



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

**ESTUDIO EXPERIMENTAL SOBRE LA INFLUENCIA DEL
PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA
CONCENTRACIÓN SÉRICA DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I Y LA PROTEÍNA C-
REACTIVA EN LA ESPECIE CANINA**

Universidad CEU-Cardenal Herrera

Tesis Doctoral

Elena Damiá Giménez

Directores:
Mónica Rubio
José M^a Carrillo
Joaquín J. Sopena

2012

A mis padres

A mi hermana

A ti, Jorge

Agradecimientos

Agradecimientos

A mi amiga y Directora de Tesis, Mónica Rubio, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo, por los madrugones en la fase experimental, por su complicidad, por todo lo que hemos compartido juntas y lo que nos queda... "Moni", al final, lo conseguimos.

A mis Directores de Tesis, José M^a Carrillo y Joaquín J. Sopena. A Chema, por todo lo que me ha enseñado, como él bien dice: "todos tenéis una pizca de mí", por el tiempo compartido y porque me acompañes a tomar más postres. A Joaquín, por hacer posible que este trabajo esté hoy aquí y por las imágenes aportadas.

A Ramón Cugat y Montse García, por haber confiado desde un principio en este proyecto, por su ayuda, por ser un ejemplo a seguir.

A los internos, residentes y Veterinarios del Hospital Clínico de la Universidad CEU Cardenal Herrera, en especial a M^a Luz y Mireia, por ayudarnos en la fase experimental.

A Rafael Mazo, por facilitar la realización de este trabajo y ayudarnos en el comienzo de la fase experimental.

Al equipo de la Universidad de Veterinaria de Murcia, en especial a JJ. Cerón, por su ayuda inestimable en la realización de analíticas.

A los “Beagles”, Lluna, Lia, Barru, Treppy, Niebla, Bilbo, Bufo y Junior, porque aunque no sean conscientes, no hubiéramos podido realizar esta Tesis sin ellos. Gracias por alegrarnos los días.

A Jorge, por acompañarme siempre, por facilitarme el trabajo, por hacerme reír, por hacerme feliz. Quién iba a decir cuando copiabas mis exámenes de matemáticas que terminaríamos compartiendo tantos momentos. Te quiero.

A mis padres. A mi madre, por su insistencia en la vida, por su profesionalidad, por compartir conmigo la pasión por su profesión, por cuidarme, por haberme ayudado a ser como soy; “a que sí mamá”. A mi padre, por su forma de ser, por su serenidad en los momentos difíciles, por confiar en mí, por estar a mi lado. Sin vosotros no hubiera conseguido esta tesis, ni otras muchas cosas, eso seguro.

A mi hermana, Julia, “Juli”, por su sinceridad, por la vida compartida, por ayudarme a ser más fuerte, por quererme. Enhorabuena por ser la mami que eres, mini Julia tiene mucha suerte.

A mi sobrina, Julia, porque aunque aún no lo sepas, ya tienes un trocito de mi corazón. Dentro de unos años espero enseñarte esta Tesis.

A Héctor, por tener siempre una sonrisa, por sus consejos y por los momentos vividos, que ya son muchos.

A mí Tía Lola, la tía de todos los sobrinos. Por querernos tanto, por cuidarnos, por estar siempre a nuestro lado.

A mi “Abu” Vicente, por los paseos por los Viveros, por el vaso de leche calentito de las mañanas, por la “chata merenguera”, por ser mi Abuelito.

A mi Abuelita Julia, porque donde quiera que estés, sé que estarás muy orgullosa de esta Tesis. Gracias por todo Abuelita.

A mi tío Vicen (“Vi”), porque a pesar de la distancia siempre te siento cerca, por cuidarme, porque no podría tener mejor padrino, por estar en los momentos importantes.

A mis tetes, Pablo y Alejandro, por seguir siendo los “nenes”, por su todavía inocencia, por sentir vuestro cariño, por seguir compartiendo experiencias juntos.

A la yaya Fina, por su forma de ser, por sus comidas multitudinarias de Navidad, por las risas compartidas y por ser una súper mamá, súper yaya y súper bisabuela.

A mi amiga Gema, por estar siempre que te necesito, por los desayunos y vivencias en las que me acompañas, por escucharme, por ser mi alma gemela.

A Alfonso, por la adolescencia compartida, por su saber estar, por cuidar de Gema, por ser el “Alfon”.

A mis amig@s de “Burja” por todo los años compartidos, por vivir con ellos muchas primeras experiencias, por las escapadas de Nochevieja, semana santa y verano. En especial a Raquel e Iván, por estar siempre cerca y sentir su afecto.

A Nuria, “Nuri,” y Víctor, por apoyarme siempre, por su amistad, por las distintas etapas vividas, por ser especiales.

A Manuel, “Manitos” y Lorena, “Lore”, por los partidos compartidos, por ayudarme en la nueva etapa y por volver a los Coloniales. En especial a “Lore” porque aún en momentos difíciles me robas una sonrisa.

A Inmaculada Peris, “Inma”, por aquellos días donde la inocencia nos hacía fuertes, por las risas compartidas y porque aunque en la distancia sé que te tengo cerca.

A Drako, por haber acogido tan bien a todos los nuevos miembros de la familia de 4 patas y por su cariño eterno. A Jonsy, por acompañar a Drako en sus paseos, por enseñar a mis padres lo bueno de su especie y por sus ronroneos. A mis “orejudos”, Lukas y Pepote, por su nobleza, ternura y compañía en la realización de esta Tesis. A Nico, por su alegría y muestras de cariño cuando nos encontramos y por haber sabido llevar la llegada de mini Julia.

A “Paquito” y Manoli, por cuidarme como a una hija. A Encarna y Agustín, por tratarme como a una nieta. En especial a Encarna, por los tupperwares con comida que me manda a casa. Gracias por vuestro afecto.

A “Mariado” y Alberto, por acogerme en su casa muchos fines de semana de mi infancia, por tratarme como a una más de la familia y por estar siempre en los momentos importantes. Gracias por vuestro cariño.

A los “Pelukos”, en especial a Esther, Bea, Alex, Pedro, Marcos y Mini Alex. Por todas las experiencias compartidas, fines de semana, fiestas, Nocheviejas, bodas, nacimientos... y por todas las que nos quedan. Tan lejos y tan cerca.

A todos los que alguna vez habéis creído en mí

Muchas Gracias

Índices

Índice de contenidos

Introducción	1	
<i>Introducción</i>		2
Hipótesis y Objetivos	5	
<i>Hipótesis de Trabajo</i>		6
<i>Objetivos</i>		8
Revisión Bibliográfica	10	
<i>Reparación de los tejidos</i>		11
Fases del proceso de reparación		12
El papel de las Plaquetas en la reparación tisular		14
<i>Lesión muscular</i>		18
Causas y tipos de lesión muscular		20

Consideraciones terapéuticas de la lesión muscular	21
Tratamiento según gravedad de la lesión muscular	22
Métodos de evaluación de la musculatura	26
<i>Factores de crecimiento</i>	30
Factor de crecimiento insulínico (IGF)	31
Otros factores de crecimiento	34
<i>Plasma rico en factores de crecimiento (PRFC)-Plasma rico en plaquetas (PRP)</i>	45
Concentración de plaquetas	48
Procedimiento de obtención del PRGF-PRP	49
Métodos de obtención del PRGF-PRP	51
Métodos de activación PRGF-PRP	56
Aplicaciones del PRGF-PRP	58
Riesgos de la utilización del PRGF-PRP	73
Motivo de controversia	74
Otras opciones terapéuticas al PRP	76
<i>Respuesta de fase aguda</i>	79
Desencadenamiento de la respuesta de fase aguda	80
Proteínas de fase aguda (PFA)	83
Proteína C-Reactiva (CRP)	85
Otras proteínas de fase aguda	87
PFA positivas	88
PFA negativa	92
Proteínas de fase aguda como método de evaluación de la respuesta inflamatoria en la especie canina	93
Materiales y Métodos	101
<i>Materiales</i>	102
Modelo animal	103
Equipos	104
Material fungible	105
Soluciones y Fármacos	106
Instalaciones	106
<i>Métodos</i>	108
Diseño experimental	108
Preparación del paciente	109

Descripción de la técnica	110
Procesado de las muestras sanguíneas	114
Evaluación del PRGF	114
Estudio por imagen	115
Procesado de las imágenes	117
Estudio estadístico	117
Resultados 119	
<i>Resultados</i>	120
Exclusión de animales durante el estudio	122
<i>Estudio de los pacientes</i>	124
Edad	124
Peso	125
Analíticas sanguíneas	128
<i>Estudio del Plasma Rico en Factores de Crecimiento</i>	130
Plaquetas	130
IGF-I	132
Leucocitos	133
Valor hematocrito	134
<i>FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I (IGF-I)</i>	136
Influencia del peso sexo y edad en los niveles séricos del IGF-I	139
<i>PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP)</i>	142
Influencia del peso, sexo y edad en los niveles séricos de CRP	145
<i>Correlación existente entre el IGF-I y la CRP</i>	148
<i>Estudio ecográfico</i>	150
Comparación de las imágenes ecográficas por lotes de estudio	150
Comparación de las imágenes ecográficas entre lotes de estudio	163
<i>Estudio de las imágenes obtenidas por Tomografía Axial Computerizada</i>	167
Comparación de las imágenes de la TC por lotes de estudio	167
Comparación de las imágenes de la TC entre lotes de estudio	177
Discusión 181	
<i>Discusión</i>	182
Metodología de estudio	182
Zona de estudio	183
Obtención y activación del PRGF en la especie canina	184

Aplicación del PRGF	187
Estudio cualitativo del Plasma Rico en Factores de crecimiento	189
IGF-I	191
CRP	194
Correlación existente entre IGF-I y CRP	197
Estudio por imagen	198
Conclusiones 200	
<i>Conclusiones</i>	201
Resumen Extendido 203	
<i>Resumen Extendido</i>	204
Resumen 211	
<i>Resumen</i>	212
Summary 216	
<i>Summary</i>	217
Bibliografía 221	
<i>Bibliografía</i>	222

Índice de Tablas

Tabla 1: Ventajas e inconvenientes de la ecografía muscular (Balius, 2011)	27
Tabla 2: Clasificación ecográfica de lesiones musculares (modificada de Lefebure y Pourcelot, 1991).	28
Tabla 3: Protocolos para la obtención de PRP-PRGF	55
Tabla 4: Clasificación de las PFAs en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2004).	84
Tabla 5: Principales PFAs en las diferentes especies (modificado de Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2001).	85
Tabla 6: Niveles y principales funciones biológicas de PFAs en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2004).	88
Tabla 7: Ventajas de la determinación de PFAs como método de evaluación de proceso inflamatorio (modificado de Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2004)	95
Tabla 8: Niveles de CRP en intervenciones quirúrgicas en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2004).	99

Tabla 9: Parámetros hematológicos, bioquímicos y serológicos.	103
Tabla 10: Datos iniciales de los animales incluidos en el estudio	104
Tabla 11: Control de los animales en las instalaciones.	107
Tabla 12: Edad en meses de los 3 grupos de estudio	125
Tabla 13: Peso medio en kg de los animales en cada grupo durante el estudio.	125
Tabla 14: Peso en Kg de los perros en el lote 1	126
Tabla 15: Peso en Kg de los perros en el lote 2	127
Tabla 16: Peso en Kg de los perros en el lote 3	127
Tabla 17: Hemograma de los pacientes	128
Tabla 18: Bioquímica de los pacientes antes de entrar en el estudio	129
Tabla 19: Electrolitos y serología de los pacientes antes de entrar en el estudio	129
Tabla 20: Estudio descriptivo de las plaquetas en sangre (SE), plasma rico en factores de crecimiento (PR) y el plasma pobre en factores de crecimiento (PP) entre grupos	131
Tabla 21: Estudio descriptivo de la concentración de IGF-I en Sangre (SE), Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PR) y el Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PP) entre grupos	132
Tabla 22: Estudio descriptivo de la presencia de leucocitos en SE, PR y PP por grupos de estudio	133
Tabla 23: Valor hematocrito de la SE, PP y PR en los 3 grupos	134
Tabla 24: Medias obtenidas del IGF-I en el lote PCB en cada uno de los tiempos.	137
Tabla 25: Medias obtenidas del IGF-I en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.	137
Tabla 26: Medias obtenidas del IGF-I en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.	138
Tabla 27: Significación estadística del peso sobre los niveles séricos de IGF-I en el estudio.	139
Tabla 28: Correlación existente entre IGF-I y el peso de los pacientes	139
Tabla 29: Significación estadística del sexo sobre los niveles séricos de IGF-I	140
Tabla 30: Significación estadística de la edad sobre los niveles séricos de IGF-I	141
Tabla 31: Medias obtenidas de la CRP en el lote PCB en cada uno de los tiempos.	143
Tabla 32: Medias obtenidas de la CRP en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.	143
Tabla 33: Medias obtenidas de la CRP en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.	144
Tabla 34: Significación estadística del peso sobre los niveles séricos de CRP	145
Tabla 35: Correlación entre CRP y el peso	145

