Experimental biology and medicine* 230, 271-280.
- Dellman, D., 1993. *Histología veterinaria*. Zaragoza.
- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R., Herman, I.M., 2012a. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in skin & wound care* 25, 304-314.

- Demidova-Rice, T.N., Wolf, L., Deckenback, J., Hamblin, M.R., Herman, I.M., 2012b. Human platelet-rich plasma- and extracellular matrix-derived peptides promote impaired cutaneous wound healing in vivo. *PloS one* 7, e32146.
- Dercole, A., 1991. *Modern concepts of insulin-like growth factors*. Elsevier New York, USA.
- DeRossi, R., Coelho, A.C., Mello, G.S., Frazilio, F.O., Leal, C.R., Facco, G.G., Brum, K.B., 2009. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 24, 276-281.
- Dhillon, R.S., Schwarz, E.M., Maloney, M.D., 2012. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis research & therapy* 14, 219.
- Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L., Simon, J.C., 2010. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental dermatology* 19, 697-706.
- Diekman, B.O., Guilak, F., 2013. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. *Current opinion in rheumatology* 25, 119-126.
- Ding, D.C., Shyu, W.C., Chiang, M.F., Lin, S.Z., Chang, Y.C., Wang, H.J., Su, C.Y., Li, H., 2007. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiology of disease* 27, 339-353.
- Dionyssiou, D., Demiri, E., Foroglou, P., Cheva, A., Saratzis, N., Aivazidis, C., Karkavelas, G., 2013. The effectiveness of intralesional injection of platelet-rich plasma in accelerating the healing of chronic ulcers: an experimental and clinical study. *International wound journal* 10, 397-406.
- Dohan Ehrenfest, D.M., Andia, I., Zumstein, M.A., Zhang, C.Q., Pinto, N.R., Bielecki, T., 2014. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 4, 3-9.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Dorransoro, A., Fernandez-Rueda, J., Fechter, K., Ferrin, I., Salcedo, J.M., Jakobsson, E., Trigueros, C., 2013. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *Bone marrow research* 2013, 203643.
- Driver, V.R., Hanft, J., Fylling, C.P., Beriou, J.M., Autogel Diabetic Foot Ulcer Study, G., 2006. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy/wound management* 52, 68-70, 72, 74 passim.
- Duan, C., 2002. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *The Journal of endocrinology* 175, 41-54.
- Dudas, M., Wysocki, A., Gelpi, B., Tuan, T.L., 2008. Memory encoded throughout our bodies: molecular and cellular basis of tissue regeneration. *Pediatr Res* 63, 502-512.
- Duffy, F.J., Jr., Seiler, J.G., Gelberman, R.H., Hergrueter, C.A., 1995. Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *The Journal of hand surgery* 20, 645-649.

- Ebrahimian, T.G., Pouzoulet, F., Squiban, C., Buard, V., Andre, M., Cousin, B., Gourmelon, P., Benderitter, M., Casteilla, L., Tamarat, R., 2009. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 503-510.
- Edelman, E.R., Mathiowitz, E., Langer, R., Klagsbrun, M., 1991. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 12, 619-626.
- Edlich, R.F., Spengler, M.D., Rodeheaver, G.T., 1983. Mammalian bites. *Compr Ther* 9, 41-47.
- Elsharawy, M.A., Naim, M., Greish, S., 2012. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 14, 288-293.
- Ema, H., Morita, Y., Suda, T., 2014. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental hematology* 42, 74-82 e72.
- Ema, H., Sudo, K., Seita, J., Matsubara, A., Morita, Y., Osawa, M., Takatsu, K., Takaki, S., Nakauchi, H., 2005. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Developmental cell* 8, 907-914.
- Eming, S.A., Krieg, T., Davidson, J.M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology* 127, 514-525.
- Enoch, S., Grey, J.E., Harding, K.G., 2006a. ABC of wound healing. Non-surgical and drug treatments. *Bmj* 332, 900-903.
- Enoch, S., Grey, J.E., Harding, K.G., 2006b. Recent advances and emerging treatments. *Bmj* 332, 962-965.
- Enoch, S., Leaper, D.J., 2007. Basic Science of Wound Healing. *Surgery* 26, 31-37.
- Eppley, B.L., Woodell, J.E., Higgins, J., 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 114, 1502-1508.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Everts, P.A., van Zundert, A., Schonberger, J.P., Devilee, R.J., Knape, J.T., 2008. What do we use: platelet-rich plasma or platelet-leukocyte gel? *Journal of biomedical materials research. Part A* 85, 1135-1136.
- Falanga, V., 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366, 1736-1743.
- Falanga, V., Iwamoto, S., Chartier, M., Yufit, T., Butmarc, J., Kouttab, N., Shrayar, D., Carson, P., 2007. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue engineering* 13, 1299-1312.
- Fathke, C., Wilson, L., Hutter, J., Kapoor, V., Smith, A., Hocking, A., Isik, F., 2004. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem cells* 22, 812-822.
- Feitosa, M.L., Fadel, L., Beltrao-Braga, P.C., Wenceslau, C.V., Kerkis, I., Kerkis, A., Birgel Junior, E.H., Martins, J.F., Martins Ddos, S., Miglino, M.A., Ambrosio, C.E., 2010. Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head: preliminary results. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 25, 416-422.

- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. *Schalms Veterinary Hematology*. Wiley-Blackwell.
- Fernández, A., 2012. Evaluación de la reparación tendinosa tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento en un modelo experimental de rotura del tendón de aquiles en oveja. *Medicina y cirugía animal*. Universidad de Córdoba, Córdoba (España).
- Ferrara, N., 2002. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Seminars in oncology* 29, 10-14.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 9, 669-676.
- Ferrari, M., Zia, S., Valbonesi, M., Henriquet, F., Venere, G., Spagnolo, S., Grasso, M.A., Panzani, I., 1987. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *The International journal of artificial organs* 10, 47-50.
- Finnie, A., 2002. Hydrocolloids in wound management: pros and cons. *Br J Community Nurs* 7, 338, 340, 342 passim.
- Finnson, K.W., Arany, P.R., Philip, A., 2013. Transforming Growth Factor Beta Signaling in Cutaneous Wound Healing: Lessons Learned from Animal Studies. *Advances in wound care* 2, 225-237.
- Floryan, K.M., Berghoff, W.J., 2004. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN journal* 80, 668-674, quiz 675-668.
- Folkman, J., Klagsbrun, M., 1987. Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- Formigli, L., Benvenuti, S., Mercatelli, R., Quercioli, F., Tani, A., Mirabella, C., Dama, A., Saccardi, R., Mazzanti, B., Cellai, I., Zecchi-Orlandini, S., 2012. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 6, 125-134.
- Fortier, L.A., 2005. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary surgery : VS* 34, 415-423.
- Fortier, L.A., Smith, R.K., 2008. Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 24, 191-201.
- Fortier, L.A., Travis, A.J., 2011. Stem cells in veterinary medicine. *Stem cell research & therapy* 2, 9.
- Foster, A.P., Foil, C.S., 2003. *BSVA Manual of small animal dermatology*.
- Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A., Ruadkow, I.A., 1974. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology* 2, 83-92.
- Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J., Burrell, M.A., 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 280, E827-847.
- Frykberg, R.G., Driver, V.R., Carman, D., Lucero, B., Borris-Hale, C., Fylling, C.P., Rappl, L.M., Clausen, P.A., 2010. Chronic wounds treated with a physiologically relevant concentration of platelet-rich plasma gel: a prospective case series. *Ostomy/wound management* 56, 36-44.

- Fu, X., Fang, L., Li, H., Li, X., Cheng, B., Sheng, Z., 2007. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 540-548.
- Fu, X., Fang, L., Li, X., Cheng, B., Sheng, Z., 2006. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 14, 325-335.
- Fu, Y., Deng, J., Jiang, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Yao, Y., Cheng, F., Chen, X., Xu, F., Huang, M., Yang, Y., Zhang, S., Yu, D., Zhao, R.C., Wei, Y., Deng, H., 2016. Rapid generation of functional hepatocyte-like cells from human adipose-derived stem cells. *Stem cell research & therapy* 7, 105.
- Fuchs, E., Segre, J.A., 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100, 143-155.
- Gaissmaier, C., Koh, J.L., Weise, K., 2008. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury* 39 Suppl 1, S88-96.
- Galiano, R.D., Tepper, O.M., Pelo, C.R., Bhatt, K.A., Callaghan, M., Bastidas, N., Bunting, S., Steinmetz, H.G., Gurtner, G.C., 2004. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *The American journal of pathology* 164, 1935-1947.
- Galindo, L.T., Filippo, T.R., Semedo, P., Ariza, C.B., Moreira, C.M., Camara, N.O., Porcionatto, M.A., 2011. Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. *Neurol Res Int* 2011, 564089.
- Gallin, J.I., 1989. Inflammation. In: Paul, W.E. (Ed.), *Fundamental immunology*. Raven Press, New York, USA, 721-733.
- Gao, W., Qiao, X., Ma, S., Cui, L., 2011. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Cell Mol Med* 15, 2575-2585.
- García, M., Coma, C., 2000. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Angiol Cir Vasc* 1, 8-12.
- García, M.M., Lozano, M.M., 2003. *Dermatología*.
- García-Olmo, D., García-Arranz, M., Herreros, D., Pascual, I., Peiro, C., Rodríguez-Montes, J.A., 2005. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 48, 1416-1423.
- Gartner, M.H., Benson, J.D., Caldwell, M.D., 1992. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *The Journal of surgical research* 52, 389-394.
- Gharbi, M., Deberg, M., Henrotin, Y., 2011. Application for proteomic techniques in studying osteoarthritis: a review. *Frontiers in physiology* 2, 90.
- Gilsanz, F., Escalante, F., Auray, C., Olbes, A.G., 2001. Treatment of leg ulcers in beta-thalassaemia intermedia: use of platelet-derived wound healing factors from the patient's own platelets. *British journal of haematology* 115, 710.
- Girdler, N.M., McGurk, M., Aqual, S., Prince, M., 1995. The effect of epidermal growth factor mouthwash on cytotoxic-induced oral ulceration. A phase I clinical trial. *American journal of clinical oncology* 18, 403-406.