Tabla 36: Significación estadística del sexo sobre los niveles séricos de CRP	146
Tabla 37: Significación estadística de la edad sobre los niveles séricos de CRP	147
Tabla 38: Correlación de Pearson bivalente entre IGF-I y CRP	148
Tabla 39: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos	151
Tabla 40: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos	151
Tabla 41: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos	152
Tabla 42: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos	153
Tabla 43: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos	154
Tabla 44: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos	154
Tabla 45: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos	155
Tabla 46: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos	155
Tabla 47: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos	156
Tabla 48: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda del lote PRGF en cada uno de los tiempos	157
Tabla 49: Medidas musculares a nivel de L6 derecha del lote PRGF en cada uno de los tiempos	158
Tabla 50: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda del lote PRGF en cada uno de los tiempos	158
Tabla 51: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	159
Tabla 52: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	159
Tabla 53: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	160
Tabla 54: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	161
Tabla 55: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	162
Tabla 56: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos	162
Tabla 57: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos.	168
Tabla 58: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos.	168

- Tabla 59: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos. 169
- Tabla 60: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos.
169
- Tabla 61: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos 170
- Tabla 62: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos 170
- Tabla 63: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
171
- Tabla 64: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
171
- Tabla 65: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
172
- Tabla 66: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
172
- Tabla 67: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
173
- Tabla 68: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.
173
- Tabla 69: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
174
- Tabla 70: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
174
- Tabla 71: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
175
- Tabla 72: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
175
- Tabla 73: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
176
- Tabla 74: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.
176
- Tabla 75. Determinación del volumen de anticoagulante según hematocrito para una muestra de 5 ml
(modificada de Woodhams *et al.*, 2001) 190

Índice de Figuras

Figura 1: Fracciones de la separación del Plasma	50
Figura 2: Cambios durante la respuesta de fase aguda.	83
Figura 3: Sedación del paciente (a) y colocación de catéter central (b).	110
Figura 4: Extracción sanguínea para la preparación de PRGF (a), colocación en tubos de citrato sódico (b)	110 110
Figura 5: Centrifugación muestras sanguíneas (a) y aspecto del plasma tras el centrifugado (b).	111
Figura 7: Material necesario para la activación del PRGF	112
Figura 9: Esquema de un corte transversal a nivel de la 5ª vértebra lumbar donde se puede apreciar la musculatura de la zona de infiltración.	112

Figura 10: Posición del paciente para la inoculación de PRGF	113
Figura 12: Posición del paciente en ecografía	115
Figura 13: Posición del paciente para la TC	116
Figura 14: Esquema de la medida de las imágenes ecográficas (a) y por TC (b) obtenidas con el programa Image Pro-Plus®	117
Figura 15. Peso medio en cada lote	126
Figura 16: Evolución de los pesos en el tiempo	128
Figura 17: Comparación del número de plaquetas entre las muestras en cada grupo	131
Figura 18: Comparación de la concentración de IGF-I entre las muestras en cada grupo	132
Figura 19: Diferencias entre las medias de leucocitos en los tres tipos de muestra.	134
Figura 20: Comparación del valor hematocrito en los diferentes tipos de muestra y en los tres grupos.	135
Figura 21: Comparación de la evolución del IGF-I en el tiempo en los tres grupos de estudio	138
Figura 22: Comparación de los niveles de IGF-I por sexos en cada uno de los grupos de estudio	140
Figura 23: Comparación de los niveles de IGF-I por edad en cada uno de los grupos de estudio	141
Figura 24: Comparación de la evolución de la CRP en el tiempo en los tres grupos de estudio	144
Figura 25: Comparación de los niveles de CRP por sexo en cada uno de los grupos de estudio	146
Figura 26: Comparación de los niveles de CRP por edad en cada uno de los grupos de estudio	147
Figura 27: Evolución de IGF-I (a) y CRP (b) en el tiempo por lotes de estudio	149
Figura 28: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PCB	152
Figura 29: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PCB	153
Figura 30: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote PCB	154
Figura 31: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PRGF	156
Figura 32: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PRGF	157
Figura 33: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote PRGF	158
Figura 34: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote HPRGF	160

Figura 35: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote HPRGF	161
Figura 36: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote HPRGF	162
Figura 37: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel derecho entre los 3 lotes.	163
Figura 39: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel derecho entre los 3 lotes	164
Figura 40: Comparación de la evolución en el tiempo de L5 a nivel izquierdo entre los 3 lotes	165
Figura 41: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 a nivel derecho entre los 3 lotes	165
Figura 42: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel izquierdo entre los 3 lotes	166
Figura 43: Comparación de la evolución en el tiempo de L4 derecha e izquierda en el lote PCB.	168
Figura 44: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PCB.	169
Figura 45: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote PCB.	170
Figura 46: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PRGF.	171
Figura 47: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PRGF.	172
Figura 48: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote PRGF	173
Figura 49: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote HPRGF	174
Figura 50: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote HPRGF	175
Figura 51: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote HPRGF	176
Figura 52: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel derecho entre los 3 lotes.	177
Figura 53: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.	178

Figura 54: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel derecho entre los 3 lotes.	178
Figura 55: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.	179
Figura 56: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel derecho entre los 3 lotes.	179
Figura 57: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.	180

Abreviaturas

Listado de Abreviaturas

- AAS: Amiloide A Sérico
- ACTH: Hormona Adrenocorticotropa
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADP: Adenosín Difosfato
- aFGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico ácido
- AGP: α_1 Glicoproteína Ácida
- AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos
- ALS: Subunidad Ácido Lábil
- ARN: Ácido Ribonucleico
- ATP: Adenosín Trifosfato
- B: Basal

- BDGF: Factor de Crecimiento derivado del hueso
- bFGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico básico
- BMPs: Proteínas Morfogenéticas Óseas
- BTI: Instituto Biotecnológico
- CaCl₂: Cloruro Cálcico
- CCL5: Quimiocina 5
- CD40: Citoquina de Membrana Intrínseca
- CML: Células Musculares Lisas
- Cp: Ceruloplasmina
- CRP: Proteína C-reactiva
- DE: Desviación estándar
- ECs: Células Endoteliales
- EGF: Factor de Crecimiento Epitelial
- Fb: Fibrinógeno
- FC: Factores de Crecimiento
- GH: Hormona de Crecimiento
- HGF: Factor de Crecimiento Hepatocítico
- HGFA: Activador del Factor de Crecimiento Hepatocítico
- Hp: Haptoglobina
- HPRGF: elevadas dosis de Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- IGFBPs: Proteínas de Unión del IGF-I
- IGF-I: Factor de Crecimiento Insulínico Tipo I
- IL-1/IL-3/IL-6/IL-8: Interleukina-1/Interleukina-3/Interleukina-6/Interleukina-8
- IOC: Comité Olímpico Internacional
- LCA: Ligamento Cruzado Anterior
- LH: Hormona Luteinizante
- MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1
- MDSC: Células Madre Derivadas del Músculo
- MEC: Matriz Extracelular
- N: Tamaño de la Muestra
- NGF: Factor de Crecimiento Neurotrófico
- NO: Óxido Nítrico

- OA: Osteoartritis
- PAF: Factor de Activación Plaquetario
- PAI-1: Inhibidor- Activador de Plasminógeno tipo I
- PCB: Placebo
- PDGF: Factor de Crecimiento derivado de las Plaquetas
- PF4: Factor Plaquetario 4
- PFAs: Proteínas de Fase Aguda
- PIGF: Factor de Crecimiento de Placenta
- PPGF: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento
- PPP: Plasma Pobre en Plaquetas
- PRFM: Matriz de Fibrina Rica en Plaquetas
- PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento
- PRP: Plasma Rico en Plaquetas
- RFA: Respuesta de Fase Aguda
- RMN: Resonancia Magnética
- SE: Sangre Entera
- Sig: Significación
- SPP: Esfingosina 1 Fosfato
- SSF: Suero Salino Fisiológico
- TC: Tomografía Computerizada
- TF: Factor Tisular
- TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante
- TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral
- TXA₂: Tromboxano A₂
- VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
- WADA: Agencia Mundial Antidoping
- β -TCP: Fosfato β -Tricálcico

Introducción

Introducción

La agencia mundial antidoping (WADA) publicó el 19 de Septiembre de 2009 la lista de sustancias consideradas como “doping” en el mundo del deporte. Este código entró en vigor a partir del 1 de Enero de 2010. Entre las sustancias prohibidas se encontraban: la hormona de crecimiento (GH), el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), la isoforma del IGF-I o factor de crecimiento mecánico (MGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF), así como el plasma rico en plaquetas (PRP) administrado vía intramuscular. Estas sustancias formaban parte de esta lista, ya que interfieren en la síntesis y degradación de proteínas, vascularización y regeneración de músculos, tendones y ligamentos, lo que podría suponer un efecto beneficioso y ventajista en el rendimiento del atleta.

Originariamente, el Plasma Rico en Plaquetas (PRP) o Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) se definió como “el volumen de plasma autólogo que tiene una concentración plaquetaria por encima de la línea basal”. En el año 2000, Vega y colaboradores, lo definieron como 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. Son una fuente autóloga de muchos factores y sustancias, sobretodo del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y del factor de crecimiento β -transformante. Estos factores de crecimiento liberados tras la degranulación de las plaquetas en el lugar de la lesión, son los que proporcionan los mecanismos necesarios para que se produzcan las síntesis biológicas necesarias en el proceso de cicatrización y reparación de tejidos (Grageda *et al.*, 2005). Entre los factores más significativos que podemos encontrar en el PRP-PRGF cabe destacar el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), como el más relevante en este proyecto.

En un primer momento, estos concentrados plaquetarios se utilizaban como agentes hemostáticos, debido a que producen una activación local de la cascada de la coagulación. Aunque fue en la década de los 90 cuando el PRP-PRGF comenzó a emplearse con el objetivo de realizar terapias de mínima invasión y rápida recuperación, en diversos campos de la medicina, desde la traumatología y cirugía maxilofacial hasta la oftalmología y dermatología.

Hoy en día, es en la disciplina de traumatología y ortopedia, y gracias al deporte de élite, donde más importancia y relevancia ha suscitado, ya que se ha demostrado que el uso del PRP-PRGF acelera la cicatrización, la recuperación y por tanto la vuelta al trabajo, tanto en lesiones musculares como tendinosas.

El PRP-PRGF tiene un evidente efecto sellante y adherente que ayuda a mantener la coaptación de los planos dificultando la recidiva del hematoma que es un problema omnipresente en las lesiones musculares, dado que es un tejido altamente vascularizado. Por lo tanto, este concentrado plaquetario debe considerarse al menos un buen adyuvante terapéutico en este tipo de patologías (Sampson y Gerhardt, 2008).

Tras una lesión tisular, se produce una respuesta de fase aguda que refleja los cambios que se producen en el organismo. Durante el desarrollo de esta respuesta se liberan citoquinas y otros mediadores que desencadenan, entre otros efectos, la variación de las concentraciones de ciertas proteínas presentes en el plasma, denominadas, Proteínas de Fase Aguda (PFAs) (Eckersall 2000; Ceron *et al.*, 2005; Crisman *et al.*, 2008). Estas proteínas son consideradas marcadores útiles de la inflamación en diagnóstico clínico, pronóstico y monitorización de tratamiento en diversas patologías tanto agudas como crónicas (Mártinez-Subiela *et al.*, 2004; Martínez-Subiela y Cerón,

2005). Las proteínas que sufren un descenso en sus niveles durante el transcurso de la respuesta de fase aguda se denominan proteínas de fase aguda Negativas, y aquellas que experimentan un aumento se denominan proteínas de fase aguda Positivas, como es la proteína C-reactiva (CRP) (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

La CRP se encuentra en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos, aumentando su concentración en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de Trabajo

Las lesiones musculares son frecuentes en atletas de élite, mermando y retrasando de forma significativa la vuelta a la competición. Este hecho supone un coste económico y mediático considerable dada la influencia social de algunos deportes.

La aplicación de Plasma Rico en Plaquetas en este tipo de lesiones, ha demostrado un acortamiento en los tiempos de cicatrización así como en la recuperación y regreso a la alta competición de estos deportistas. Los tiempos más cortos hasta la curación van en beneficio del atleta, ya que no pierde tanta capacidad física y masa muscular, disminuyendo los tiempos de fisioterapia para el regreso a su actividad normal. Este hecho, ha supuesto una generalización en el uso de esta terapia en la medicina deportiva, dada la gran repercusión económica producida por estas lesiones en patrocinadores y clubes.

La prohibición de la WADA resultó un freno en la aplicación de este tipo de sustancias, y con ello un deterioro en los tiempos de cicatrización y vuelta a la alta competición de los deportistas de élite.

Por ello, en nuestra hipótesis de trabajo contemplamos la posibilidad de que la aplicación de PRGF no supusiera un aumento de IGF-I a nivel sistémico. La demostración de esta hipótesis de trabajo, justificaría una revisión de las medidas prohibitivas, permitiendo de nuevo el uso de este tipo de terapias y el beneficio que conllevan en la velocidad de recuperación. Por lo tanto los deportistas podrían seguir beneficiándose de las ventajas de estos tratamientos, con el consiguiente beneficio económico y temporal.

Objetivos

Con esta hipótesis de trabajo nos planteamos los siguientes objetivos, que han de guiar el desarrollo de nuestro estudio:

- Estudiar la influencia de la inyección local en músculo sano de PRGF sobre los niveles séricos de IGF-I en la especie canina. De este modo intentaremos vislumbrar el efecto real sistémico de la inyección aislada intramuscular del PRGF y su posible influencia en efectos metabólicos posteriores.
- Evaluar el efecto de la inyección aislada intramuscular de PRGF sobre la CRP, proteína marcadora de la inflamación aguda.
- Estudiar la relación entre los niveles séricos de IGF-I y CRP en la especie canina, en el tiempo.

- Valorar los factores que pueden influir en los niveles séricos de IGF-I y la CRP.
- Valorar la influencia local y sistémica de la infiltración de PRGF en el músculo y sus posibles efectos anabólicos, midiendo el diámetro del vientre muscular mediante ecografía y Tomografía Computarizada a diferentes tiempos.

Revisión Bibliográfica

Reparación de los tejidos

La reparación se refiere a la sustitución de las células dañadas o perdidas y de la matriz por nuevas células y matriz. Este proceso, no necesariamente restaura la estructura o función original de un tejido. Se puede considerar la regeneración como una forma especial de reparación en la cual, las células reemplazan al tejido perdido o dañado por un tejido idéntico al original. Hoy día se considera que, a excepción de las fracturas óseas, la mayoría de las lesiones y enfermedades de los tejidos músculo esqueléticos no estimulan la regeneración del tejido original, sino que se produce una reparación (McIlwraith, 2004).

En términos generales, en la reparación de tejidos se reconocen tres fases consecutivas que se solapan entre sí: una fase inflamatoria aguda, una segunda fase de proliferación y reparación y una tercera fase de remodelado (Bennett y Schultz, 1993a).

Desde una perspectiva molecular, la respuesta de los tejidos a una lesión se caracteriza por un perfil determinado de secreción y actividad de los factores de crecimiento, la cual va variando a medida que evolucionan las fases de reparación. La liberación de dichos factores de crecimiento, en respuesta a la lesión, está coordinada con un aumento de la expresión de receptores específicos para estos factores (Bennett y Schultz, 1993b).

Fases del proceso de reparación

En la reparación de tejidos se reconocen tres fases consecutivas que se solapan entre sí: una fase inflamatoria aguda, una segunda fase de proliferación y reparación y una tercera fase de remodelado (Bennett y Schultz, 1993a).

Fase de inflamación

En la fase aguda tras la lesión, los daños ocasionados en las membranas celulares originan cambios en la permeabilidad vascular y, como consecuencia de un trasvase de fluido, vasoconstricción reactiva, isquemia y cambios metabólicos (Sherwood, 2002).

Clínicamente esta inflamación se manifiesta asociada a eritema, dolor y pérdida de la función. En todo este proceso intervienen cambios vasculares, celulares y químicos, que van evolucionando en el transcurso de las distintas fases. En el mejor de los casos conducen a la reparación del tejido y, en casos desfavorables, a la degeneración crónica, a la formación de tejido cicatricial, fibrosis y adherencias (Sherwood, 2002).

La fase inflamatoria se caracteriza por un aumento de la vasodilatación, inducida por el óxido nítrico (NO), y un incremento del flujo sanguíneo que facilita el movimiento secuencial de las distintas poblaciones celulares hacia el lugar de la herida. Los neutrófilos, seguidos de monocitos y macrófagos, limpian la zona fagocitando los restos celulares del tejido dañado. Las señales moleculares iniciales suministradas por el coágulo sanguíneo que se forma tras la lesión vascular, son amplificadas por los macrófagos (Sherwood, 2002).

Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio se encuentra estrechamente regulado, evitando, así una respuesta exagerada o perjudicial. Algunos de los mediadores que producen 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. Los siguientes factores intervienen en esta regulación (Gallin, 1989; Male *et al.*, 1991; Roit *et al.*, 1992):

- **Histamina.** Actuando sobre receptores H2 (histamina 2), induce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa las células T supresoras.
- **Prostaglandina (PGE).** Produce en el mastocito y basófilo una inhibición de la liberación de mediadores y sobre los linfocitos una inhibición de la proliferación y diferenciación.
- **Agonistas autonómicos.** 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 autonómica. La activación del receptor β -adrenérgico produce una inhibición, mientras que la activación del α -adrenérgico y ζ -colinérgico inducen la estimulación
- **Heparina.** Inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento.
- **Eosinófilo.** Esta célula, atraída por el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A), acude al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la inflamación. La histaminasa actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el factor activador de las plaquetas (PAF) (Larsen y Herison, 1983; Male *et al.*, 1991).

Este conjunto de proteínas señala el inicio de una segunda fase de proliferación y reparación (Bennett y Schultz, 1993 a y b).

Fase de proliferación y reparación

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Los cambios característicos de esta fase son la formación del coágulo de fibrina y la migración celular de fibroblastos y células progenitoras que proliferan y sintetizan proteínas de la matriz extracelular (principalmente colágeno). Existe una población de células locales que también proliferan en respuesta a estas señales proteicas (Bennett y Schultz, 1993b).

En los protocolos de aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en vez del coágulo sanguíneo que se forma tras la rotura de vasos en la fase inicial, y que está constituida por plaquetas, hematíes y leucocitos, se ocupa la zona de la lesión con un coágulo blanco, formado por una red de fibrina que contiene un número elevado de plaquetas. Este hecho cambia el entorno bioquímico de la lesión influyendo en la evolución clínica: se observa una disminución significativa de la inflamación así como una aceleración de la fase de proliferación y de reparación (Mei-Dan *et al.*, 2010).

Al final de la fase de proliferación el coágulo provisional de fibrina se sustituye gradualmente por otra estructura más permanente, formada por colágeno. Esta estructura se denomina tejido de granulación e invade el espacio de la lesión (característica de esta etapa). Paralelamente, ha tenido lugar la angiogénesis: migración y proliferación de células endoteliales que invaden la estructura de fibrina, utilizando a ésta en un primer momento y posteriormente al tejido de granulación como soporte (Bennett y Schultz, 1993b).

Fase de remodelación

En esta fase final el tejido de granulación se reestructura y se sustituye por un tejido mejor organizado, cuyas fibras de colágeno se han orientado. Se caracteriza por un menor contenido celular y vascular y una matriz extracelular más densa (Bennett y Schultz, 1993b).

El papel de las Plaquetas en la reparación tisular

Las Plaquetas son células sanguíneas enucleadas, de forma ovalada, con un diámetro de 2 a 4 μ , contenidas en el plasma sanguíneo y cuya concentración normal en sangre oscila entre 150.000 y 300.000 por microlitro (Anitua y Andia 2000; Guyton y Hall, 2001; Marx y Garg 2005). En humana, este tipo celular tiene una semi-vida útil de 8 a 12 días, al final de la cual acaba su ciclo vital y son eliminadas de la circulación principalmente por el sistema de macrófagos tisulares (Guyton y Hall, 2001).

Durante el proceso de reparación tisular, tanto en la fase inflamatoria aguda como en la de proliferación celular y remodelado (Bennett y Schultz, 1993a y b), las plaquetas juegan un papel importante por su capacidad hemostática, actividad quimiotáctica y sobre el crecimiento, morfogénesis y diferenciación celular (Anitua *et al.*, 2004).

Por este motivo, a partir de la década de los noventa comenzaron a surgir diversos estudios que tenían como objetivo el aprovechamiento de los efectos beneficiosos que este tipo celular brinda en la reparación tisular (Tapayongsak *et al.*, 1994; Ledent *et al.*, 1995). A partir de este momento se fueron utilizando en diferentes campos: cirugía plástica, cirugía general, cirugía vascular, neurocirugía, oftalmología, cirugía oral, ortopédica, etc. (Floryan *et al.*, 2004).

Actividad plaquetaria

La plaqueta es un elemento celular multifuncional del sistema circulatorio, que posee forma discoidea y no tiene núcleo. Ayudan a mantener la integridad vascular, modular la respuesta inflamatoria y potenciar la curación de heridas tras una lesión tisular (Sink y Feldman, 2009).

La primera función atribuida a las plaquetas fue su papel hemostático, a través del cual impiden la pérdida de sangre en las zonas de lesión vascular. Para ello, se adhieren, agregan y forman una superficie pro coagulante que conducen a la generación de trombina y rápida formación del coágulo de fibrina (Reed, 2002; Anitua *et al.*, 2004).

Este tipo celular es capaz de liberar ciertas sustancias que juegan un papel importante en la reparación tisular e influyen en la reactivación de la vascularización y sobre otras células durante los procesos de inflamación y angiogénesis (Anitua *et al.*, 2004).

Beneficios plaquetarios

Las actividades beneficiosas relacionadas con la actividad plaquetaria, son debidas principalmente a las sustancias que son capaces de almacenar en el interior de su citoplasma, los **gránulos alfa**, que constituyen el 15% del volumen total de estas células y actúan como reservorio de múltiples sustancias proteicas de vital importancia funcional en diversos procesos (García y Coma, 2000). Estas proteínas se subdividen conforme a su funcionalidad en:

- Proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, trombospondín): que intervienen en las fases iniciales del crecimiento del trombo sanguíneo durante la hemostasia. Además, el fibrinógeno, es el primero que aparece para potenciar el efecto de la Interleukina-3 (IL-3) en progenitores hematopoyéticos humanos (Zhou *et al.*, 2002). La fibronectina y la vitronectina también participan en la reparación de las heridas (Lariviere *et al.*, 2003).
- Proteínas mitógenas (factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento β transformante, vascular endotelial, fibroblástico, epidérmico e insulínico): que estimulan la quimiotaxis y la proliferación-maduración celular (Galvin *et al.*, 2000; Folkman *et al.*, 2001; Reed, 2002).
- Proteínas fibrinolíticas (osteonectina, activador-inhibidor del plasminógeno tipo I): y/o reguladoras de la fibrinólisis. El inhibidor- activador de plasminógeno tipo I (PAI-1), puede obligar a la vitronectina a promover la formación y desarrollo de las interacciones de las células y la matriz (Minor y Peterson, 2002). Otra proteína plaquetaria que puede ser capaz de formar un complejo con el plasminógeno y anclarse al colágeno es la onectina, proteína secretada por los osteoblastos (Kelm *et al.*, 1994). Un estudio ha demostrado que el inhibidor de la fibrinólisis de las plaquetas promueve la liberación de la trombina activable, función pues también atribuida a las plaquetas (Mosnier *et al.*, 2003).

La microscopía electrónica revela unos nucleoides oscuros en los gránulos alfa, siendo aquí donde se localizan proteoglicanos como el condroitín sulfato en sus diversas isoformas. El Factor plaquetario 4 (PF4) y la tromboglobulina, están asociados directamente con estos proteoglicanos. El PF4 es un regulador negativo de la angiogénesis y un potente inhibidor de la proliferación celular endotelial (Hagedorn *et al.*, 2002; Sulpice *et al.*, 2002), aunque es capaz de estimular las células vinculando los proteoglicanos en su superficie o interactuar también con factores de crecimiento. Comparte propiedades anti-angiogénicas con numerosas proteínas, incluyendo el Trombospondín y las endostatinas, pero todavía muchas proteínas secretadas en los gránulos alfa reaccionan positivamente a la angiogénesis. El PF4 es también un quimiotáctico para neutrófilos y fibroblastos (Anitua *et al.*, 2004).

Las plaquetas también son ricas en citoquinas y quimiocinas. Un ejemplo de las quimiocinas es la quimiocina 5 (CCL5) o RANTES, la cual se deposita en el endotelio inflamado por una plaqueta dependiente del mecanismo P-selectina (mecanismo que crea una señal asociada a la célula importante para frenar los monocitos). Los proteoglicanos reconocen RANTES a través de su heparina vinculada. Otras quimiocinas liberadas son: Interleukina-8 (IL-8), proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) y el oncogén de crecimiento regulado- α . Éstas atraen a los leucocitos y activan otras plaquetas para modular la producción de moléculas inflamatorias por células endoteliales (Schober *et al.*, 2002; Gear y Camerini, 2003).

Una citoquina también muy estudiada es una proteína de membrana intrínseca conocida como la CD40. Es un sustrato de metaloproteasa y se almacena en su forma soluble (May *et al.*, 2002). Primero se conoció por su papel en la respuesta inmune y ahora se sabe que en las células vasculares ocasiona inflamación y síntesis de interleuquinas y quimioquinas. Otra citoquina es el factor tisular (TF), quien inicia la vía extrínseca de la cascada de la coagulación, siendo también un regulador de la angiogénesis (Carmeliet *et al.*, 1996). Inicialmente se pensaba que los monocitos lo mostraban en su superficie en sangre circulante, pero el TF es una glicoproteína de membrana y es transportada a la superficie plaquetaria por los gránulos α durante la exocitosis (Leon *et al.*, 2004). Es decir, las plaquetas que no son estimuladas tienen en la membrana de sus gránulos α la composición glicoproteica de la membrana plasmática de las plaquetas (Nurden, 1999). El TF puede regular la fijación del plasminógeno y contribuir a la cicatrización mediante la inducción de la migración de cultivos de células musculares lisas (Sato *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 1998).