- Gleizes, P.E., Munger, J.S., Nunes, I., Harpel, J.G., Mazziere, R., Noguera, I., Rifkin, D.B., 1997. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem cells* 15, 190-197.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., Dzau, V.J., 2008. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 103, 1204-1219.
- Gonda, K., Shigeura, T., Sato, T., Matsumoto, D., Suga, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Sato, K., Murase, S., Koshima, I., Yoshimura, K., 2008. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and reconstructive surgery* 121, 401-410.
- Goodsell, D.S., 2003. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem cells* 21, 118-119.
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G., Schweigerer, L., 1987. Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *Journal of cellular physiology. Supplement* 5, 15-26.
- Grageda, E., 2004. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant dentistry* 13, 301-309.
- Grageda, E., Lozada, J.L., Boyne, P.J., Caplanis, N., McMillan, P.J., 2005. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *The Journal of oral implantology* 31, 2-17.
- Grahnén, A., Kastrup, K., Heinrich, U., Gourmelen, M., Preece, M.A., Vaccarello, M.A., Guevara-Aguirre, J., Rosenfeld, R.G., Sietnieks, A., 1993. Pharmacokinetics of recombinant human insulin-like growth factor I given subcutaneously to healthy volunteers and to patients with growth hormone receptor deficiency. *Acta paediatrica* 82 Suppl 391, 9-13; discussion 14.
- Gratwohl, A., Baldomero, H., Horisberger, B., Schmid, C., Passweg, J., Urbano-Ispizua, A., 2002. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100, 2374-2386.
- Grazul-Bilska, A.T., Johnson, M.L., Bilski, J.J., Redmer, D.A., Reynolds, L.P., Abdullah, A., Abdullah, K.M., 2003. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs of today* 39, 787-800.
- Greenhalgh, D.G., Hummel, R.P., Albertson, S., Breeden, M.P., 1993. Synergistic actions of platelet-derived growth factor and the insulin-like growth factors in vivo. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 1, 69-81.
- Greenhalgh, D.G., Sprugel, K.H., Murray, M.J., Ross, R., 1990. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *The American journal of pathology* 136, 1235-1246.
- Greenwood, H.L., Singer, P.A., Downey, G.P., Martin, D.K., Thorsteinsdottir, H., Daar, A.S., 2006. Regenerative medicine and the developing world. *PLoS medicine* 3, e381.
- Grego, E., Robino, P., Tramuta, C., Giusto, G., Boi, M., Colombo, R., Serra, G., Chiado-Cutin, S., Gandini, M., Nebbia, P., 2016. Evaluation of antimicrobial activity of Italian honey for wound healing application in veterinary medicine. *Schweiz Arch Tierheilkd* 158, 521-527.
- Grey, J.E., Enoch, S., Harding, K.G., 2006. Wound assessment. *Bmj* 332, 285-288.
- Griffeth, R.J., Garcia-Parraga, D., Mellado-Lopez, M., Crespo-Picazo, J.L., Soriano-Navarro, M., Martinez-Romero, A., Moreno-Manzano, V., 2014. Platelet-rich plasma and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine-associated treatments in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *PloS one* 9, e108439.

- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C.C., Bernard, F.X., Peschanski, M., Baldeschi, C., Waksman, G., 2009. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745-1753.
- Guler, H.P., Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E.R., 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta endocrinologica* 121, 753-758.
- Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T., 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* 453, 314-321.
- Guyton, A.C., Hall, J., 2001. Hemostasia y coagulación sanguínea. In: Guyton, A.C., Hall, J. (Eds.), *Tratado de fisiología médica*. Interamericana McGraw-Hill, México, 509-522.
- Haghighat, A., Akhavan, A., Hashemi-Beni, B., Deihimi, P., Yadegari, A., Heidari, F., 2011. Adipose derived stem cells for treatment of mandibular bone defects: An autologous study in dogs. *Dent Res J (Isfahan)* 8, S51-57.
- Halim, A.S., Emami, A., Salahshourifar, I., Kannan, T.P., 2012. Keloid scarring: understanding the genetic basis, advances, and prospects. *Archives of plastic surgery* 39, 184-189.
- Hall, M.P., Band, P.A., Meislin, R.J., Jazrawi, L.M., Cardone, D.A., 2009. Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 17, 602-608.
- Hammond, J.W., Hinton, R.Y., Curl, L.A., Muriel, J.M., Lovering, R.M., 2009. Use of autologous platelet-rich plasma to treat muscle strain injuries. *The American journal of sports medicine* 37, 1135-1142.
- Hamou, C., Callaghan, M.J., Thangarajah, H., Chang, E., Chang, E.I., Grogan, R.H., Paterno, J., Vial, I.N., Jazayeri, L., Gurtner, G.C., 2009. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plastic and reconstructive surgery* 123, 455-555.
- Hanft, J.R., Pollak, R.A., Barbul, A., van Gils, C., Kwon, P.S., Gray, S.M., Lynch, C.J., Semba, C.P., Breen, T.J., 2008. Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *Journal of wound care* 17, 30-32, 34-37.
- Hanna, J.H., Saha, K., Jaenisch, R., 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508-525.
- Hanson, S.E., 2012. Mesenchymal Stem Cells: A Multimodality Option for Wound Healing. *Advances in wound care* 1, 153-158.
- Hanson, S.E., Gutowski, K.A., Hematti, P., 2010. Clinical applications of mesenchymal stem cells in soft tissue augmentation. *Aesthet Surg J* 30, 838-842.
- Harding, C.R., 2004. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1, 6-15.
- Hare, J.M., Chaparro, S.V., 2008. Cardiac regeneration and stem cell therapy. *Curr Opin Organ Transplant* 13, 536-542.
- Hargis, A.M., Ginn, P.M., 2012. The integument. In: Elsevier (Ed.), *Pathologic basis of veterinary disease*.
- Harrison, P., Cramer, E.M., 1993. Platelet alpha-granules. *Blood reviews* 7, 52-62.
- Hartwig, J., Italiano, J., Jr., 2003. The birth of the platelet. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1, 1580-1586.

- Hassan, W.U., Greiser, U., Wang, W., 2014. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 22, 313-325.
- Hebda, P.A., Klingbeil, C.K., Abraham, J.A., Fiddes, J.C., 1990. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. The Journal of investigative dermatology 95, 626-631.
- Heldin, C.H., Westermark, B., 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. Physiological reviews 79, 1283-1316.
- Herouy, Y., Mellios, P., Bandedmir, E., Stetter, C., Dichmann, S., Idzko, M., Hofmann, C., Vanscheidt, W., Schopf, E., Norgauer, J., 2000. Autologous platelet-derived wound healing factor promotes angiogenesis via alphavbeta3-integrin expression in chronic wounds. International journal of molecular medicine 6, 515-519.
- Hess, D.C., Borlongan, C.V., 2008. Cell-based therapy in ischemic stroke. Expert review of neurotherapeutics 8, 1193-1201.
- Hinz, B., 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. The Journal of investigative dermatology 127, 526-537.
- Holt, R.I., Sonksen, P.H., 2008. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. British journal of pharmacology 154, 542-556.
- Hom, D.B., Linzie, B.M., Huang, T.C., 2007. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. Archives of facial plastic surgery 9, 174-183.
- Hoosgood, G., 2003. Wound repair and specific tissue response to injury. In: Slater, D. (Ed.), Textbook of small animal surgery. Saunders, Philadelphia, USA, 66-86.
- Hori, Y., Gu, X., Xie, X., Kim, S.K., 2005. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. PLoS medicine 2, 103.
- Horn, T., 2012. [Wound dressings. Overview and classification]. Unfallchirurg 115, 774-782.
- Hosgood, G., 2003. Wound repair and specific tissue response to injury. In: Saunders, W. (Ed.), Textbook of small animal surgery. Slater., Philadelphia, 66-86.
- Hou, C., Shen, L., Huang, Q., Mi, J., Wu, Y., Yang, M., Zeng, W., Li, L., Chen, W., Zhu, C., 2013. The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the treatment of diabetic ischemic ulcer. Biomaterials 34, 112-120.
- Hsu, C., Chang, J., 2004. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. The Journal of hand surgery 29, 551-563.
- <http://secure.cdn.arthrex.com>, 2012.
- Hu, M., Ludlow, D., Alexander, J.S., McLarty, J., Lian, T., 2014. Improved wound healing of postischemic cutaneous flaps with the use of bone marrow-derived stem cells. The Laryngoscope 124, 642-648.
- Huang, C., Akaishi, S., Hyakusoku, H., Ogawa, R., 2014. Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder? A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings. International wound journal 11, 517-522.

- Huang, C., Murphy, G.F., Akaishi, S., Ogawa, R., 2013a. Keloids and hypertrophic scars: update and future directions. *Plastic and reconstructive surgery. Global open* 1, e25.
- Huang, J.S., Huang, S.S., Deuel, T.F., 1984. Specific covalent binding of platelet-derived growth factor to human plasma alpha 2-macroglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 342-346.
- Huang, S., Lu, G., Wu, Y., Jirigala, E., Xu, Y., Ma, K., Fu, X., 2012a. Mesenchymal stem cells delivered in a microsphere-based engineered skin contribute to cutaneous wound healing and sweat gland repair. *Journal of dermatological science* 66, 29-36.
- Huang, S.J., Fu, R.H., Shyu, W.C., Liu, S.P., Jong, G.P., Chiu, Y.W., Wu, H.S., Tsou, Y.A., Cheng, C.W., Lin, S.Z., 2013b. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell transplantation* 22, 701-709.
- Huang, S.P., Hsu, C.C., Chang, S.C., Wang, C.H., Deng, S.C., Dai, N.T., Chen, T.M., Chan, J.Y., Chen, S.G., Huang, S.M., 2012b. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Annals of plastic surgery* 69, 656-662.
- Huang, S.S., Huang, J.S., 2005. TGF-beta control of cell proliferation. *Journal of cellular biochemistry* 96, 447-462.
- Hughes, G.C., Biswas, S.S., Yin, B., Coleman, R.E., DeGrado, T.R., Landolfo, C.K., Lowe, J.E., Annex, B.H., Landolfo, K.P., 2004. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *The Annals of thoracic surgery* 77, 812-818.
- Hulth, A., Johnell, O., Miyazono, K., Lindberg, L., Heinegard, D., Heldin, C.H., 1996. Effect of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB on articular cartilage in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 14, 547-553.
- Hunt, G.B., 2012. Local or subdermal plexus flaps. In: Tobias, K.M., Johnson, S.A. (Eds.), *Veterinary surgery: small animal*. Elsevier-Saunders, St. Louis, Missouri, 1243-1255.
- Hunt, T.K., Williams, H., 1997. Cicatrización e infección de heridas. In: Interamericana (Ed.), *Clínicas quirúrgicas de Norteamérica*. 587-605.
- Iacopetti, I., Perazzi, A., Ferrari, A., Busetto, R., 2012. Application of platelet rich gel to enhance wound healing in horses: a case report. *J Equine Vet Sci* 32, 123-128.
- Insausti, C.L., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Majado, M.J., Castellanos, G., Moraleda, J.M., 2010. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histology and histopathology* 25, 91-98.
- Isakson, M., de Blacam, C., Whelan, D., Mc Ardle, A., Clover, A.J., 2015. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem cells international* 2015, 831095.
- Ishiguro, N., Yabe, Y., Shimizu, T., Iwata, H., Miura, T., 1994. Basic fibroblast growth factor has a beneficial effect on the viability of random skin flaps in rats. *Annals of plastic surgery* 32, 356-360.
- Itoh, M., Kiuru, M., Cairo, M.S., Christiano, A.M., 2011. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8797-8802.
- Jacinto, A., Martinez-Arias, A., Martin, P., 2001. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 3, E117-123.