Sin embargo, la proteína mejor estudiada es la P selectina, la cual modula las interacciones plaqueta-leucocito mediante su expresión en superficie (Schober *et al.*, 2002).

Por tanto, los gránulos α tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas, de ahí que la cantidad de estos gránulos (como promedio 35-40) determina el valor funcional de la célula (García y Coma, 2000; Reed 2002).

Los **gránulos densos** se caracterizan por su alta densidad electrónica, que le confieren el elevado contenido en calcio (50% del total) y fósforo inorgánico (García y Coma, 2000).

La mayoría de las sustancias que se depositan y que se forman en estos gránulos son: adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), calcio, magnesio, serotonina (5 HT), epinefrina, norepinefrina y dopamina (Anitua *et al.*, 2004).

El calcio es un cofactor necesario para la agregación plaquetaria y para la formación de fibrina. Es un regulador central potencial en la cicatrización de las heridas (Landsown, 2002).

La serotonina tiene receptores en las células vasculares y tras liberarse provoca una vasoconstricción e incremento de la permeabilidad capilar, mientras que la histamina puede tener efectos pro y antiinflamatorios (Burnstock 2002; Landsown, 2002).

Los **gránulos lisosomales** también forman parte del citoplasma plaquetario. Estos gránulos secretan hidrolasas ácidas, catepsinas D y E, elastasa y otras enzimas degradativas (Rendu y Brohard; 2001; Reed, 2002; Marx y Garg, 2005).

En cuanto a los **Metabolitos activos**, las plaquetas aportan eicosanoides sintetizados del ácido araquidónico de la membrana fosfolipídica, como el Tromboxano A₂ (TXA₂). Éste es un potente vasoconstrictor, pero también está relacionado en dañar la respuesta vascular proliferativa, proceso regulado por la prostaciclina (Cheng *et al.*, 2002). Otros metabolitos a destacar son la esfingosina-1-fosfato por su actividad mitogénica y el factor de activación plaquetario (PAF) como mediador del secuestro y la activación de los leucocitos en las células endoteliales y/o la agregación de plaquetas a través de un mecanismo dependiente de la P selectina (Zhang 1999; Cheng *et al.*, 2002; Weyrich *et al.*, 2002).

Lesión muscular

En humana, el músculo esquelético constituye uno de los tejidos más abundantes del organismo, representando un 40-45% del total del peso corporal. La gran mayoría de la patología muscular es de origen traumático y está relacionada con la actividad deportiva. En humana, alrededor del 30% de las lesiones en atletas afectan los músculos (Muñoz, 2002).

Con frecuencia las lesiones musculares son ignoradas y en ocasiones son objeto de un manejo terapéutico inapropiado. Se considera que las afecciones musculares ocupan el 1 a 2% de las enfermedades caninas, aunque su incidencia podría ser mayor (Taylor, 1996).

Los músculos pueden sufrir las siguientes lesiones: contusión, distensión, contractura, lesiones fibrilares, fasciculares o desgarros y ruptura completa. El 89% de las lesiones musculares asientan en los miembros posteriores, siendo los más afectados los músculos biarticulares, como, el recto interno (gracilis), semitendinoso, semimembranoso y gastrocnemio. Esto es debido a que están

situados más superficialmente y poseen poca fuerza, aunque tienen mayor capacidad de contracción (Fitch *et al.*, 1997).

Las causas que pueden provocar una lesión muscular se dividen en dos grupos (Delee y Drez, 1993):

- **Factores internos:** como movimientos violentos, con una brusca tensión de los músculos, en especial a causa de esfuerzos repetidos.

Para evitar riesgos se debe mantener un equilibrio adecuado de sales y electrolitos, existencia de reservas de energía en el músculo (glucógeno) y un estado de nutricional equilibrado antes y durante la práctica deportiva.

- **Factores externos:** golpes/contusiones, fundamentalmente tangenciales y heridas profundas. Además de causas ambientales (temperatura, humedad, etc.).

La fibra muscular es el elemento estructural básico del músculo esquelético. Se trata de una célula con forma elongada conectada al tendón y/o al hueso con el que, conjuntamente, realizan la función del movimiento. No existen conexiones entre las fibras musculares, siendo el lugar de conexión el inicio del tendón. A la unión entre las fibras musculares y el tendón se la conoce como unión músculo-tendinosa. La principal función del músculo es producir y modular el movimiento de las articulaciones (Bloomberg, 1995).

La lesión muscular se produce en los siguientes pasos (Tarragó, 2007):

- Degeneración de las miofibras por necrosis de las mismas.
- Acción de las proteínas de lisis que se liberan durante la lesión.
- Formación de un hematoma, que contribuye a la degeneración del tejido.
- Se produce un proceso inflamatorio con infiltración típica de neutrófilos y leucocitos.

Los objetivos del tratamiento de las lesiones musculares son (Balius, 2005):

- Resolución de los síntomas.
- Restauración precoz de la función.
- Regeneración versus reparación.
- Prevención de las recaídas.

Una terapia regenerativa eficaz lleva implícita la resolución rápida de los síntomas y la reducción del índice de recaídas. Por otro lado la regeneración tisular depende de una secuencia

de acontecimientos entre los que destacan los estímulos mecánicos, por lo tanto la movilización precoz es importante, a la vez que forma parte del plan terapéutico.

Causas y tipos de lesión muscular

Un músculo es requerido para absorber la energía cinética de un miembro. Por tanto, para la prevención de una lesión muscular aguda, es importante adaptar el esfuerzo físico a las posibilidades musculares del momento, es decir, hay que evitar someter al animal a un ejercicio violento sin previa preparación (Boccia y Brusa, 1999).

Entre las causas que predisponen a una lesión muscular, destacan:

- Fatiga muscular. En este estado el músculo no está en condiciones de generar fuerza activa. Los miembros fatigados absorben menos energía que los que no lo están (Delee y Drez, 1993).
- Falta de calentamiento previo, que debe ser progresivo y adaptado a las circunstancias. El calentamiento favorece la elongación muscular debido a que aumenta la extensibilidad del tejido conjuntivo (Mercado *et al.*, 1997).
- Características del suelo donde trabajan los animales de deporte. Las pistas de arena ocasionan más accidentes. En las pistas elípticas, los perros realizan un marcado esfuerzo a nivel de las curvas; las lesiones más frecuentes se producen en el lado derecho, ya que por lo general en la carrera giran hacia la izquierda (Bruce *et al.*, 1997).
- Otros factores pueden ser los desgarros por inyecciones repetidas de medicamentos (Khoury, 1991).

En la especie canina, estas causas de producción de lesiones musculares no son válidas para la **contractura muscular** (contracción involuntaria y permanente del músculo), no reversible con los movimientos pasivos, como resultado generalmente de una fibrosis y adherencias, que provocan el acortamiento del músculo. Los músculos más afectados por esta lesión, generalmente unilateral, son: semitendinoso, infraespinoso, gracillis y cuádriceps femoral (Bloomberg, 1995). La etiopatogenia de esta lesión no está bien definida, se citan causas como: esfuerzos desmedidos, miopatías, traumas, neuropatías, etc. La causa más frecuente de la contractura de los cuádriceps es la fractura distal del fémur con inmovilización prolongada con la rodilla en extensión o cuando se adhiere el músculo al fémur en casos de osteomielitis que producen la fijación parcial de la rodilla (Bloomberg, 1995; Fitch, 1997). En la contractura se manifiesta una restricción de los movimientos normales de la articulación subyacente, provocando una claudicación evidente (Boccia y Brusa, 1999).

La **contusión** está precedida por un trauma, por lo tanto su presentación es súbita y la claudicación es moderada con tendencia a disminuir. La zona dolorosa se acompaña de inflamación y edema. En casos muy graves puede existir hematoma y necrosis (Taylor, 1996).

En la **distensión** muscular los signos son parecidos en cuanto a su presentación, pero con frecuencia aparecen durante algún movimiento brusco, o durante o inmediatamente después de ejercicio sostenido. Es más difícil detectar la zona afectada, se comienza palpando y presionando ligeramente el miembro (los músculos deben palparse colocando las manos perpendicularmente a la dirección de las fibras musculares) hasta encontrar la zona afectada localizada por el dolor. Si no se detecta la zona lesionada, se procede a la flexión/extensión de los músculos posiblemente afectados. Si surgen dudas, se utilizan métodos complementarios como la ecografía (Lefebure y Pourcelot, 1991; Bloomberg, 1993).

Los **desgarros** musculares pueden ser fibrilares, fasciculares o totales, bajo el punto de vista clínico distinguimos entre ruptura muscular parcial o total. Es difícil distinguir entre ambas afecciones (Delee y Drez, 1993). La sintomatología es súbita, la funcionalidad es poco apreciable, exacerbándose con el ejercicio. Se observa una tumefacción de tamaño variable, de acuerdo al hematoma formado y al grado de edema concomitante, dolorosa a la palpación. Su consistencia varía de blanda a firme, pudiendo haber equimosis por infiltración sanguínea de las zonas subyacentes o hematomas subcutáneos. Si el desgarro es importante y el hematoma lo permite, se apreciará una depresión a la palpación digital. En la ruptura total, este signo es fácil de detectar, ya que se puede palpar un abultamiento en su origen que se agranda o reduce cuando el músculo se contrae. Además, en los casos crónicos las modificaciones fibrosas son frecuentes, el perfil del músculo puede estar modificado (por ejemplo, desgarro del recto interno) y hay retracción de las fibras musculares a nivel de la rotura (Lewis y Shelton, 1997).

En patología muscular, el mayor problema que se le presenta al clínico es la consulta tardía por parte del propietario, ya que se debe considerar que las afecciones musculares son agudas hasta las 48 horas de producirse, siendo subagudas hasta los 10 días y a partir de entonces se hacen crónicas en detrimento de la respuesta al tratamiento (Gómez, 1991).

Consideraciones terapéuticas de la lesión muscular

La reparación tisular de las lesiones musculares se lleva a cabo por el desarrollo de dos procesos diferentes (Genese, 1994):

- La **regeneración muscular primaria**, con la aparición de los denominados mioblastos persistentes que se diferencian a partir de células satélites localizadas en la membrana

basal o endomisio, con lo cual se puede alcanzar una recuperación anatómica (morfológica) y funcional máxima.

- La **reparación secundaria por formación de tejido fibroso**. Este mecanismo es menos deseable. Las lesiones más graves del músculo, como las laceraciones o desgarros que destruyen la membrana basal o endomisio, van a inducir este tipo de cicatrización fibrosa y, dependiendo de la extensión, una marcada incapacidad funcional.

En algunos casos, se realiza el tratamiento para evitar el agravamiento de lesiones que pueden evolucionar en base a cicatrización primaria o sea por regeneración muscular. Los tratamientos médicos conservadores suelen indicarse en las lesiones más leves como las contusiones y distensiones. Las rupturas y otras lesiones crónicas necesitan ser intervenidas quirúrgicamente para obtener una resolución satisfactoria (Boccia y Brusa, 1999).

Tratamiento según gravedad de la lesión muscular

- En las **contusiones y distensiones recientes**, de menos de 24 horas, la terapéutica tiene por finalidad detener la hemorragia, minimizar el edema y evitar daños adicionales a los tejidos (Renstrom, 1981). A tal efecto, en los casos agudos la aplicación de frío, ya sea en forma de compresas, hielo o almohadillas de gel (que se utilizan tanto para aplicar frío o calor), durante 15 a 20 minutos 2 o 3 veces/día en las primeras 48 horas, ayuda a disminuir la hinchazón, mejorando la circulación y aliviando el dolor (Bloomberg, 1995). En este tiempo el coágulo formado se mantiene friable por lo que nuevos traumas podrían inducir la recurrencia del sangrado. Para este propósito se recomienda el reposo y una inmovilización ligeramente compresiva por medio de una venda elástica o incluso un vendaje de Robert Jones. Está contraindicada en este tiempo la realización de masajes u otro tipo de fisioterapia que induzca vasodilatación con hiperemia o un aumento local de la temperatura. También se indican antiinflamatorios esteroides y no esteroides. Esos últimos se administran por vía oral o parenteral, siendo efectivos para aliviar el dolor de la miositis. En estudios de evaluación del uso de antiinflamatorios en las distensiones musculares se comprobó el beneficio de su acción para reducir el dolor y el edema sin interferir o comprometer el proceso de reparación (Khoury, 1991). Deben evitarse las inyecciones intramusculares de corticoides debido a la posibilidad de causar ulteriores rupturas o desgarros musculares (Bloomberg, 1993). Los antibióticos sólo se indican ante la sospecha o en presencia de áreas de necrosis. A partir de las 48 a 72 horas se modifica la orientación del tratamiento. En este momento los mioblastos se encuentran rodeando los bordes de la lesión. Junto con las células que conducen a la regeneración muscular

también se encuentran grandes cantidades de macrófagos convertidos en fibroblastos que segregan sustancias proteicas precursoras de fibras colágenas no extensibles. Teniendo en cuenta este proceso es que a partir de las 48 a 72 horas y según la magnitud de la lesión, se comenzará la movilización temprana dentro de la segunda etapa del tratamiento conservador. La movilidad estará limitada naturalmente por el dolor. El animal hará uso del miembro a voluntad, no debiendo ser estimulado o forzado en la actividad física. Los movimientos pasivos ejecutados en forma ordenada serán beneficiosos para la evolución. La movilización temprana incrementa la fuerza ténsil, estimula la resorción del tejido conectivo cicatricial, mejora la capilarización, impide la formación de adherencias y disminuye la atrofia muscular (Boccia y Brusa, 1999). También se implementan en esta etapa los procedimientos fisioterápicos, en especial aquellos capaces de proveer calor al área que se encuentra en proceso de reparación (Wilkins, 1993).

El calor, en combinación con el estiramiento, dará por resultado un aumento en la elasticidad de las fibras de colágeno, con lo cual se obtendrá la mayor longitud o elongación muscular. La aplicación de calor localizado se consigue por medio de ultrasonido, corriente galvánica, microondas, láser y masajes (Mercado *et al.*, 1997). En los animales de deporte, después del 10º día de la lesión, se puede comenzar con un programa de entrenamiento, en el cual primero se incrementará la frecuencia del ejercicio, para luego aumentar la carga si es que ésta es requerida (Fitch *et al.*, 1997).

- Las lesiones más graves, como las **rupturas o desgarros** en los que cabe esperar pérdida de la función debido a la cicatrización fibrosa de las mismas, deben ser tratadas quirúrgicamente para poder modificar dicho tipo de resolución. La cirugía está indicada sobre todo ante la presencia de un gran hematoma, en rupturas amplias o de músculos que poseen pocos o ningún agonista, así como también en casos crónicos con fibrosis y que hayan resultado refractarios al tratamiento médico (Breur y Blevins, 1994). El procedimiento quirúrgico consiste básicamente en la evacuación del hematoma con minuciosa hemostasia de los vasos sangrantes, desbridamiento de los tejidos lesionados y afrontamiento de los extremos seccionados por medio de diferentes técnicas de suturas. Las características morfológicas, constitucionales y dinámicas de los músculos crean un medio poco favorable para que las suturas mantengan los extremos de la sección en aposición, oponiéndose a la tensión ejercida por la contracción o retracción de las fibras, si se tiene en cuenta que el estrés muscular siempre es en sentido longitudinal. La vaina o fascia del músculo ofrece mejores condiciones para la colocación de puntos que absorban

las tensiones que naturalmente están presentes en la línea de sutura de las fibras musculares. Para que esta acción sea más efectiva se puede recurrir al uso de botones para obtener mayor tracción de los puntos aplicados en la fascia muscular. La utilización del patrón de sutura conocido como "cerca-lejos-lejos-cerca" con material reabsorbible mostró ser muy efectiva (Fitch *et al.*, 1997). A menudo la cirugía se difiere hasta pasados los primeros días, en especial en los casos que presentan grandes hematomas e hinchazón de las rupturas de los vientres musculares carnosos. Las rupturas a nivel musculotendinoso producen menos hemorragia y pueden ser operadas de inmediato. Retrasar por más tiempo la intervención permite la proliferación no deseable de tejido fibroso alrededor y dentro de los extremos musculares seccionados. Las rupturas de la unión musculotendinosa se reparan mejor utilizando la técnica de implante tendinoso (técnica de Braden). Aunque con este método se produzca un acortamiento y por tanto mayor tensión en la línea de sutura, el contacto más íntimo que se logra lo hace preferible a la anastomosis término-terminal. En la sección de un vientre muscular, los extremos se afrontan colocando puntos horizontales simples en la profundidad de la parte carnosa y puntos que absorben tensión sobre la fascia. Los materiales de sutura más recomendados son el nylon monofilamento, poliéster trenzado y entre las absorbibles, la polidioxanona. Es necesaria una inmovilización postquirúrgica complementaria durante 1 a 3 semanas, mediante la aplicación de un vendaje de Robert Jones o una férula. El retorno a la actividad será gradual, siguiendo los mismos principios considerados para los tratamientos conservadores (Boccia y Brusa, 1999). Las lesiones de este grado tienen un pronóstico reservado ya que entre sus posibles secuelas figuran atrofia, fibrosis y disminución en la fuerza y amplitud de movimientos. La calcificación o miositis osificante es una complicación indeseada, pudiendo igualmente alcanzarse una recuperación funcional normal, aunque sólo después de un período de evolución más prolongado. Puede ser tratada en forma conservadora o indicarse su extirpación quirúrgica. Se citan casos recurrentes en los que fue necesaria la amputación (Taylor, 1996).

- La **contractura** requiere de un tratamiento específico, que dependerá del músculo en particular que se encuentre afectado. Una vez instalada la fibrosis muscular y dada su condición de irreversible, sólo un procedimiento quirúrgico será capaz de mejorar la función del miembro, las características de la claudicación o el alivio del dolor en caso de existir. Esencialmente la transección del músculo es suficiente y efectiva para restaurar en forma inmediata los movimientos de las articulaciones que se hallaban limitadas en su función como consecuencia de la contractura. La tenectomía, miectomía y hasta la

ablación total del músculo involucrado, son los procedimientos básicos utilizados como parte del tratamiento en los distintos casos. Los músculos que con más frecuencia son asiento de esta patología están sujetos a pronósticos disímiles. La tenectomía del músculo infraespinoso o la miectomía del redondo menor, es altamente eficaz confiriéndole al miembro un andar muy similar al normal, siendo además de efecto duradero (Bruce *et al.*, 1997). Menos satisfactorio resulta el pronóstico de la contractura del músculo gracilis ya que a pesar de la recuperación favorable en lo inmediato a la cirugía, con el transcurso de los meses la claudicación puede volver a manifestarse (Lewis *et al.*, 1997). El pronóstico más desfavorable es para la contractura del músculo cuádriceps femoral. La liberación del músculo adherido al fémur permite lograr la fijación de la rodilla en un ángulo normal para poder soportar peso y recuperar funcionalmente al miembro afectado. Algunos tratamientos están dirigidos, en especial, a restablecer la movilidad de la rodilla (Wilkins *et al.*, 1993).

A pesar de ajustarse en tiempo y forma a los procedimientos establecidos, no siempre el resultado final es el esperado. Es menester subrayar la importancia de un diagnóstico precoz y la inmediata instauración de las medidas terapéuticas tendientes a resolver este tipo de lesiones musculares, que permitan alcanzar los mejores resultados. En los animales de deporte la decisión más crítica es determinar el momento a partir del cual se permite el retorno sin restricciones a la actividad específica, ya que es en esta instancia cuando se producen muchas de las recidivas. Cabe aquí hacer una mención sobre la prevención de estas lesiones. En tal sentido, revisando los posibles orígenes de estas afecciones encontramos que las mismas pueden ser consecuencia de un procedimiento o abordaje quirúrgico inadecuado. Debemos enfatizar los efectos siempre beneficiosos del manejo atraumático de los tejidos blandos durante la cirugía, en especial ortopédica o traumatológica, de los miembros. En este aspecto se tendrá presente que cuando en la vía de abordaje a un hueso o articulación se interpone un músculo, en orden de opciones para la elevación muscular se preferirá en primer lugar la osteotomía del área de inserción, seguida por la elevación subperióstica y por último la separación de las fibras en sentido longitudinal. Es totalmente desaconsejable la transección de las mismas y en caso que tal situación fuese inevitable se procederá a su reparación en la forma descrita para los casos de laceraciones (Piermattei, 1996).

Por otro lado, la prevención de lesiones en animales de deporte se puede lograr por medio de un adecuado asesoramiento a los propietarios. En tal sentido, considerando que el daño se produce por la elongación y no por el acortamiento o contracción muscular, los ejercicios de calentamiento actúan incrementando la extensibilidad y en consecuencia deben ser

recomendados entre otras medidas para reducir la probabilidad de ocurrencia de lesiones (Boccia y Brusa, 1999).

Métodos de evaluación de la musculatura

En el pasado, los músculos eran difíciles de estudiar por métodos de imagen hasta la llegada de la ecografía y la resonancia magnética (RMN), que han abierto un amplio campo, facilitando de forma clara la evaluación del sistema músculo esquelético (Soto y Salazar, 2008). La radiología simple y la Tomografía Computerizada (TC) tienen un papel limitado pero pueden ser útiles para descartar una miositis osificante (El-khoury *et al.*, 1996; Shellock y Fleckenstein, 1997).

Ecografía muscular

En los últimos años, esta técnica ha aumentado su popularidad como método diagnóstico en el campo de la medicina deportiva (Nofsinger y Konin, 2009). Se emplea tanto en patología muscular como en otras áreas, como lesión ligamentosa, tendinosa, fracturas por avulsión o estrés (Bianchi *et al.*, 2005; Bianchi *et al.*, 2006; Megliola *et al.*, 2006; Allen y Wilson, 2007).

El estudio ecográfico de los tejidos musculares es un método complementario, sencillo, no invasivo y sensible, que nos precisará el lugar exacto de la lesión y sus características. Se considera un método indispensable para el diagnóstico de las lesiones musculares, que permite situar la lesión y cuantificarla, además de realizar actitudes terapéuticas guiadas (Fitch *et al.*, 1997). Es el examen de elección para valorar la amplia gama de lesiones musculares (Campbell *et al.*, 2005).

El estudio del sistema músculo esquelético se va a realizar con transductores de alta frecuencia (7.5-15Mhz) que permiten obtener una máxima resolución de la arquitectura muscular y tendinosa (Bianchi *et al.*, 2005; Allen y Wilson, 2007).

Nuevas tecnologías como las ecografías en 3D, permiten obtener reconstrucciones panorámicas, mientras el Doppler posee mayor sensibilidad en los hallazgos vasculares (Tumezei *et al.*, 2010).

Las fibras musculares son hipoecogénicas (más oscuras) respecto al epimisio y las fascias por las que se encuentran delimitadas, estructuras que por el contrario son ecogénicas (brillantes). Es posible el estudio de la presencia de roturas totales, parciales u otras anomalías de los vientres musculares al visualizar de manera dinámica la contracción y relajación de las fibras. A continuación se detallan las características ecográficas detectables en las diferentes lesiones musculares (Gómez, 1991; Mattoon y Nyland, 1995):

- **Distensión:** zona hipoecogénica correspondiente al edema de las miofibrillas y pequeñas imágenes anecogénicas que corresponden a microhematomas. Los extremos del músculo son de aspecto normal.
- **Contusión:** zona localizada con hematoma (anecogénica), laceraciones o edema intenso.
- **Desgarro** (fascicular): entre aponeurosis delgadas se aprecia un hematoma más o menos importante, pudiendo observarse “el badajo de campana” que se manifiesta, en el corte longitudinal, por una imagen hiperecogénica alargada. En un corte transversal de la misma lesión, se visualiza una zona anecogénica (hematoma) y en el centro, la imagen hiperecogénica redondeada que pertenece al extremo roto.
- **Ruptura total:** está involucrado todo el grosor del músculo, con retracción importante de los extremos. Se visualizan imágenes en “badajo de campana” y gran hematoma.
- **Fibrosis:** se ven diferentes áreas de hiperecogenicidad, en general heterogéneas, rodeadas de tejido sano, pudiendo seguir la línea del músculo o no (oblicuas, perpendiculares, etc.), que no cambian de tamaño al contracturarse.

Tabla 1: Ventajas e inconvenientes de la ecografía muscular (Balius, 2011)

Ventajas	Inconvenientes
Prueba no invasiva	Si la lesión es leve no se detecta en las primeras horas
Bajo coste	Explorador dependiente (aprendizaje)
Estática/Dinámica	Necesarias más de una
Comparativa	

La curación de una patología muscular es un proceso que depende de la magnitud de la lesión y por lo general tarda desde 3 hasta 16 semanas. En la curación muscular participa la capacidad de regeneración muscular y la cicatrización fibrosa. Tras la evaluación inicial, el estudio ecográfico tiene una importante función en la monitorización del proceso de curación de cada patología (Lefebure y Pourcelot, 1991). La cavidad inicial ocupada por el hematoma comienza a rellenarse paulatinamente desde su periferia por la formación de tejido de granulación que puede identificarse en las imágenes por la presencia de focos ecogénicos confluentes que terminan por ocuparla completamente (Muñoz, 2002).

Tabla 2: Clasificación ecográfica de lesiones musculares (modificada de Lefebure y Pourcelot, 1991).

Grado	Características	Patología
1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La lesión no se observa por ecografía ▪ Pequeñas imágenes hipocogénicas o hiperecogénicas ▪ Pequeños hematomas de 2mm 	Contracturas, calambres, elongaciones, contusiones benignas
2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Colecciones hemáticas de volumen moderado (<3 cm) ▪ Rotura de fibras de número limitado 	Tirones, desgarros musculares, contusiones de intensidad media
3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hematomas voluminosos ▪ Extensas superficies de fibras musculares rotas 	Traumatismos musculares graves con desgarró, rotura, desinserción

El tratamiento pretende estimular la regeneración para que compita con la cicatrización que invariablemente dará como resultado un músculo de menor volumen y con importante pérdida de la funcionalidad, porque la cicatriz no es elástica y además predispone a nuevas lesiones (Muñoz, 2002; Verdugo y Antonio, 2004; Campbell *et al.*, 2005).