- Jackson, W.M., Lozito, T.P., Djouad, F., Kuhn, N.Z., Nesti, L.J., Tuan, R.S., 2011. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 2377-2388.
- Jang, J.H., 2005. Stimulation of human hair growth by the recombinant human keratinocyte growth factor-2 (KGF-2). *Biotechnol Lett* 27, 749-752.
- Javazon, E.H., Keswani, S.G., Badillo, A.T., Crombleholme, T.M., Zoltick, P.W., Radu, A.P., Kozin, E.D., Beggs, K., Malik, A.A., Flake, A.W., 2007. Enhanced epithelial gap closure and increased angiogenesis in wounds of diabetic mice treated with adult murine bone marrow stromal progenitor cells. *Wound repair and regeneration* : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 15, 350-359.
- Jee, C.H., Eom, N.Y., Jang, H.M., Jung, H.W., Choi, E.S., Won, J.H., Hong, I.H., Kang, B.T., Jeong, D.W., Jung, D.I., 2016. Effect of autologous platelet-rich plasma application on cutaneous wound healing in dogs. *J Vet Sci* 17, 79-87.
- Jeffcoate, W.J., Price, P., Harding, K.G., International Working Group on Wound, H., Treatments for People with Diabetic Foot, U., 2004. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes/metabolism research and reviews* 20 Suppl 1, S78-89.
- Jones, B.A., Pei, M., 2012. Synovium-derived stem cells: a tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews* 18, 301-311.
- Jones, E.A., Crawford, A., English, A., Henshaw, K., Mundy, J., Corscadden, D., Chapman, T., Emery, P., Hatton, P., McGonagle, D., 2008. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis and rheumatism* 58, 1731-1740.
- Jones, V., Grey, J.E., Harding, K.G., 2006. Wound dressings. *Bmj* 332, 777-780.
- Kakudo, N., Minakata, T., Mitsui, T., Kushida, S., Notodihardjo, F.Z., Kusumoto, K., 2008. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plastic and reconstructive surgery* 122, 1352-1360.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press.
- Kang, B.J., Ryu, H.H., Park, S.S., Koyama, Y., Kikuchi, M., Woo, H.M., Kim, W.H., Kweon, O.K., 2012. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of veterinary science* 13, 299-310.
- Karayannopoulou, M., Papazoglou, L.G., Loukopoulos, P., Kazakos, G., Chantes, A., Giannakas, N., Savvas, I., Psalla, D., Kritsepi-Konstantinou, M., Dionysiou, D., 2014. Locally injected autologous platelet-rich plasma enhanced tissue perfusion and improved survival of long subdermal plexus skin flaps in dogs. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology* : V.C.O.T 27, 379-386.
- Karayannopoulou, M., Psalla, D., Kazakos, G., Loukopoulos, P., Giannakas, N., Savvas, I., Kritsepi-Konstantinou, M., Chantes, A., Papazoglou, L.G., 2015. Effect of locally injected autologous platelet-rich plasma on second intention wound healing of acute full-thickness skin defects in dogs. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology* : V.C.O.T 28, 172-178.
- Kawamoto, K., Matsuda, H., 2004. Nerve growth factor and wound healing. *Progress in brain research* 146, 369-384.
- Kawamura, M., Urist, M.R., 1988. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Developmental biology* 130, 435-442.

- Kawase, T., Okuda, K., Saito, Y., Yoshie, H., 2005. In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor-beta or platelet-derived growth factor. *Journal of periodontology* 76, 760-767.
- Kawasumi, A., Sagawa, N., Hayashi, S., Yokoyama, H., Tamura, K., 2013. Wound healing in mammals and amphibians: toward limb regeneration in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 367, 33-49.
- Ker-Woon, C., Abd Ghafar, N., Hui, C.K., Mohd Yusof, Y.A., Wan Ngah, W.Z., 2015. The effects of acacia honey on in vitro corneal abrasion wound healing model. *BMC cell biology* 16, 2.
- Kevy, S.V., Jacobson, M.S., 2004. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *The journal of extra-corporeal technology* 36, 28-35.
- Khan, A., Ashrafpour, H., Huang, N., Neligan, P.C., Kontos, C., Zhong, A., Forrest, C.R., Pang, C.Y., 2004. Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1219-1229.
- Kibblewhite, D.J., Bruce, A.G., Strong, D.M., Ott, S.M., Purchio, A.F., Larrabee, W.F., Jr., 1993. Transforming growth factor-beta accelerates osteoinduction in a craniofacial onlay model. *Growth factors* 9, 185-193.
- Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., Marini, F.C., 2009. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem cells* 27, 2614-2623.
- Kim, H., Choi, K., Kweon, O.K., Kim, W.H., 2012. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *Journal of dermatological science* 68, 149-156.
- Kim, J.H., Park, C., Park, H.M., 2009a. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Veterinary dermatology* 20, 123-126.
- Kim, J.W., Lee, J.H., Lyoo, Y.S., Jung, D.I., Park, H.M., 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary dermatology* 24, 242-e253.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N., 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.
- Kim, W.S., Park, B.S., Park, S.H., Kim, H.K., Sung, J.H., 2009b. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of dermatological science* 53, 96-102.
- Kim, W.S., Park, B.S., Sung, J.H., Yang, J.M., Park, S.B., Kwak, S.J., Park, J.S., 2007. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of dermatological science* 48, 15-24.
- Kim, Y.S., Lew, D.H., Tark, K.C., Rah, D.K., Hong, J.P., 2010. Effect of recombinant human epidermal growth factor against cutaneous scar formation in murine full-thickness wound healing. *Journal of Korean medical science* 25, 589-596.
- Kimura, A., Ogata, H., Yazawa, M., Watanabe, N., Mori, T., Nakajima, T., 2005. The effects of platelet-rich plasma on cutaneous incisional wound healing in rats. *Journal of dermatological science* 40, 205-208.
- Kiritsty, C.P., Lynch, A.B., Lynch, S.E., 1993. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 4, 729-760.

- Kitazawa, T., Kinoshita, S., Fujita, K., Araki, K., Watanabe, H., Ohashi, Y., Manabe, R., 1990. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Investigative ophthalmology & visual science* 31, 1773-1778.
- Klagsbrun, M., D'Amore, P.A., 1996. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 7, 259-270.
- Klein, M.B., Yalamanchi, N., Pham, H., Longaker, M.T., Chang, J., 2002. Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *The Journal of hand surgery* 27, 615-620.
- Knox, R.L., Hunt, A.R., Collins, J.C., DeSmet, M., Barnes, S., 2006. Platelet-rich plasma combined with skin substitute for chronic wound healing: a case report. *The journal of extra-corporeal technology* 38, 260-264.
- Koh, T.J., DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13, e23.
- Kolata, R.J., Kraut, N.H., Johnston, D.E., 1974. Patterns of trauma in urban dogs and cats: a study of 1,000 cases. *J Am Vet Med Assoc* 164, 499-502.
- Kolios, G., Moodley, Y., 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases* 85, 3-10.
- Komi-Kuramochi, A., Kawano, M., Oda, Y., Asada, M., Suzuki, M., Oki, J., Imamura, T., 2005. Expression of fibroblast growth factors and their receptors during full-thickness skin wound healing in young and aged mice. *The Journal of endocrinology* 186, 273-289.
- Kon, E., Filardo, G., Di Matteo, B., Marcacci, M., 2013. PRP for the treatment of cartilage pathology. *The open orthopaedics journal* 7, 120-128.
- Korbling, M., Estrov, Z., 2003. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England journal of medicine* 349, 570-582.
- Kothapalli, D., Frazier, K.S., Welply, A., Segarini, P.R., Grotendorst, G.R., 1997. Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ* 8, 61-68.
- Koveker, G.B., 2000. Growth factors in clinical practice. *International journal of clinical practice* 54, 590-593.
- Kozlik, M., Wojcicki, P., 2014. The use of stem cells in plastic and reconstructive surgery. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 23, 1011-1017.
- Kraft, J., Lynde, C., 2012. Giving burns the first, second and third degree: classification of burns. skincareguide.ca.
- Krampera, M., Pizzolo, G., Aprili, G., Franchini, M., 2006. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39, 678-683.
- Krasnodembskaya, A., Song, Y., Fang, X., Gupta, N., Serikov, V., Lee, J.W., Matthay, M.A., 2010. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem cells* 28, 2229-2238.
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S.J., 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.