La ecografía seriada permite establecer con precisión la velocidad y el estadio de la curación, con lo que disminuye de manera significativa la posibilidad de una nueva lesión (Campbell *et al.*, 2005).

Tomografía axial computerizada

Este método de diagnóstico por imagen permite valorar patología ósea y lesiones de cabeza, columna, además de valorar el sistema muscular (Buckwalter, 2009).

Entre sus ventajas cabe destacar, que es un acto clínico rápido y que permite la reconstrucción de imágenes disminuyendo artefactos producidos por prótesis metálicas (Tumezei *et al.*, 2010).

A su vez, con la llegada del TC multidetector en 1998, se consiguen imágenes del sistema musculoesquelético en todos los planos del espacio, con mejor contraste de los tejidos y en menor tiempo de escaneo (Buckwalter, 2009).

Las intervenciones guiadas por TC son útiles en áreas corporales profundas, como la articulación sacroilíaca, nervio pudendo y el tendón del iliopsoas, en las cuales es difícil acceder a través de la ecografía (Anderson y Read, 2008).

Resonancia Magnética

En medicina deportiva esta técnica permite valorar músculos, tendones, ligamentos, cartílago, médula ósea y placas de crecimiento (Tumezei *et al.*, 2010).

La resonancia magnética (RMN) es diagnóstica en los casos en los que la ecografía no puede evaluar la lesión por su localización en profundidad o por las características del tejido; es muy sensible en las lesiones musculares en las que hay un aumento de líquido (Rybak y Torriani, 2003). Esta prueba se reserva para aquellos casos en los que existe una discrepancia entre los hallazgos clínicos y ecográficos (Jarvinen *et al.*, 2000).

La RMN tampoco utiliza radiaciones ionizantes, se basa en la creación de un campo magnético y aporta como ventajas frente a la ecografía una mejor visión anatómica de las lesiones, así como sus relaciones con tendones y ligamentos, siendo éstos últimos difícilmente valorables por ultrasonidos. Como desventajas debemos hablar de que se trata de un método menos asequible al necesitar una infraestructura mucho más sofisticada y cara, siendo los estudios de más larga duración y por todo lo mencionado anteriormente de mayor coste económico (Jiménez, 2006).

Factores de crecimiento

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 (Vega, 2000).

Estos factores de crecimiento proporcionan las señales iniciales para la activación de las células integrantes de los tejidos que los rodean. Como respuesta a las señales que proporcionan estas moléculas, las células locales y las infiltradas sufren cambios en la proliferación, diferenciación y síntesis de proteínas con diversas funciones biológicas. En conjunto, todos estos fenómenos, definen el proceso conocido como activación celular (Reed *et al.*, 2000).

Estas sustancias al liberarse de las plaquetas, hacen posible la multiplicación y el desarrollo de las células endoteliales vasculares, de las células musculares lisas y de los fibroblastos. Además ejercen múltiples efectos sobre los fenómenos de remodelación celular (Barnes *et al.*, 1999;

Anitua, 2001; Marx y 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; Klinger, 1997; Ouyang y Qiao, 2006).

En cuanto al mecanismo de acción, los factores de crecimiento pueden tener efecto sobre las mismas células que los sintetizan (factores autocrinos) o sobre células de una clase distinta dentro del tejido (factores paracrinos) (Grageda *et al.*, 2005).

Estas proteínas afectan al comportamiento celular uniéndose a receptores específicos situados en las membranas de las células. No todos los fenotipos celulares tienen los mismos receptores, por tanto, el efecto de los factores de crecimiento no será el mismo en todos los tejidos ni en todas las situaciones (Stone, 1998).

Cabe destacar el hecho de que los factores de crecimiento pueden potenciarse o inhibirse entre ellos mismos. Un ejemplo, es la actuación del TGF- β 1, el IGF-I y el PDGF sobre la síntesis de proteoglicanos, quienes individualmente incrementan su síntesis en más de un 100%, pero al actuar en diferentes combinaciones, los efectos son aditivos y estimulan de forma sinérgica la síntesis de dichos compuestos (Chopra y Anastassiades, 1998).

Los factores de crecimiento fueron clasificados en un principio por Canalis en 1988. De esta forma, encontramos al factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento derivado del hueso (BDGF), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) y el factor derivado de las plaquetas (PDGF) que son sintetizados por células esqueléticas. El factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF) han sido aislados de la matriz ósea. Del mismo modo el IGF-I y el bFGF son sintetizados por tejidos cartilagosos, como las interleukinas tipo I (IL-I). El factor de necrosis tumoral (TNF-a), los factores de crecimiento derivados de los macrófagos y el PDGF son sintetizados por células sanguíneas. Estudios posteriores, han demostrado que tanto estos factores y otros son sintetizados por diversos tipos celulares (Grageda, 2004).

Estos factores, junto con otros, que describiremos a continuación, son piezas clave en la reparación de determinadas patologías como, fracturas, lesiones musculares y tendinosas, cirugía maxilofacial, cirugía plástica, cicatrización de heridas y úlceras, cirugía ocular, etc. (Cullinane *et al.*, 2002; Tarroni *et al.*, 2002; Valbonesi *et al.*, 2002; Molloy *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004; Southwood *et al.*, 2004).

Factor de crecimiento insulínico (IGF)

El IGF existe en dos isoformas, I y II. En la mayoría de las especies animales, el IGF-I 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).

La síntesis de IGF se realiza mayoritariamente en el hígado, de donde se libera al torrente sanguíneo, y es capturado por las plaquetas mediante un mecanismo de endocitosis, para posteriormente ser almacenado por los gránulos alfa (Duan, 2002).

In vitro, ambas isoformas pueden ser sintetizadas por células osteoblásticas, teniendo un efecto positivo mínimo sobre su proliferación. En cambio, sí que mejoran la funcionalidad de los osteoblastos al incrementar la expresión de colágeno tipo I, al igual que el ratio de aposición de matriz ósea, y consecuentemente aumenta la producción de nuevo hueso (Mohan y Baylink, 1991).

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. La molécula de IGF-I tiene un 48% de homología estructural con la proinsulina y ejerce su acción en las células al unirse a receptores específicos en la superficie de éstas y actuando como un potente mitógeno de la proliferación celular (Shavlakadze *et al.*, 2005).

El IGF-I induce la proliferación, diferenciación e hipertrofia de múltiples líneas celulares, en particular, del músculo esquelético (Philippou *et al.*, 2007).

La farmacocinética de IGF-I es complicada debido a la presencia de una familia de proteínas altamente específicas llamadas proteínas de unión (IGFBPs), las cuales coordinan y regulan las funciones biológicas del IGF-I. Aproximadamente el 5% del IGF-I circula libre en suero. La mayor parte del IGF-I en suero (95%) circula ligado a estas proteínas de unión de IGF específicas, de las que se conocen 6 clases (IGFBP 1-6), siendo la principal proteína de unión del IGF-I, la BP3. Esta proteína forma un complejo ternario de alto peso molecular (140.000 Daltons) con IGF-I, la IGFBP-3, y una subunidad ácido-lábil (ALS) (Baxter *et al.*, 1989; Rochler, 1993; Holt y Sonksen, 2008). La vida media del IGF-I libre es de escasos minutos, mientras que la vida media del complejo IGF-I/IGFBP-3 es de 12-15 horas (Guler *et al.*, 1989). Cuando se administra IGF-I vía subcutánea, la máxima concentración se alcanza a las 7 horas y la vida media es de unas 20 horas (Grahnen *et al.*, 1993).

Las concentraciones en plasma/suero de IGF-I varían según la especie, la edad, el sexo, el aporte nutricional, tamaño corporal, ejercicio y secreción de la hormona de crecimiento del paciente. Sin embargo, en humana, se han descrito valores de 300 ng/ml (rango 94-506 ng/ml) en adultos de 17 a 20 años de edad y de 250 ng/ml (rango 117-358 ng/ml) en personas de 21 a 30 años (Creaney y Hamilton, 2008).

Se ha descrito que el perfil de liberación de GH en seres humanos difiere con el sexo (las mujeres secretan 2 veces más GH por cada pulso que los hombres) y esta circunstancia repercute en las concentraciones circulantes de IGF-I (Giustina y Veldhuis, 1998; Veldhuis *et al.*, 2005).

Los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales. De este modo la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben (Hill *et al.*, 1995).

El rango de referencia de IGF-I en perros adultos normales es mayor de 200 ng/ml, mientras que en los animales de hasta un año de edad es superior a 500 ng/ml (Schaer, 2006).

Elevadas concentraciones de este factor están asociadas a resultados positivos en la salud, por ejemplo, buen estado físico, óptima densidad ósea y neurocognición (Adams, 2002; Nindl *et al.*, 2007). En estudios con animales se ha demostrado que el IGF-I mejora la cicatrización de lesiones musculares (Menetry *et al.*, 2000), siendo necesario para la diferenciación y proliferación mioblástica (Engert 1996, Damon 1998).

Los principales tejidos diana afectados por el IGF-I, en combinación con la hormona de crecimiento, son: músculos, cartílagos, huesos, nervios, piel, hígado, riñones y pulmones. Este factor produce numerosos efectos estimulantes del crecimiento, entre los que destacan efectos mitogénicos y la promoción de la sulfatación del cartílago. Asimismo, actúa como mediador de las acciones estimulantes del crecimiento en el esqueleto y otros órganos desencadenados por la hormona de crecimiento (Trejo *et al.*, 2007).

Los efectos biológicos de IGF-I pueden ser divididos en 2 categorías (Langford y Miell, 1993):

- Efectos metabólicos a corto plazo: hipoglicemia y aumento de filtración glomerular.
- Efectos mitogénicos a largo plazo:
 - Aumenta el transporte de aminoácidos hacia el interior de las células.
 - Incrementa la síntesis de proteínas.
 - Aumenta la síntesis de ARN.
 - Coopera con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) para aumentar la capacidad de las células en la síntesis de ADN.
 - Disminuye la degradación de las proteínas.
 - Aumenta la lipogénesis y disminuye la lipólisis.

- Incrementa la proliferación y la diferenciación celular. El IGF-I aumenta el metabolismo celular, pero su mayor impacto es sobre el crecimiento; se cree que es debido al incremento en el número de células (hiperplasia), ya que: aumenta la proliferación de condrocitos, mioblastos y fibroblastos.

Tras su administración, la IGF-I, aumenta el crecimiento óseo, la masa muscular, el peso de las vísceras (bazo, corazón, hígado, riñón, testículos), aumenta el peso corporal, no produce 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 (D'Ercole, 1991).

Una de las características de los factores de crecimiento es su corta vida media, lo que le confiere mecanismos de acción circunscritos al sitio en el que fue liberado, excepto por la acción del IGF-I y HGF que tienen efectos sistémicos. En el caso del IGF-IEa, es liberada por el hígado sistemáticamente bajo el control de la hipófisis, mientras que la isoforma IGF-IEc es liberada por el músculo cuando este es ejercitado (Matheny y Nindl, 2011).

Otros factores de crecimiento

Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)

Es un polipéptido de naturaleza catiónica que permanece estable hasta alcanzar temperaturas próximas a los 100°C. Su punto isoeléctrico es muy básico (10,2)²⁵ y su peso molecular es de 30.000 Daltons (Deuel *et al.*, 1981; Hauschka *et al.*, 1986; Ross, 1986).

Este factor fue aislado por primera vez a partir de plaquetas durante la degranulación, de ahí su nombre (Antoniades *et al.*, 1975; Ross y Vogel, 1978). Hoy en día, se sabe que es producto de un amplio rango de tipos celulares, dentro de los cuales se incluyen macrófagos, células endoteliales, monocitos, fibroblastos, músculo, hueso/cartílago y células del tejido conectivo (Sitaras *et al.*, 1987; Rappolee *et al.*, 1988; Antoniades *et al.*, 1991; Raines, 1993).

La forma biológicamente activa de PDGF es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro, llamadas A y B. Puede estar presente como homodímero o como heterodímero y dependiendo del tipo de dímero formado muestra actividad diferencial (Heldin *et al.*, 2002; Grageda *et al.*, 2005).

PDGF es el producto de cuatro diferentes genes que son ensamblados en cinco isoformas distintas, conocidas como: AA, AB, BB, CC y DD, siendo las cadenas C y D las más recientemente identificadas. PDGF-C es también llamada "Spinal cord-derived growth factor" (SCDGF/PDGF-C/fallotein) (Ding *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Tsai *et al.*, 2000) y a PDGF-D se

le conoce también como SCDEF-B (Bergsten *et al.*, 2001; Hamada *et al.*, 2001; LaRoche *et al.*, 2001; Heldin *et al.*, 2002; Li y Erikson, 2003).

Como se ha citado anteriormente, las isoformas de este factor de crecimiento más conocidas son el producto de asociaciones de las cadenas A y B con aproximadamente 100 residuos de aminoácidos cada una, de los cuales el 60% son conservados entre sí. Estas isoformas ejercen su acción sobre las células diana mediante la unión a 2 receptores tirosina kinasa, el receptor α , que se une sólo a cadenas A y el receptor β , que se une con alta especificidad a las cadenas A y B (Heldin *et al.*, 2002).

Se sabe que las células musculares lisas (CML) y los fibroblastos expresan ambos tipos de receptor, α y β .

- PDGF-AA:
 - Sobre CML: inicia hipertrofia celular (síntesis proteica aumentada) (Inui *et al.*, 1994).
 - Sobre fibroblastos: inhibe la quimiotaxis (Siegbahn *et al.*, 1990).
 - Sobre neuronas dopaminérgicas: promueve el desarrollo de la fibra neuronal embrionaria (Giacobini *et al.*, 1993).
 - Dirige la formación de las ramificaciones que crecen a partir de los túbulos respiratorios (Souza *et al.*, 1995).

- PDGF-BB
 - Sobre CML: induce mitosis (Inui *et al.*, 1994).
 - Sobre los fibroblastos: inicia quimiotaxis, (Siegbahn *et al.*, 1990).
 - Sobre las neuronas dopaminérgicas: sirve sólo como un factor de mantenimiento de la supervivencia (Giacobini *et al.*, 1993).
 - Dentro del desarrollo pulmonar, regula el crecimiento y número de células epiteliales del tubo respiratorio (Souza *et al.*, 1995).

La interpretación de cualquier estudio experimental depende del tipo celular empleado y de la isoforma de PDGF aplicada. En general se puede decir que las isoformas de PDGF son mitógenos potentes para las células del tejido conectivo, incluyendo fibroblastos cutáneos, células arteriales del músculo liso, condrocitos y algunas células epiteliales y endoteliales (Brewitt y Clark, 1988; Bornfeldt *et al.*, 1994; Guerne *et al.*, 1994; Lubinis *et al.*, 1994).

Además de su actividad mitogénica PDGF es quimiotáctico para fibroblastos y células musculares lisas (Siegbahn *et al.*, 1990; Bornfeld *et al.*, 1994). Además el PDGF derivado de macrófagos actúa como un agente mitogénico y quimiotáctico para células musculares lisas y contribuye al engrosamiento de las paredes arteriales (Ross *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2005).

También se ha demostrado que este factor derivado de las plaquetas 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 (Giacobini *et al.*, 1993; Gard *et al.*, 1995; Erlandsson *et al.*, 2001; Wolswijk, 2002; Milenkovic *et al.*, 2003).

Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

Los FGFs fueron aislados por primera vez en los años 70 a partir de extractos de cerebro bovino, basándose en su carácter mitogénico y angiogénico. Posteriores estudios establecieron que los FGFs constituyen una familia de veinte proteínas monoméricas estructuralmente relacionadas (peso molecular entre 16.000 y 18.000), con diversas actividades y producidas 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 y Rifkin 1991).

Es un polipéptido relacionado estructuralmente con los mitógenos “heparin binding”. Sus efectos biológicos son mediados por receptores de superficie de alta afinidad con actividad tirosina-kinasa (Huges, 1997).

La familia de los factores de crecimiento ligados a heparina incluye 9 proteínas, de FGF-1 o aFGF (ácido) a FGF-9. La FGF-2 o bFGF (básico), presente en plaquetas, contribuye a la angiogénesis en el tejido granulado estimulando la infiltración y proliferación de células endoteliales (Bennett *et al.*, 2003; Grageda, 2004).

La forma básica del FGF (bFGF o FGF-2) 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 matriz extracelular (MEC), receptores celulares, proteasas de MEC e inhibidores de las mismas. 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 ésta ha sido empleado en las heridas de la práctica quirúrgica cotidiana, para la reparación ósea, así como 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).

A pesar de su gran potencia angiogénica y mitogénica, el FGF-2 se degrada rápidamente cuando se inyecta o es ingerido, llegándose a perder hasta un 99% de su actividad mitogénica en poco tiempo (Edelman *et al.*, 1991)

Puesto que el FGF-2 es un agente pleiotrópico, es decir, que estimula, inhibe y modula procesos celulares de manera tiempo- y dosis-dependiente, es esencial controlar su liberación en el lugar deseado y su biodisponibilidad mientras se necesite de su acción como agente terapéutico. En este sentido, un grupo de investigación del *Departamento de Biología Celular y Genética* de la Universidad de Málaga, produjo un rhFGF-2, cuya novedad reside en la incorporación de una secuencia aminoacídica auxiliar (correspondiente al dominio molecular modificado del factor de von Willebrand), de alta afinidad de unión específica al colágeno tipo I, que confiere al factor propiedades únicas y exclusivas. De esta forma, este factor de crecimiento, llamado rhFGF-2-F2, puede ser almacenado por tiempos prolongados y ser dirigido a dianas celulares-tisulares específicas donde se precise su actuación, controlando su liberación y preservando su estabilidad o vida media. De esta manera, se acentúa su potencial como agente terapéutico en la cicatrización de heridas y en otros procesos de reparación tisular (Andrades *et al.*, 2001).

El tratamiento de heridas cutáneas incisivas por aplicación ectópica de rhFGF-2-F2 en animales diabéticos acelera significativamente la cicatrización de las mismas, cuando se compara con la misma aplicación del factor comercial. La especial utilidad de este factor se ve reforzada aún más cuando se aplica ectópicamente mezclado con un gel de colágeno tipo I, provocando una mayor velocidad en la reparación de las heridas, reduciendo el tiempo de cicatrización en animales diabéticos, hasta llevarlo a valores comparables a los animales normales. Según los estudios realizados *in vitro*, podemos pensar que la secuencia aminoacídica de unión específica al colágeno estaría incorporando al rhFGF-2-F2 la capacidad de unirse específicamente al colágeno tipo I, que actuaría de *carrier*. Una vez que este apósito (factor + colágeno) se coloca en la herida fresca, la presencia de enzimas del tipo colagenasa, cuya aparición en los primeros días de cicatrización ha sido demostrada, ocasionaría una lenta liberación del rhFGF-2-F2 desde la matriz de colágeno a la que está unido hacia el componente celular implicado en la cicatrización (células responsables de la inflamación, células endoteliales, fibroblastos encargados de sintetizar más matriz de colágeno). En este caso, el colágeno tipo I ejercería como modulador fisiológico en la liberación de

la proteína hacia las células diana, consiguiéndose así una mayor y mejor disponibilidad del factor por dichas células. El hecho de que la máxima tasa de cicatrización, tanto en animales normales como diabéticos, se consiga cuando el rhFGF-2-F2 se aplica combinado con colágeno tipo I, refuerza la idea de que la secuencia polipeptídica introducida está incorporando a la proteína de fusión resultante una mayor y/o más duradera actividad biológica. Este hecho también ha sido discutido para un rhTGF- β 1 producido por los mismos autores con similares características, y empleado con éxito en la inducción condro-osteogénica (Gordon *et al.*, 1997; Andrades *et al.*, 1999). Las posibilidades que ofrece el uso de factores de crecimiento modificados como agentes terapéuticos, suponen un avance primordial en el desarrollo de procedimientos alternativos para mejorar la capacidad de reparación tisular (Andrades *et al.*, 2001).

Factor de crecimiento transformante (TGF)

Existen dos tipos de TGF, α y β . Este último es una sustancia polipeptídica considerada como miembro del grupo de las citoquinas, con una estructura dimerica formada por 2 subunidades de 112 aminoácidos unidas por puentes disulfuro, con un peso molecular total de 25000 daltons (Assoian *et al.*, 1986; Centrella *et al.*, 1986). Su nombre se debe a su identificación por primera vez en tejidos transformados (sarcomas) (Burgess, 1989).

La familia TGF- β consta de 35 miembros que incluyen, además de los TGF- β s, activinas y BMPs (Proteínas Morfogenéticas Óseas) entre otras. Todos ellos juegan un papel importante en el desarrollo y homeostasis de varios tejidos (Caestecker, 2004).

El TGF- β se sintetiza en varios tejidos, pero el hueso y las plaquetas son el origen más importante de esta molécula (Assoian *et al.*, 1986).

En mamíferos existen tres isotipos, llamados β 1, β 2 y β 3. Todas las isoformas presentan un grado de homología del 84-92%. La expresión de dichas isoformas se regula de forma diferente a nivel transcripcional debido a las diferentes secuencias promotoras (Roberts, 1998; Govinden y Bhoola, 2003; Jobling *et al.*, 2004).

Una vez sintetizado, el TGF- β es secretado al exterior como un complejo inactivo que consta de un dímero TGF- β , su pro péptido LAP (“latency associated peptide”) y LTBP (“latent TGF- β binding proteins”) (Lawrence, 2001; Todorovic *et al.*, 2005). Por lo tanto, el TGF- β secretado necesita ser activado antes de poder unirse al receptor. Este proceso se llama “latent TGF- β activation” o “TGF- β formation” (Gleizes *et al.*, 1997).

Este estado inactivo o de “latencia” es un mecanismo de control de la actividad de los factores de crecimiento, que permite regular su biodisponibilidad y limitar su difusión desde las células

que lo secretan, de este modo se logra regular las acciones autocrinas y paracrinas del TGF- β (Arrick *et al.*, 1992).

Este factor de crecimiento estimula la replicación de células precursoras de la línea de los osteoblastos y además tiene efecto estimulador directo sobre la síntesis de diversos tejidos, destacando notablemente su efecto sobre el tejido óseo y cartilaginoso (Pelletier y Pelletier, 1994).

El TGF- β interviene modulando la síntesis de matriz ósea por varios mecanismos, incluyendo el incremento en el número de células capaces de expresar el genotipo de los osteoblastos, así como actuar directamente sobre los osteoblastos diferenciados. También es capaz de disminuir la resorción ósea al inducir la apoptosis de los osteoclastos (Grageda *et al.*, 2005) y al disminuir su formación (Bonewald y Mundy, 1990; Steenfos, 1994).

Se ha observado que una administración exógena de TGF- β en fracturas experimentales, resulta en un incremento del tamaño del callo óseo, así como mejoras en parámetros biomecánicos (Lind *et al.*, 1993).

En definitiva, el TGF- β está involucrado directa o indirectamente en procesos como la cicatrización, angiogénesis, hematopoyesis, desarrollo de las glándulas mamarias, metabolismo óseo y formación de piel, así como en múltiples patologías como enfermedades inflamatorias y fibróticas y el desarrollo de tumores (Roberts y Sporn, 1990; Bierie y Moses, 2006).

Otro mecanismo de acción del TGF- β 1 en el campo de la traumatología, es su función sobre el tejido cartilaginoso, aumentando la síntesis de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina, el colágeno tipo I y el biglicano, y disminuyendo las actividades proteolíticas responsables del catabolismo de esta matriz (Gleizes *et al.*, 1997).

De esta manera, 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).

Factor de crecimiento epitelial (EGF)

El EGF fue descrito por primera vez por Cohen (1962) a partir de la glándula submaxilar del ratón, su peso molecular es de 6 kDa y contiene 53 aminoácidos. Se conoce también con el nombre de urogastrona y está disponible como EGF recombinante (Cohen, 1962; Savage *et al.*, 1972).

Esta proteína de cadena simple también se ha aislado en glándulas salivares, orina y lágrimas (Cohens., 1975), en plaquetas, fluido amniótico y cerebroespinal (Arnás *et al.*, 2002).

Las células diana del EGF las constituyen aquellas derivadas del ectodermo, tales como córnea, epidermis, hígado, páncreas, etc. Su efecto biológico consiste en la modulación de la proliferación celular por medio de la activación del receptor tirosina kinasa del EGF y la proteína kinasa C (Promega, 1991).

Su acción principal es su efecto estimulador de la cicatrización (Franklin y Blynch, 1979; Borwn, 1986), que se debe a su acción mitogénica sobre células epiteliales y fibroblastos (Carpenter y Cohen, 1981). Teniendo también importantes efectos sobre las células musculares lisas y una participación activa en la angiogénesis (Playford y Macdonald, 1997).

El EGF tiene efecto promisorio en la curación de heridas corneales, donde los receptores a este polipéptido son expresados por muchos tipos de células, tales 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 limbal, en el intervalo de 12 a 24 horas después de las heridas (Kitazawa, 1990; Zanati *et al.*, 1997).

En el campo de la ortopedia, aunque aumenta la proliferación de osteoblastos, inhibe la síntesis de matriz osteoide (Arnás *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). Además en los condrocitos de la placa de crecimiento, es posible que actúe potenciando otros factores como el IGF-I, mientras que sus efectos son contrarrestados por otros como el TGF- β (Benassar y Trippel, 1997).

Factor de crecimiento neurotrófico (NGF)

Las neurotrofinas constituyen una familia de factores de crecimiento que ejercen sus funciones principalmente sobre algunas poblaciones específicas de neuronas (Lewin y Barde, 1996; Reichardt y Farinás, 1997) y posiblemente sobre algunos tipos de tejidos no nerviosos (Shibayama y Koizumi, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996). Las neurotrofinas actúan por medio de de dos tipos de receptores, los de alta afinidad y los de baja afinidad.