- Kuroda, R., Usas, A., Kubo, S., Corsi, K., Peng, H., Rose, T., Cummins, J., Fu, F.H., Huard, J., 2006. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis and rheumatism* 54, 433-442.
- Kurtz, C.A., Loebig, T.G., Anderson, D.D., DeMeo, P.J., Campbell, P.G., 1999. Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *The American journal of sports medicine* 27, 363-369.
- Lacci, K.M., Dardik, A., 2010. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *The Yale journal of biology and medicine* 83, 1-9.
- Landesberg, R., Moses, M., Karpatkin, M., 1998. Risks of using platelet rich plasma gel. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 56, 1116-1117.
- Landesberg, R., Roy, M., Glickman, R.S., 2000. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 58, 297-300; discussion 300-291.
- Langford, K.S., Miell, J.P., 1993. The insulin-like growth factor-I/binding protein axis: physiology, pathophysiology and therapeutic manipulation. *European journal of clinical investigation* 23, 503-516.
- Lansdown, A.B., 2002. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 10, 271-285.
- Lariviere, B., Rouleau, M., Picard, S., Beaulieu, A.D., 2003. Human plasma fibronectin potentiates the mitogenic activity of platelet-derived growth factor and complements its wound healing effects. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 11, 79-89.
- Lavasani, M., Thompson, S.D., Pollett, J.B., Usas, A., Lu, A., Stolz, D.B., Clark, K.A., Sun, B., Peault, B., Huard, J., 2014. Human muscle-derived stem/progenitor cells promote functional murine peripheral nerve regeneration. *The Journal of clinical investigation* 124, 1745-1756.
- Lazarus, G.S., Cooper, D.M., Knighton, D.R., Percoraro, R.E., Rodeheaver, G., Robson, M.C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 2, 165-170.
- Le, M., Naridze, R., Morrison, J., Biggs, L.C., Rhea, L., Schutte, B.C., Kaartinen, V., Dunnwald, M., 2012. Transforming growth factor Beta 3 is required for excisional wound repair in vivo. *PLoS one* 7, e48040.
- Leahy, P.J., Lawrence, W.T., 2007. Biologic enhancement of wound healing. *Clinics in plastic surgery* 34, 659-671.
- Lechner, A., Habener, J.F., 2003. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E259-266.
- Lee, H.W., Reddy, M.S., Geurs, N., Palcanis, K.G., Lemons, J.E., Rahemtulla, F.G., Ho, K.J., Chen, D.T., Davis, C.R., Feldman, D.S., 2008. Efficacy of platelet-rich plasma on wound healing in rabbits. *Journal of periodontology* 79, 691-696.
- Lee, J.H., Bae, I.H., Choi, J.K., Park, J.W., 2013. Evaluation of a highly skin permeable low-molecular-weight protamine conjugated epidermal growth factor for novel burn wound healing therapy. *Journal of pharmaceutical sciences* 102, 4109-4120.

- Lee, R.H., Pulin, A.A., Seo, M.J., Kota, D.J., Ylostalo, J., Larson, B.L., Semprun-Prieto, L., Delafontaine, P., Prockop, D.J., 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5, 54.
- Lee, R.H., Seo, M.J., Reger, R.L., Spees, J.L., Pulin, A.A., Olson, S.D., Prockop, D.J., 2006. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 17438-17443.
- Lerman, D.A., Alotti, N., Ume, K.L., Peault, B., 2016. Cardiac Repair and Regeneration: The Value of Cell Therapies. *Eur Cardiol* 11, 43-48.
- Letson, A.K., Dahners, L.E., 1994. The effect of combinations of growth factors on ligament healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 207-212.
- Li, D.R., Cai, J.H., 2012. Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chinese medical journal* 125, 4504-4510.
- Li, J., Chen, J., Kirsner, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 25, 9-18.
- Li, W., Enomoto, M., Ukegawa, M., Hirai, T., Sotome, S., Wakabayashi, Y., Shinomiya, K., Okawa, A., 2012. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plastic and reconstructive surgery* 129, 858-866.
- Li, Z.H., Liao, W., Cui, X.L., Zhao, Q., Liu, M., Chen, Y.H., Liu, T.S., Liu, N.L., Wang, F., Yi, Y., Shao, N.S., 2011. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *International journal of medical sciences* 8, 74-83.
- Lian, Z., Yin, X., Li, H., Jia, L., He, X., Yan, Y., Liu, N., Wan, K., Li, X., Lin, S., 2014. Synergistic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma in streptozotocin-induced diabetic rats. *Annals of dermatology* 26, 1-10.
- Lind, M., 1996. Growth factors: possible new clinical tools. A review. *Acta orthopaedica Scandinavica* 67, 407-417.
- Lind, M., Schumacker, B., Soballe, K., Keller, J., Melsen, F., Bunger, C., 1993. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta orthopaedica Scandinavica* 64, 553-556.
- Lisiany, M.I., 2013. [Mesenchymal stem cells and their immunological properties]. *Fiziologichnyi zhurnal* 59, 126-134.
- Liu, C., Liu, Y., Xu, X.X., Guo, X., Sun, G.W., Ma, X.J., 2016. Mesenchymal stem cells enhance the metastasis of 3D-cultured hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 16, 566.
- Liu, P., Deng, Z., Han, S., Liu, T., Wen, N., Lu, W., Geng, X., Huang, S., Jin, Y., 2008. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs* 32, 925-931.
- Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Molina-Minano, F., Vicente-Ortega, V., 2009. Effects of plasma rich in growth factors on wound healing of the tongue. Experimental study on rabbits. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 14, e425-428.
- Lovell, J.E., Getty, R., 1957. The hair follicle, epidermis, dermis, and skin glands of the dog. *Am J Vet Res* 18, 873-885.
- Lowry, B.P., Bradfield, J.F., Carroll, R.G., Brewer, K., Meggs, W.J., 2001. A controlled trial of topical nitroglycerin in a New Zealand white rabbit model of brown recluse spider envenomation. *Annals of emergency medicine* 37, 161-165.

- Luo, G., Cheng, W., He, W., Wang, X., Tan, J., Fitzgerald, M., Li, X., Wu, J., 2010. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 18, 506-513.
- Lynch, S.E., Colvin, R.B., Antoniades, H.N., 1989. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *The Journal of clinical investigation* 84, 640-646.
- Lynch, S.E., Nixon, J.C., Colvin, R.B., Antoniades, H.N., 1987. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7696-7700.
- Ma, B., Cheng, D.S., Xia, Z.F., Ben, D.F., Lu, W., Cao, Z.F., Wang, Q., He, J., Chai, J.K., Shen, C.A., Sun, Y.H., Zhang, G.A., Hu, X.H., 2007. Randomized, multicenter, double-blind, and placebo-controlled trial using topical recombinant human acidic fibroblast growth factor for deep partial-thickness burns and skin graft donor site. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 795-799.
- Ma, D., Mao, T., 2012. [Cell-based approaches to promote bone regeneration in distraction osteogenesis]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiu fu chongjian waikē zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery* 26, 1512-1515.
- Madonna, R., Cevik, C., Nasser, M., De Caterina, R., 2012. Hepatocyte growth factor: molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration. *Thrombosis and haemostasis* 107, 656-661.
- Magaña García, M., Magaña Lozano, M., 2011. Anatomía, embriología, histología y fisiología de la piel. In: Magaña García, M., Magaña Lozano, M. (Eds.), *Dermatología*. Editorial médica panamericana, México, 3-18.
- Maharlooeei, M.K., Bagheri, M., Solhjoui, Z., Jahromi, B.M., Akrami, M., Rohani, L., Monabati, A., Noorafshan, A., Omrani, G.R., 2011. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice* 93, 228-234.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoude, G.A., Barrandon, Y., 2008. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 456, 250-254.
- Male, D.K., Champion, B., A., C., 1991. *Cell traffic and inflammation*. Advance immunology. Gower London, New York, USA, 75-90.
- Man, D., Plosker, H., Winland-Brown, J.E., 2001. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plastic and reconstructive surgery* 107, 229-237; discussion 238-229.
- Mandracchia, V.J., Sanders, S.M., Frerichs, J.A., 2001. The use of becaplermin (rhPDGF-BB) gel for chronic nonhealing ulcers. A retrospective analysis. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 18, 189-209, viii.
- Mansilla, E., Marin, G.H., Sturla, F., Drago, H.E., Gil, M.A., Salas, E., Gardiner, M.C., Piccinelli, G., Bossi, S., Salas, E., Petrelli, L., Iorio, G., Ramos, C.A., Soratti, C., 2005. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplantation proceedings* 37, 292-294.
- Maquart, F.X., Monboisse, J.C., 2014. Extracellular matrix and wound healing. *Pathol Biol (Paris)* 62, 91-95.
- Margolis, D.J., Kantor, J., Santanna, J., Strom, B.L., Berlin, J.A., 2001. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes care* 24, 483-488.

- Markova, A., Mostow, E.N., 2012. US skin disease assessment: ulcer and wound care. *Dermatologic clinics* 30, 107-111, ix.
- Marlovits, S., Mousavi, M., Gabler, C., Erdos, J., Vecsei, V., 2004. A new simplified technique for producing platelet-rich plasma: a short technical note. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 13 Suppl 1, S102-106.
- Marone, M., De Ritis, D., Bonanno, G., Mozzetti, S., Rutella, S., Scambia, G., Pierelli, L., 2002. Cell cycle regulation in human hematopoietic stem cells: from isolation to activation. *Leukemia & lymphoma* 43, 493-501.
- Marston, W.A., Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study, G., 2006. Risk factors associated with healing chronic diabetic foot ulcers: the importance of hyperglycemia. *Ostomy/wound management* 52, 26-28, 30, 32 passim.
- Martin, P., 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Mollo, A., Sampaolesi, M., Mascarello, F., Decaminada, M., Patruno, M., 2011. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in veterinary science* 91, 18-24.
- Martinez-Zapata, M.J., Marti-Carvajal, A., Sola, I., Bolibar, I., Angel Exposito, J., Rodriguez, L., Garcia, J., 2009. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 49, 44-56.
- Marx, R., Garg, A., 2005. The biology of platelets and the mechanism of platelet rich plasma. In: Marx, R., Garg, A. (Eds.), *Dental and craniofacial applications of prp*. Quintessence Publishing Co, Chicago, USA, 3-65.
- Marx, R.E., 2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry* 10, 225-228.
- Marx, R.E., 2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 62, 489-496.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R., 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 85, 638-646.
- Matsumoto, K., Nakamura, T., 1997. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochemical and biophysical research communications* 239, 639-644.
- Maxson, S., Lopez, E.A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Leroux, M.A., 2012. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem cells translational medicine* 1, 142-149.
- Mazzucco, L., Balbo, V., Cattana, E., Borzini, P., 2008. Platelet-rich plasma and platelet gel preparation using Plateltex. *Vox sanguinis* 94, 202-208.
- Mazzucco, L., Medici, D., Serra, M., Panizza, R., Rivara, G., Orecchia, S., Libener, R., Cattana, E., Levis, A., Betta, P.G., Borzini, P., 2004. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 44, 1013-1018.
- McAleer, J.P., Sharma, S., Kaplan, E.M., Persich, G., 2006. Use of autologous platelet concentrate in a nonhealing lower extremity wound. *Advances in skin & wound care* 19, 354-363.

- McArdle, A., Chung, M.T., Paik, K.J., Duldulao, C., Chan, C., Rennert, R., Walmsley, G.G., Senarath-Yapa, K., Hu, M., Seo, E., Lee, M., Wan, D.C., Longaker, M.T., 2014. Positive selection for bone morphogenetic protein receptor type-IB promotes differentiation and specification of human adipose-derived stromal cells toward an osteogenic lineage. *Tissue Eng Part A* 20, 3031-3040.
- McCollum, P.T., Bush, J.A., James, G., Mason, T., O'Kane, S., McCollum, C., Krievins, D., Shiralkar, S., Ferguson, M.W., 2011. Randomized phase II clinical trial of avotermin versus placebo for scar improvement. *The British journal of surgery* 98, 925-934.
- McLaughlin, M.M., Marra, K.G., 2013. The use of adipose-derived stem cells as sheets for wound healing. *Organogenesis* 9, 79-81.
- Medeiros Vde, F., Azevedo, I.M., Rego, A.C., Egito, E.S., Araujo-Filho, I., Medeiros, A.C., 2016. Antibacterial properties and healing effects of *Melipona scutellaris* honey in MRSA-infected wounds of rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 31, 327-332.
- Mehta, S., Watson, J.T., 2008. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *Journal of orthopaedic trauma* 22, 432-438.
- Mei, S.H., Haitzma, J.J., Dos Santos, C.C., Deng, Y., Lai, P.F., Slutsky, A.S., Liles, W.C., Stewart, D.J., 2010. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182, 1047-1057.
- Menetrey, J., Kasemkijwattana, C., Day, C.S., Bosch, P., Vogt, M., Fu, F.H., Moreland, M.S., Huard, J., 2000. Growth factors improve muscle healing in vivo. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 82, 131-137.
- Meruane, M., Rojas, M., 2012. Desarrollo de la piel y sus anexos en vertebrados. *International journal of morphology* 30, 1422-1433.
- Metcalf, D., 1985. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell* 43, 5-6.
- Mignatti, P., Rifkin, D.B., 1991. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *Journal of cellular biochemistry* 47, 201-207.
- Milenkovic, I., Weick, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2003. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 1211-1220.
- Miller, M.C., Nanchahal, J., 2005. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 19, 363-381.
- Mingo, C., Pombo, M., Larrabe, L., 2007. Plasma rico en plaquetas en cirugía ortopédica y traumatológica. *Artroscop* 14, 145-151.
- Mishra, A., Pavelko, T., 2006. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *The American journal of sports medicine* 34, 1774-1778.
- Mizuno, H., 2009. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* 76, 56-66.
- Mizuno, H., Tobita, M., Uysal, A.C., 2012. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 30, 804-810.

- Mohan, S., Baylink, D.J., 1991. Bone growth factors. *Clinical orthopaedics and related research*, 30-48.
- Molina-Minano, F., Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Vicente-Ortega, V., 2009a. Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits. *Brazilian oral research* 23, 275-280.
- Molina-Minano, F., Lopez-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Vicente-Ortega, V., 2009b. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *International wound journal* 6, 145-148.
- Molloy, T., Wang, Y., Murrell, G., 2003. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports medicine* 33, 381-394.
- Monteiro, S.O., Lepage, O.M., Theoret, C.L., 2009. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. *Am J Vet Res* 70, 277-282.
- Morrison, S.J., Spradling, A.C., 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132, 598-611.
- Mortier, L., Delesalle, F., Formstecher, P., Polakowska, R., 2010. Human umbilical cord blood cells form epidermis in the skin equivalent model. *Experimental dermatology* 19, 929-930.
- Muller-Sieburg, C.E., Sieburg, H.B., Bernitz, J.M., Cattarossi, G., 2012. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* 119, 3900-3907.
- Murphy, P.S., Evans, G.R., 2012. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plastic surgery international* 2012, 190436.
- Murray, M.M., Spindler, K.P., Devin, C., Snyder, B.S., Muller, J., Takahashi, M., Ballard, P., Nanney, L.B., Zurakowski, D., 2006. Use of a collagen-platelet rich plasma scaffold to stimulate healing of a central defect in the canine ACL. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 24, 820-830.
- Mustoe, T.A., O'Shaughnessy, K., Kloeters, O., 2006. Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 35S-41S.
- Nakagawa, H., Akita, S., Fukui, M., Fujii, T., Akino, K., 2005. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol* 153, 29-36.
- Nambu, M., Ishihara, M., Nakamura, S., Mizuno, H., Yanagibayashi, S., Kanatani, Y., Hattori, H., Takase, B., Ishizuka, T., Kishimoto, S., Amano, Y., Yamamoto, N., Azuma, R., Kiyosawa, T., 2007. Enhanced healing of mitomycin C-treated wounds in rats using inbred adipose tissue-derived stromal cells within an atelocollagen matrix. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 505-510.
- Nambu, M., Kishimoto, S., Nakamura, S., Mizuno, H., Yanagibayashi, S., Yamamoto, N., Azuma, R., Nakamura, S., Kiyosawa, T., Ishihara, M., Kanatani, Y., 2009. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Annals of plastic surgery* 62, 317-321.
- Nash, T.J., Howlett, C.R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K.A., Hicklin, D.J., 1994. Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15, 203-208.
- Nauta, A.J., Fibbe, W.E., 2007. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.

- Nemes, Z., Steinert, P.M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31, 5-19.
- Nico, B., Mangieri, D., Benagiano, V., Crivellato, E., Ribatti, D., 2008. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvascular research* 75, 135-141.
- Nicolay, N.H., Lopez Perez, R., Debus, J., Huber, P.E., 2015. Mesenchymal stem cells - A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer letters* 366, 133-140.
- Nie, C., Yang, D., Xu, J., Si, Z., Jin, X., Zhang, J., 2011. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell transplantation* 20, 205-216.
- Nimni, M.E., 1997. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 18, 1201-1225.
- Niu, J., Chang, Z., Peng, B., Xia, Q., Lu, W., Huang, P., Tsao, M.S., Chiao, P.J., 2007. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 282, 6001-6011.
- Noli, C.H., Ghibaud, G., 2010. *Dermatología clínica y microscópica del perro y el gato*. Elsevier España.
- O'Brien, J.A., Rizzieri, D.A., 2013. Leukemic stem cells: a review. *Cancer investigation* 31, 215-220.
- Oh, H.J., Park, E.J., Lee, S.Y., Soh, J.W., Kong, I.S., Choi, S.W., Ra, J.C., Kang, S.K., Lee, B.C., 2012. Comparison of cell proliferation and epigenetic modification of gene expression patterns in canine foetal fibroblasts and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell proliferation* 45, 438-444.
- Okuda, K., Kawase, T., Momose, M., Murata, M., Saito, Y., Suzuki, H., Wolff, L.F., Yoshie, H., 2003. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of periodontology* 74, 849-857.
- Oldooz, A., Kumar, N., Amirali, R., 2013. Therapeutic effects of human epidermal growth factor. *Res J Biotechnol* 9, 77-80.
- Olsen, S.K., Garbi, M., Zampieri, N., Eliseenkova, A.V., Ornitz, D.M., Goldfarb, M., Mohammadi, M., 2003. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. *The Journal of biological chemistry* 278, 34226-34236.
- Ostvar, O., Shadvar, S., Yahaghi, E., Azma, K., Fayyaz, A.F., Ahmadi, K., Nowrouzian, I., 2015. Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. *Diagnostic pathology* 10, 85.
- Ouyang, X.Y., Qiao, J., 2006. Effect of platelet-rich plasma in the treatment of periodontal intrabony defects in humans. *Chinese medical journal* 119, 1511-1521.
- Papanas, N., Maltezos, E., 2007. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers: new technologies, any promises? *The international journal of lower extremity wounds* 6, 37-53.
- Park, B.S., Jang, K.A., Sung, J.H., Park, J.S., Kwon, Y.H., Kim, K.J., Kim, W.S., 2008. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatol Surg* 34, 1323-1326.
- Park, H.J., Lee, S., Kang, K.H., Heo, C.Y., Kim, J.H., Yang, H.S., Kim, B.S., 2013. Enhanced random skin flap survival by sustained delivery of fibroblast growth factor 2 in rats. *ANZ J Surg* 83, 354-358.

- Parnham, A., 2002. Moist wound healing: does the theory apply to chronic wounds? *Journal of wound care* 11, 143-146.
- Pavletic M, M., 2003. Skin and adnexa. In: Slater, D. (Ed.), *Textbook of small animal surgery*. Saunders, Philadelphia, USA, 250-259.
- Pavletic M, M., 2010a. Basic principles of wound healing. In: Michael M, P. (Ed.), *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*. W.B Saunders Company, Iowa, USA, 17-28.
- Pavletic M, M., 2010b. Basic principles of wound management. In: Michael M, P. (Ed.), *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*. W.B Saunders Company, Iowa, USA, 31-49.
- Pavletic M, M., 2010c. The skin. In: Michael M, P. (Ed.), *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*. W.B Saunders Company Iowa, USA, 4-15.
- Pelizzo, G., Avanzini, M.A., Icaro Cornaglia, A., Osti, M., Romano, P., Avolio, L., Maccario, R., Dominici, M., De Silvestri, A., Andreatta, E., Costanzo, F., Mantelli, M., Ingo, D., Piccinno, S., Calcaterra, V., 2015. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. *Journal of translational medicine* 13, 219.
- Peng, H., Huard, J., 2003. Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Current opinion in pharmacology* 3, 329-333.
- Peng, J., Wen, C., Wang, A., Wang, Y., Xu, W., Zhao, B., Zhang, L., Lu, S., Qin, L., Guo, Q., Dong, L., Tian, J., 2011. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 96, 316-325.
- Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., Zhou, C., 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem cells and development* 17, 761-773.
- Penn, J.W., Grobbelaar, A.O., Rolfe, K.J., 2012. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *International journal of burns and trauma* 2, 18-28.
- Philippou, A., Maridaki, M., Halapas, A., Koutsilieris, M., 2007. The role of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In vivo* 21, 45-54.
- Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Altmann, B.W., Deuel, T.F., Thomason, A., 1991. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of cellular biochemistry* 45, 319-326.
- Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Tseng, J., Bready, J., Chang, D., Kenney, W.C., Rudolph, R., Robson, M.C., Vande Berg, J., Reid, P., et al., 1995. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *The Journal of clinical investigation* 96, 1336-1350.
- Pierce, G.F., Yanagihara, D., Klopchin, K., Danilenko, D.M., Hsu, E., Kenney, W.C., Morris, C.F., 1994. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *The Journal of experimental medicine* 179, 831-840.
- Pietrzak, W.S., Eppley, B.L., 2005. Platelet rich plasma: biology and new technology. *The Journal of craniofacial surgery* 16, 1043-1054.

- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Posnett, J., Gottrup, F., Lundgren, H., Saal, G., 2009. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. *Journal of wound care* 18, 154-161.
- Prosper, F., Gavira, J.J., Herreros, J., Rabago, G., Luquin, R., Moreno, J., Robles, J.E., Redondo, P., 2006. [Cell transplant and regenerative therapy with stem cells]. *An Sist Sanit Navar* 29 Suppl 2, 219-234.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., Andre, M., Penicaud, L., Casteilla, L., 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Experimental cell research* 312, 727-736.
- Pufe, T., Petersen, W., Tillmann, B., Mentlein, R., 2001. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 439, 579-585.
- Putnins, E.E., Firth, J.D., Uitto, V.J., 1995. Keratinocyte growth factor stimulation of gelatinase (matrix metalloproteinase-9) and plasminogen activator in histiotypic epithelial cell culture. *The Journal of investigative dermatology* 104, 989-994.
- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., Huard, J., 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *The Journal of cell biology* 157, 851-864.
- Rafii, S., Lyden, D., 2003. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine* 9, 702-712.
- Raja, Sivamani, K., Garcia, M.S., Isseroff, R.R., 2007. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front Biosci* 12, 2849-2868.
- Rajkumar, V.S., Shiwen, X., Bostrom, M., Leoni, P., Muddle, J., Ivarsson, M., Gerdin, B., Denton, C.P., Bou-Gharios, G., Black, C.M., Abraham, D.J., 2006. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *The American journal of pathology* 169, 2254-2265.
- Rao, M., Ahrlund-Richter, L., Kaufman, D.S., 2012. Concise review: Cord blood banking, transplantation and induced pluripotent stem cell: success and opportunities. *Stem cells* 30, 55-60.
- Rao, M.S., Mattson, M.P., 2001. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mechanisms of ageing and development* 122, 713-734.
- Rasulov, M.F., Vasilchenkov, A.V., Onishchenko, N.A., Krashennnikov, M.E., Kravchenko, V.I., Gorshenin, T.L., Pidtsan, R.E., Potapov, I.V., 2005. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. *Bull Exp Biol Med* 139, 141-144.
- Ratajczak, M.Z., Kucia, M., Jadczyk, T., Greco, N.J., Wojakowski, W., Tendra, M., Ratajczak, J., 2012. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia* 26, 1166-1173.
- Reckhenrich, A.K., Kirsch, B.M., Wahl, E.A., Schenck, T.L., Rezaeian, F., Harder, Y., Foehr, P., Machens, H.G., Egana, J.T., 2014. Surgical sutures filled with adipose-derived stem cells promote wound healing. *PLoS one* 9, e91169.
- Reed, G.L., 2007. Platelet secretion. In: Michelson, A.D. (Ed.), *Platelets*. Elsevier Science, San Diego, 309-318.

- Reed, G.L., Fitzgerald, M.L., Polgar, J., 2000. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secretory" life of thrombocytes. *Blood* 96, 3334-3342.
- Reiber, G.E., Raugi, G.J., 2005. Preventing foot ulcers and amputations in diabetes. *Lancet* 366, 1676-1677.
- Reich, C.M., Raabe, O., Wenisch, S., Bridger, P.S., Kramer, M., Arnhold, S., 2012. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. *Veterinary research communications* 36, 139-148.
- Reigstad, L.J., Varhaug, J.E., Lillehaug, J.R., 2005. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *The FEBS journal* 272, 5723-5741.
- Reinke, J.M., Sorg, H., 2012. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49, 35-43.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., Shi, Y., 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* 2, 141-150.
- Rendu, F., B., B.-B., 2001. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets* 12, 261-273.
- Ribault, D., Khatib, A.M., Panasyuk, A., Barbara, A., Bouizar, Z., Mitrovic, R.D., 1997. Mitogenic and metabolic actions of epidermal growth factor on rat articular chondrocytes: modulation by fetal calf serum, transforming growth factor-beta, and tyrphostin. *Archives of biochemistry and biophysics* 337, 149-158.
- Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Termine, J.D., Sporn, M.B., Roberts, A.B., 1987. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *The Journal of cell biology* 105, 457-463.
- Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, A., Altrock, B.W., Pence, P.C., Hegggers, J.P., Johnston, A.F., McHugh, T.P., Anthony, M.S., Robson, L.E., et al., 1992a. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Annals of plastic surgery* 29, 193-201.
- Robson, M.C., Phillips, L.G., Thomason, A., Robson, L.E., Pierce, G.F., 1992b. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 339, 23-25.
- Robson, M.C., Steed, D.L., Franz, M.G., 2001. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 38, 72-140.
- Rodriguez Diez, R., 2015. El factor de crecimiento de tejido conectivo: Modulador redox y citoquina proinflamatoria implicada en la génesis del daño vascular. Departamento de bioquímica. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Rodriguez-Jimenez, F.J., Valdes-Sanchez, T., Carrillo, J.M., Rubio, M., Monleon-Prades, M., Garcia-Cruz, D.M., Garcia, M., Cugat, R., Moreno-Manzano, V., 2012. Platelet-rich plasma favors proliferation of canine adipose-derived mesenchymal stem cells in methacrylate-endcapped caprolactone porous scaffold niches. *J Funct Biomater* 3, 556-568.
- Roit, I.M., Brostoff, J., Male, D.K., 1992. *Inmunología*. Salvat, Barcelona, España, 75-90.
- Roth, D., Piekarek, M., Paulsson, M., Christ, H., Bloch, W., Krieg, T., Davidson, J.M., Eming, S.A., 2006. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *The American journal of pathology* 168, 670-684.

- Roubelakis, M.G., Trohatou, O., Roubelakis, A., Mili, E., Kalaitzopoulos, I., Papazoglou, G., Pappa, K.I., Anagnou, N.P., 2014. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem cell reviews* 10, 417-428.
- Rubio, M., Carrillo, J.M., Mazo, R., 2009. Heridas cutáneas. Fisiopatología y consideraciones relevantes. In: Sopena, J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 61-80.
- Rustad, K.C., Gurtner, G.C., 2012. Mesenchymal Stem Cells Home to Sites of Injury and Inflammation. *Advances in wound care* 1, 147-152.
- Rustad, K.C., Wong, V.W., Sorkin, M., Glotzbach, J.P., Major, M.R., Rajadas, J., Longaker, M.T., Gurtner, G.C., 2012. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials* 33, 80-90.
- Saaristo, A., Tammela, T., Farkkila, A., Karkkainen, M., Suominen, E., Yla-Herttuala, S., Alitalo, K., 2006. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. *The American journal of pathology* 169, 1080-1087.
- Saldalamacchia, G., Lapice, E., Cuomo, V., De Feo, E., D'Agostino, E., Rivellese, A.A., Vaccaro, O., 2004. A controlled study of the use of autologous platelet gel for the treatment of diabetic foot ulcers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14, 395-396.
- Salemi, S., Rinaldi, C., Manna, F., Guarneri, G.F., Parodi, P.C., 2008. Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 61, 1565-1567.
- Salgado, A.J., Reis, R.L., Sousa, N.J., Gimble, J.M., 2010. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy* 5, 103-110.
- Sampson, S., Gerhardt, M., Mandelbaum, B., 2008. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Current reviews in musculoskeletal medicine* 1, 165-174.
- Sanchez, M., Anitua, E., Orive, G., Mujika, I., Andia, I., 2009. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports medicine* 39, 345-354.
- Sanchez-Lopez, E., Rodrigues Diez, R., Rodriguez Vita, J., Rayego Mateos, S., Rodrigues Diez, R.R., Rodriguez Garcia, E., Lavoz Barria, C., Mezzano, S., Egido, J., Ortiz, A., Ruiz-Ortega, M., Selgas, R., 2009. [Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia* 29, 382-391.
- Sandoval, J.A., Lopez, C., Carmona, J.U., 2013. Therapies intended for joint regeneration in the horses. *Atch Med Vet* 45, 229-236.
- Sardari, K., Reza, M., Kazemi, H., 2011. Effects of platelet rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration and wound healing in dogs treated with dexamethasone. *Comp Clin Pathol* 20, 155-162.
- Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., Shimizu, H., 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180, 2581-2587.
- Scher, C.D., Shepard, R.C., Antoniades, H.N., Stiles, C.D., 1979. Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. *Biochimica et biophysica acta* 560, 217-241.

- Schipper, B.M., Marra, K.G., Zhang, W., Donnenberg, A.D., Rubin, J.P., 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery* 60, 538-544.
- Schneider, R.K., Puellen, A., Kramann, R., Raupach, K., Bornemann, J., Knuechel, R., Perez-Bouza, A., Neuss, S., 2010. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* 31, 467-480.
- Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Landthaler, M., Babilas, P., 2010. Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63, 866-881.
- Schwarz, C., Leicht, U., Drosse, I., Ulrich, V., Luibl, V., Schieker, M., Rocken, M., 2011. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. *Veterinary research communications* 35, 487-499.
- Scott, D., Miller, W., Griffin, C., 2001. *Muller and Kirk's Small animal dermatology*. Philadelphia.
- Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W., 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376, 1094-1108.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E., Martin, G.R., 1982. Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *The Journal of cell biology* 92, 584-588.
- Serra, C.I., 2006. Análisis Biomecánico e Histológico del Tejido de Reparación en defectos Condrales de Espesor Completo tras la aplicación de PRP autólogo. Estudio Experimental. *Medicina y cirugía animal*. Ceu Cardenal Herrera, Valwncia.
- Serra, C.I., Soler, C., Carrillo, J.M., Sopena, J.J., Redondo, J.I., Cugat, R., 2013. Effect of autologous platelet-rich plasma on the repair of full-thickness articular defects in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 21, 1730-1736.
- Seyer, J., Ragho, R., 1992. Hepatic fibrosis. In: Cohen, I. (Ed.), *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. Saunders, Philadelphia, USA, 416.
- Shah, M., Foreman, D.M., Ferguson, M.W., 1994. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *Journal of cell science* 107 (Pt 5), 1137-1157.
- Shah, M., Foreman, D.M., Ferguson, M.W., 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of cell science* 108 (Pt 3), 985-1002.
- Sharpless, N.E., DePinho, R.A., 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 703-713.
- Shavliakadze, T., Winn, N., Rosenthal, N., Grounds, M.D., 2005. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 15, 4-18.
- Shi, H.X., Lin, C., Lin, B.B., Wang, Z.G., Zhang, H.Y., Wu, F.Z., Cheng, Y., Xiang, L.J., Guo, D.J., Luo, X., Zhang, G.Y., Fu, X.B., Bellusci, S., Li, X.K., Xiao, J., 2013. The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PloS one* 8, e59966.
- Singer, A.J., Clark, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine* 341, 738-746.

- Sink, C.A., Feldman, B.F., 2009. Urianálisis y hematología de laboratorio. In: s.l, G.A.B. (Ed.), Zaragoza, 35-60.
- So, K., McGrouther, D.A., Bush, J.A., Durani, P., Taylor, L., Skotny, G., Mason, T., Metcalfe, A., O'Kane, S., Ferguson, M.W., 2011. Avotermin for scar improvement following scar revision surgery: a randomized, double-blind, within-patient, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Plastic and reconstructive surgery* 128, 163-172.
- Soler, C., 2006. Análisis macroscópico, histológico e inmunohistoquímico del efecto de plasma rico en plaquetas autólogo en la reparación de defectos condrales en el conejo. Estudio experimental. *Medicina y cirugía animal*. CEU Universidad Cardenal Herrera, Valencia, 234.
- Sopena, J.J., Amat, A., Ortiz, M.L., 2009a. Manejo general de las heridas cutáneas. In: Sopena, J.J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 103-143.
- Sopena, J.J., Rubio, M., Carrillo, J.M., 2009b. Curas y apósitos en el tratamiento de heridas. In: Sopena, J.J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 83-100.
- Sorg, H., Krueger, C., Vollmar, B., 2007. Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat* 211, 810-818.
- Southwood, L.L., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Mcllwraith, C.W., 2004. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Veterinary surgery* : VS 33, 565-578.
- Steed, D.L., 1995. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer Study Group. *Journal of vascular surgery* 21, 71-78; discussion 79-81.
- Steed, D.L., 1998. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. *Clinics in plastic surgery* 25, 397-405.
- Steed, D.L., 2006. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plastic and reconstructive surgery* 117, 143S-149S; discussion 150S-151S.
- Steinberg, J.P., Hong, S.J., Geringer, M.R., Galiano, R.D., Mustoe, T.A., 2012. Equivalent effects of topically-delivered adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts in the ischemic rabbit ear model for chronic wounds. *Aesthet Surg J* 32, 504-519.
- Stoff, A., Rivera, A.A., Sanjib Banerjee, N., Moore, S.T., Michael Numnum, T., Espinosa-de-Los-Monteros, A., Richter, D.F., Siegal, G.P., Chow, L.T., Feldman, D., Vasconez, L.O., Michael Mathis, J., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T., 2009. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Experimental dermatology* 18, 362-369.
- Stoltz, J.F., de Isla, N., Li, Y.P., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein, C., Chen, Y., Decot, V., Magdalou, J., Li, N., Reppel, L., He, Y., 2015. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem cells international* 2015, 734731.
- Stone, D.K., 1998. Receptors: structure and function. *The American journal of medicine* 105, 244-250.
- Sullivan, T.P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C., Mertz, P., 2001. The pig as a model for human wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 9, 66-76.
- Surahio, A.R., Khan, A.A., Farooq, M., Fatima, I., 2014. Role of honey in wound dressing in diabetic foot ulcer. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad* : JAMC 26, 304-306.

- Sutton, M.T., Fletcher, D., Ghosh, S.K., Weinberg, A., van Heeckeren, R., Kaur, S., Sadeghi, Z., Hijaz, A., Reese, J., Lazarus, H.M., Lennon, D.P., Caplan, A.I., Bonfield, T.L., 2016. Antimicrobial Properties of Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Potential for Cystic Fibrosis Infection, and Treatment. *Stem cells international* 2016, 5303048.
- Szabo, S., Folkman, J., Vattay, P., Morales, R.E., Pinkus, G.S., Kato, K., 1994. Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology* 106, 1106-1111.
- Tablin, F., 2000. Platelet structure and function. In: Feldman, B.F., Zinck, J.G., Jain, N.C. (Eds.), *Schalm's Veterinary Haematology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 448-452.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takikawa, M., Sumi, Y., Ishihara, M., Kishimoto, S., Nakamura, S., Yanagibayashi, S., Hattori, H., Azuma, R., Yamamoto, N., Kiyosawa, T., 2011. PRP&F/P MPs improved survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats. *The Journal of surgical research* 170, e189-196.
- Takzaree, N., Hadjiakhondi, A., Hassanzadeh, G., Rouini, M.R., Manayi, A., 2016. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats. *Acta Med Iran* 54, 233-239.
- Tambella, A.M., Attili, A.R., Dini, F., Palumbo Piccionello, A., Vullo, C., Serri, E., Scrollavezza, P., Dupre, G., 2014. Autologous platelet gel to treat chronic decubital ulcers: a randomized, blind controlled clinical trial in dogs. *Veterinary surgery : VS* 43, 726-733.
- Tarroni, G., Tessarin, C., De Silvestro, L., Casol, D., Giozzet, M., Caloprisco, G., De Paoli Vitali, E., 2002. [Local therapy with platelet-derived growth factors for chronic diabetic ulcers in haemodialysis patients]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia* 19, 630-633.
- Tartarini, D., Mele, E., 2015. Adult Stem Cell Therapies for Wound Healing: Biomaterials and Computational Models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3, 206.
- Tavassoli, M., Friedenstein, A., 1983. Hemopoietic stromal microenvironment. *The American Journal of Hematology* 15, 195-203.
- Teng, M., Huang, Y., Zhang, H., 2014. Application of stem cells in wound healing--an update. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 22, 151-160.
- Theoret, C., 2009. Tissue engineering in wound repair: the three "R"s--repair, replace, regenerate. *Veterinary surgery : VS* 38, 905-913.
- Theoret, C.L., Wilkink, J.M., 2013. Aberrant wound healing in the horse: naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 21, 365-371.
- Thomas, E.D., 1999. A history of haemopoietic cell transplantation. *British Journal of Haematology* 105, 330-339.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

- Timmins, N.E., Kiel, M., Gunther, M., Heazlewood, C., Doran, M.R., Brooke, G., Atkinson, K., 2012. Closed system isolation and scalable expansion of human placental mesenchymal stem cells. *Biotechnology and bioengineering* 109, 1817-1826.
- Ting, A.E., Mays, R.W., Frey, M.R., Hof, W.V., Medicetty, S., Deans, R., 2008. Therapeutic pathways of adult stem cell repair. *Crit Rev Oncol Hematol* 65, 81-93.
- Todorovic, V., Jurukovski, V., Chen, Y., Fontana, L., Dabovic, B., Rifkin, D.B., 2005. Latent TGF-beta binding proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 38-41.
- Torrecillas Ramos, J., 2013. VALORACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DEL USO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS/PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN EL TRATAMIENTO DE LAS ÚLCERAS POR PRESIÓN. Departamento de enfermería. Universidad de Granada, Granada.
- Torsvik, A., Bjerkgvig, R., 2013. Mesenchymal stem cell signaling in cancer progression. *Cancer treatment reviews* 39, 180-188.
- Toyserkani, N.M., Christensen, M.L., Sheikh, S.P., Sorensen, J.A., 2015. Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? *Annals of plastic surgery* 75, 117-123.
- Trejo, J.L., Piriz, J., Llorens-Martin, M.V., Fernandez, A.M., Bolos, M., LeRoith, D., Nunez, A., Torres-Aleman, I., 2007. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its pro-cognitive effects. *Molecular psychiatry* 12, 1118-1128.
- Trottier, V., Marceau-Fortier, G., Germain, L., Vincent, C., Fradette, J., 2008. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem cells* 26, 2713-2723.
- Troyer, D.L., Weiss, M.L., 2008. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 26, 591-599.
- Tsuboi, R., Shi, C.M., Sato, C., Cox, G.N., Ogawa, H., 1995. Co-administration of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1 stimulates wound healing in animal models. *The Journal of investigative dermatology* 104, 199-203.
- Tsubone, T., Moran, S.L., Amadio, P.C., Zhao, C., An, K.N., 2004. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Annals of plastic surgery* 53, 393-397.
- Tziotzios, C., Profyris, C., Sterling, J., 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *Journal of the American Academy of Dermatology* 66, 13-24; quiz 25-16.
- Valbonesi, M., Giannini, G., Migliori, F., Dalla Costa, R., Galli, A., 2002. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *The International journal of artificial organs* 25, 334-338.
- Vande Berg, J.S., Robson, M.C., 2003. Arresting cell cycles and the effect on wound healing. *The Surgical clinics of North America* 83, 509-520.
- Vasconcelos, E., Figueiredo, A.C., Seghatchian, J., 2003. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and Apheresis. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 29, 13-16.
- Vasquez, R., Marien, B.J., Gram, C., Goodwin, D.G., Menzoian, J.O., Raffetto, J.D., 2004. Proliferative capacity of venous ulcer wound fibroblasts in the presence of platelet-derived growth factor. *Vascular and endovascular surgery* 38, 355-360.

- Vega, J.A., García, O., Martínez, A., 2000. Cartílago articular y factores de crecimiento. *Mapfre medicina* 11, 212-225.
- Verschure, P.J., Marle, J.V., Joosten, L.A., Helsen, M.M., Lafeber, F.P., Berg, W.B., 1996. Localization of insulin-like growth factor-1 receptor in human normal and osteoarthritic cartilage in relation to proteoglycan synthesis and content. *British journal of rheumatology* 35, 1044-1055.
- Vilar, J.M., Morales, M., Santana, A., Spinella, G., Rubio, M., Cuervo, B., Cugat, R., Carrillo, J.M., 2013. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. *BMC veterinary research* 9, 131.
- Vileikyte, L., 2001. Diabetic foot ulcers: a quality of life issue. *Diabetes/metabolism research and reviews* 17, 246-249.
- Visscher, M., Narendran, V., 2014. The Ontogeny of Skin. *Advances in wound care* 3, 291-303.
- Volk, S.W., Radu, A., Zhang, L., Liechty, K.W., 2007. Stromal progenitor cell therapy corrects the wound-healing defect in the ischemic rabbit ear model of chronic wound repair. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 736-747.
- Vourtsis, S.A., Papalois, A.E., Agrogiannis, G.D., Spyriounis, P.K., Patsouris, E., Ionac, M., 2012. Improvement of a long random skin flap survival by application of vascular endothelial growth factor in various ways of local administration in a rat model. *Indian J Plast Surg* 45, 102-108.
- Waldron, R., Zimmerman-Pope, N., 2003. Superficial skin wounds. In: Slater, D. (Ed.), *Textbook of small animal surgery*. Saunders, Philadelphia, USA, 259-273.
- Wan, Y., 2013. Bone marrow mesenchymal stem cells: fat on and blast off by FGF21. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 546-549.
- Wang, C.J., Wang, F.S., Huang, C.C., Yang, K.D., Weng, L.H., Huang, H.Y., 2005. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J Bone Joint Surg Am* 87, 2380-2387.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630.
- Waugh, W.G., 1940. Experiments in the Acceleration of Wound Healing. *British medical journal* 1, 249-252.
- Weibrich, G., Buch, R.S., Kleis, W.K., Hafner, G., Hitzler, W.E., Wagner, W., 2002. Quantification of thrombocyte growth factors in platelet concentrates produced by discontinuous cell separation. *Growth factors* 20, 93-97.
- Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., Hitzler, W.E., 2004. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34, 665-671.
- Weibrich, G., Kleis, W.K., 2002. 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* 13, 437-443.
- Weibrich, G., Kleis, W.K., Buch, R., Hitzler, W.E., Hafner, G., 2003. The Harvest Smart PRP system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. *Clinical oral implants research* 14, 233-239.

- Weibrich, G., Kleis, W.K., Hafner, G., 2002. Growth factor levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *The International journal of oral & maxillofacial implants* 17, 184-190.
- Weinstein-Oppenheimer, C.R., Aceituno, A.R., Brown, D.I., Acevedo, C., Ceriani, R., Fuentes, M.A., Albornoz, F., Henriquez-Roldan, C.F., Morales, P., Maclean, C., Tapia, S.M., Young, M.E., 2010. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *Journal of translational medicine* 8, 59.
- Werner, S., 1998. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine & growth factor reviews* 9, 153-165.
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83, 835-870.
- Westermark, B., 1990. The molecular and cellular biology of platelet-derived growth factor. *Acta endocrinologica* 123, 131-142.
- Wetzler, C., Kampfer, H., Stallmeyer, B., Pfeilschifter, J., Frank, S., 2000. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *The Journal of investigative dermatology* 115, 245-253.
- Whitby, D.J., Longaker, M.T., Harrison, M.R., Adzick, N.S., Ferguson, M.W., 1991. Rapid epithelialisation of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *Journal of cell science* 99 (Pt 3), 583-586.
- White, R.A.S., 1999. The aetiology and classification of wounds and skin deficits. In: BSAVA (Ed.), *Manual of canine and feline wound management and reconstruction*. BSAVA, UK, 5-12.
- Whitman, D.H., Berry, R.L., Green, D.M., 1997. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 55, 1294-1299.
- Whyte, A., Sanchez, M., 2009a. Colgajos cutáneos. In: Sopena, J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 147-176.
- Whyte, A., Sanchez, M., 2009b. Injertos cutáneos. In: Sopena, J. (Ed.), *Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales*. Servet, Zaragoza, España, 179-189.
- Wilgus, T.A., Matthies, A.M., Radek, K.A., Dovi, J.V., Burns, A.L., Shankar, R., DiPietro, L.A., 2005. Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *The American journal of pathology* 167, 1257-1266.
- Williams, P.L., Bannister, L.H., Berry, M.M., Collins, P., Dyson, M., Dussek, J.E., 1995. *Gray's anatomy international student edition*.
- Winter, G.D., 1962. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature* 193, 293-294.
- Wolswijk, G., 2002. Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain : a journal of neurology* 125, 338-349.
- Wong, V.W., Sorkin, M., Glotzbach, J.P., Longaker, M.T., Gurtner, G.C., 2011. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* 2011, 969618.

- Wu, S.C., Marston, W., Armstrong, D.G., 2010. Wound care: the role of advanced wound-healing technologies. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 100, 385-394.
- Wu, Y., Chen, L., Scott, P.G., Tredget, E.E., 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells* 25, 2648-2659.
- Wulff, B.C., Parent, A.E., Meleski, M.A., DiPietro, L.A., Schrementi, M.E., Wilgus, T.A., 2012. Mast cells contribute to scar formation during fetal wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 132, 458-465.
- Wynn, T.A., Ramalingam, T.R., 2012. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature medicine* 18, 1028-1040.
- Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., Lu, S., Wang, X., Li, S., Wang, W., Li, H., 2013. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS one* 8, e64000.
- Yang, C.C., Shih, Y.H., Ko, M.H., Hsu, S.Y., Cheng, H., Fu, Y.S., 2008. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS one* 3, e3336.
- Yang, L., Bryder, D., Adolfsson, J., Nygren, J., Mansson, R., Sigvardsson, M., Jacobsen, S.E., 2005. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3(-) short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. *Blood* 105, 2717-2723.
- Yang, S., Huang, S., Feng, C., Fu, X., 2012. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: strategies, challenges, and potential for cutaneous regeneration. *Front Med* 6, 41-47.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A., Ding, S., 2006. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6907-6912.
- Yarak, S., Okamoto, O.K., 2010. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *Anais brasileiros de dermatologia* 85, 647-656.
- Yasuhara, T., Date, I., 2007. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. *Cell transplantation* 16, 125-132.
- Yoon, B.S., Moon, J.H., Jun, E.K., Kim, J., Maeng, I., Kim, J.S., Lee, J.H., Baik, C.S., Kim, A., Cho, K.S., Lee, J.H., Lee, H.H., Whang, K.Y., You, S., 2010. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* 19, 887-902.
- Yoshida, S., Yamaguchi, Y., Itami, S., Yoshikawa, K., Tabata, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., 2003. Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *The Journal of investigative dermatology* 120, 335-343.
- Young, B., Heath, J., 2004. *Wheater's Histología funcional*. Madrid.
- Young, H.E., Black, A.C., Jr., 2004. Adult stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 276, 75-102.
- Yu, D.H., Mace, K.A., Hansen, S.L., Boudreau, N., Young, D.M., 2007. Effects of decreased insulin-like growth factor-1 stimulation on hypoxia inducible factor 1-alpha protein synthesis and function during cutaneous repair in diabetic mice. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 15, 628-635.

- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., Thomson, J.A., 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- Yuan, F., Lei, Y.H., Fu, X.B., Sheng, Z.Y., Cai, S., Sun, T.Z., 2008. [Promotive effect of adipose-derived stem cells on the wound model of human epidermal keratinocytes in vitro]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 46, 1575-1578.
- Zayni, R., Thaumat, M., Fayard, J.M., Hager, J.P., Carrillon, Y., Clechet, J., Gadea, F., Archbold, P., Sonnery Cottet, B., 2015. Platelet-rich plasma as a treatment for chronic patellar tendinopathy: comparison of a single versus two consecutive injections. *Muscles Ligaments Tendons J* 5, 92-98.
- Zeinaloo, A., Zanjani, K.S., Bagheri, M.M., Mohyeddin-Bonab, M., Monajemzadeh, M., Arjmandnia, M.H., 2011. Intracoronary administration of autologous mesenchymal stem cells in a critically ill patient with dilated cardiomyopathy. *Pediatric transplantation* 15, E183-186.
- Zhang, S., Ge, J., Sun, A., Xu, D., Qian, J., Lin, J., Zhao, Y., Hu, H., Li, Y., Wang, K., Zou, Y., 2006. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *Journal of cellular biochemistry* 99, 1132-1147.
- Zhang, Z., Michniak-Kohn, B.B., 2012. Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics* 4, 26-41.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D.A., 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.
- Zhu, S.F., Zhong, Z.N., Fu, X.F., Peng, D.X., Lu, G.H., Li, W.H., Xu, H.Y., Hu, H.B., He, J.M., Su, W.Y., He, Y.L., 2013a. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells. *Neuroscience letters* 541, 77-82.
- Zhu, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Hao, G., Liu, T., Wang, L., Yang, T., Wang, Q., Zhang, G., Wei, J., Li, Y., 2014. Placental mesenchymal stem cells of fetal and maternal origins demonstrate different therapeutic potentials. *Stem cell research & therapy* 5, 48.
- Zhu, Z., Ding, J., Shankowsky, H.A., Tredget, E.E., 2013b. The molecular mechanism of hypertrophic scar. *Journal of cell communication and signaling* 7, 239-252.
- Zielins, E.R., Atashroo, D.A., Maan, Z.N., Duscher, D., Walmsley, G.G., Hu, M., Senarath-Yapa, K., McArdle, A., Tevlin, R., Wearda, T., Paik, K.J., Duldulao, C., Hong, W.X., Gurtner, G.C., Longaker, M.T., 2014. Wound healing: an update. *Regenerative medicine* 9, 817-830.
- Zimmermann, R., Jakubietz, R., Jakubietz, M., Strasser, E., Schlegel, A., Wiltfang, J., Eckstein, R., 2001. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41, 1217-1224.
- Zou, Z., Zhang, Y., Hao, L., Wang, F., Liu, D., Su, Y., Sun, H., 2010. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert opinion on biological therapy* 10, 215-230.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H., 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-228.