Estudios realizados sobre receptores de baja afinidad (p75LNGFR) en cartílago articular, con animales deficientes en p75LNGFR han mostrado una reducción en torno al 20% del espesor del cartílago articular y disminución del número de mitosis en los condrocitos. Todo lo anterior sugiere que, por un mecanismo aún desconocido y sin que se pueda asegurar cual es su ligando, la

p75LNGFR está implicada en el desarrollo y maduración de los condrocitos y en la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (Vega *et al.*, 2000).

También se ha demostrado que el NGF produce un aumento tanto de la síntesis de DNA como de glicosaminoglicanos en el cartílago en desarrollo (Kawamura y Urist, 1998).

Factor de crecimiento hepatocítico (HGF)

El factor de crecimiento de los hepatocitos o factor disperso ("scatter factor"), se describió inicialmente en 1992 como mitógeno para los hepatocitos. Se trata de una proteína multifuncional presente en los gránulos alfa plaquetarios, que posee múltiples funciones biológicas en una gran variedad de células, que incluyen actividades mitogénicas, morfogénicas, antiapoptóticas e incremento de la motilidad celular. De esta manera, está implicado en procesos fisiológicos, entre ellos embriogénesis y desarrollo hepático, y en la regeneración y carcinogénesis hepáticas (Segura *et al.*, 2004).

Este factor se secreta como una proteína inactiva de cadena sencilla, la cual sufre un corte proteolítico para convertirse en la forma activa de doble cadena. El activador del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGFA) es el principal activador de HGF en la mayoría de sus funciones. HGF ejerce sus efectos biológicos a través de su receptor transmembrana (c-Met) con actividad de de tirosina kinasa (Fragoso, 1998).

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

En un estudio de Skromne-Kadlubik e Ibarra (2010), se probó el uso de HGF en pacientes con "hígado senil". A la mitad de los pacientes con esta patología (n=6) se les aplicó una dosis mensual de HGF intravenosa durante 6 meses y se les practicó determinaciones del flujo sanguíneo hepático antes y después del tratamiento. El estudio reveló un retraso en la senescencia del órgano e incluso mejoría de la función hepática en los individuos que recibieron HGF.

Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Se aisló en los años 70 identificándose como mediador de la permeabilidad vascular. Actúa sobre receptores tirosina kinasa situados en las células endoteliales, teniendo un efecto mitógeno y quimiotáctico sobre estas (Southwood *et al.*, 2004).

El VEGF activo está compuesto 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 kinasa en la superficie celular, con los dominios que se extienden a partir del núcleo del VEGF (Ito y Claesson-Welsh, 1999; Goodsell, 2003).

Actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las células endoteliales (ECs) vasculares y de la formación de vasos sanguíneos (Carmeliet y Collen, 1999; Ferrara, 2002).

Es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las ECs; es miembro de la súper familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C y -D, así como el factor de crecimiento de placenta (PlGF) (Veikkola *et al.*, 2000; Shibuya, 2001; Dvorak, 2005).

El VEGF responde a varios estímulos tales como hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- α y - β , KGF o factor de crecimiento derivado de queratinocitos, IGF-1 o factor de crecimiento insulínico tipo 1, FGF y PDGF), a oncogenes activados (por ejemplo Ras) así como a distintas citosinas (IL-1- α y IL-6), p53 mutado, estrógeno y óxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos se aumenta la expresión del VEGF (Shibuya, 2001; Partanen y Paavonen, 2001) resultando en la inducción de proliferación de ECs derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos (Ferrara *et al.*, 2003) así como en la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales (Matsumoto y Claesson-Welsh, 2001). Además, el VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis (D'Arcangelo *et al.*, 2000), incrementa la conductividad hidraulica de microvasos aislados y vasodilatación, como resultado del NO derivado de ECs (Ferrara *et al.*, 2003), promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis (Partanen y Paavonen, 2001) y en la linfangiogénesis (Nagy *et al.*, 2002). Cuando su regulación es normal, el VEGF contribuye a la remodelación vascular durante el ciclo ovárico y la implantación del embrión, a la cicatrización y reparación, mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis, además de participar en distintas condiciones como la psoriasis, artritis reumatoide, retinopatía diabética y diabetes mellitus (Partanen y Paavonen, 2001; Ferrara, 2002).

Usos actuales de los factores de crecimiento aislados

Los factores de crecimiento son primeros mensajeros que se unen a receptores glicoproteicos de membrana para iniciar la transducción de una señal. Los FC alcanzan acciones fisiológicas a

menor concentración que otros mensajeros como las hormonas, además poseen una variedad mayor de células blanco que estas (Barbeito y Laube, 2005).

Las proteínas contenidas en los gránulos alfa de las plaquetas poseen una fuerte influencia sobre los fenómenos reparativos. Las plaquetas comienzan a secretar activamente estas sustancias 10 minutos después de la formación del coágulo, liberándose más del 95% de los factores de crecimiento pre sintetizados en el lapso de 1 hora. Tras esta liberación proteica masiva, las plaquetas sintetizan y secretan proteínas de forma adicional durante 5 a 10 días más. Cuando la influencia de las plaquetas comienza a remitir, los macrófagos que han llegado al foco, merced al crecimiento vascular promovido por las plaquetas, asumen la regulación de la reparación tisular mediante la secreción de sus propios factores (Eppley *et al.*, 2006). Las proteínas secretadas por las plaquetas ejercen múltiples acciones sobre diferentes aspectos de la reparación tisular. Así, PDGF es quimiotáctico para macrófagos, PDGF, TGF- β e IGF. También ejercen una acción quimiotáctica y mitogénica sobre células progenitoras y osteoblastos, así como un efecto angiogénico e inductor de la matriz ósea y la síntesis de colágeno. Por su parte, TGF- β y PDGF coadyuvan en la mineralización ósea. Algunas de las proteínas liberadas por las plaquetas se encuentran ausentes en heridas crónicas que no curan adecuadamente, lo cual viene a aportar una evidencia más del papel de estas sustancias en la reparación tisular (Echevarría *et al.*, 2007).

Los FC se asocian con frecuencia a mecanismos de acción conjuntos. Algunos de ellos poseen funciones específicas, es decir, que pueden utilizarse como agentes terapéuticos de forma aislada. Por ejemplo IGF, PDGF y TGF- β poseen formas latentes que se unen a algunas proteínas séricas y a los gránulos plaquetarios. Otros factores como los FGFs interaccionan con componentes de la matriz, lo que favorece la creación de un microambiente especial para su acción (Massagué, 1990; Dickson y Lippman, 1995; Massagué, 1998).

Estudios recientes abalan la eficacia de la aplicación aislada de determinados factores de crecimiento. Así Witte *et al.* (2011) demostraron que el tratamiento mediante inyecciones intralesionales (de 4 a 5) de IGF-I en la tendinitis del tendón flexor digital superficial en 40 caballos de carreras, mejora la severidad de la lesión, valorado por imágenes ecográficas. En humana, Nakagawa *et al.* (2010) demostraron que el uso tópico de IGF-I en forma de hidrogel puede ser eficaz para la recuperación de la audición en pacientes con pérdida de la misma de naturaleza neurosensorial súbita resistente a los glucocorticoides sistémicos. En un estudio experimental, Chang *et al.* (2010) comprobaron como la inyección intramuscular de IGF-I en ratas con isquemia cerebral mejora la función motora e impide la atrofia muscular. Debido a que IGF-I aislada no supone una terapia práctica para la reparación del cartílago por su escasa vida media, se ha utilizado junto a heparina ("heparin-binding": HB), creando el complejo HB-IGF-I, que estimula la

síntesis de proteoglicanos, aplicándolo en inyección intraarticular de rodillas de ratas. Este complejo se mantiene en el cartílago, por lo que sería práctico para el tratamiento de las lesiones condrales (Miller *et al.*, 2010).

El PDGF estimula los osteoblastos y la actividad de células osteoprogenitoras. Bordei (2011) comparó la resolución mediante implantes bioabsorbibles de ácido poliláctico de una fractura tibial cerrada en ratas. En el grupo control sólo aplicaban el implante y en el segundo grupo, además del implante utilizaban PDGF. Las radiografías mostraron mayor consolidación del callo óseo en este último grupo. Este factor de crecimiento también se ha utilizado junto a otras sustancias, como el Fosfato β -tricálcico (β -TCP), en un estudio experimental en ovejas. En este se valoró la resolución de defectos circunferenciales creados en el ilion, mediante 3 tratamientos diferentes, uno relleno de rhPDGF-BB (factor de crecimiento derivado de las plaquetas recombinante humano purificado)/ β -TCP, otro de β -TCP y el tercero con coágulo sanguíneo. La mayor tasa de formación de hueso lo mostró el implante relleno de rhPDGF-BB/ β -TCP después de 2 y 4 semanas (Choo *et al.*, 2011).

En un estudio in vivo, en humana, sobre la terapia de privación androgénica (ADT) en el cáncer de próstata, sobre la expresión de TGF- β 1 y su receptor T β -RII, los resultados sugieren que la privación de andrógenos a través de ADT durante 1 mes, implica un cambio del mecanismo TGF- β 1 en este tipo de cáncer, lo que sugiere que el TGF- β 1 promueve la proliferación de células epiteliales de la próstata e inhibe la apoptosis de una manera autocrina (Fuzio *et al.*, 2011).

En cuanto a la aplicación del FGF, se ha demostrado que debido a sus funciones biológicas, tiene potencial para inducir la regeneración de una amplia gama de tejidos, incluyendo piel, vasos sanguíneos, músculo, tejido adiposo, el tendón/ligamento, cartílago, hueso, dientes y tejidos nerviosos. Sin embargo, cuando las soluciones libres de FGF se inyectan in vivo, rápidamente pierden su actividad biológica funcional, principalmente debido a la pérdida por difusión y/o inactivación enzimática/degradación (Andreopoulos y Persaud, 2006; Freudenberg *et al.*, 2009). Por lo tanto, para obtener un rendimiento satisfactorio, se requiere una gran cantidad de FGF con una dosis continua. Por el contrario, cuando los FGF se absorben dentro de los materiales, su riesgo de degradación pueden ser menor, asegurando la actividad biológica. Una amplia variedad de biomateriales como matrices de tejidos y polímeros sintéticos y/o naturales, han sido estudiados como materiales candidatos para portar a FGF y provocar su eficacia terapéutica in vitro y/o in vivo (Ye-Rang *et al.*, 2010).

Plasma rico en factores de crecimiento (PRFC)- Plasma rico en plaquetas (PRP)

La terapia regenerativa pretende lograr la predominancia de los fenómenos regenerativos sobre los reparativos (restitución anatómica y funcional de los tejidos versus cicatriz fibrosa), mediante la aplicación de agentes inductores celulares como son los Factores de Crecimiento. Una terapia regenerativa eficaz lleva implícita la resolución rápida de los síntomas y la reducción del índice de recaídas (Orozco *et al.*, 2010).

Los preparados plasmáticos ricos en plaquetas empezaron a desarrollarse a principios de los años 90, siendo sus primeras aplicaciones en cirugías cardíacas (Ferrari *et al.*, 1987; Hood, 1993). Es a finales de los 90 cuando se introdujo su uso en cirugía bucal (Withman *et al.*, 1997). A partir de ese momento empezó su utilización en diversos campos, como: cirugía general, cirugía

plástica, neurocirugía, cirugía vascular, oftalmología, cirugía maxilofacial, ortopédica, etc. (Floryan *et al.*, 2004; Sampson *et al.*, 2008).

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 y Eppley, 2005); empleándose comúnmente como sinónimos, el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), PRP-gel, gel plaquetario o coágulo plaquetario (Anitua *et al.*, 2004; Anitua *et al.*, 2007).

El PRP es otra forma normal de coágulo sanguíneo autólogo que contiene un número favorablemente elevado de plaquetas y presenta un pH entre 6,5 y 6,7. Proviene de la propia sangre del paciente, por lo cual está libre de enfermedades transmisibles y no puede causar reacciones de hipersensibilidad (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005).

Al mismo tiempo, el PRP contiene, además de los factores de crecimiento plasmáticos, 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. Estas ayudan a la adhesión de células y de otras moléculas útiles para la conducción celular, actuando como “matriz” base para la reparación tisular (Okuda *et al.*, 2003; Kawase *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2005; García, 2008).

Más de un centenar de proteínas siguen ligadas a la fibrina tras su activación (vitronectina, calmodulin, TSP-1, etc.). El rol de estas proteínas, detectadas mediante análisis proteómico de la fibrina con técnicas ELISA, es (Anitua *et al.*, 2011):

- Proceso de coagulación.
- Respuesta inmune.
- Regeneración tisular.
- Actividad plaquetaria.

Existe discrepancia en detalles técnicos como la inclusión de leucocitos o hematíes, velocidad y tiempo de centrifugación. Aunque parece ser que los resultados son similares (Weibrich *et al.*, 2002; Kevy y Jacobson, 2004; Weibrich *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2007).

Anitua (2004) defiende la no inclusión de leucocitos, fracción situada justo por encima de los hematíes, argumentando que alteran la función de algunos FC e interfieren en la acción antiinflamatoria. Otros como el grupo de Harvest (PReP2) alegan que carece de importancia este detalle y además su PRP contiene algunos hematíes. Otros autores prefieren la inclusión de

leucocitos para el tratamiento de las úlceras u otras cirugías, ya que consideran que tiene un efecto antimicrobiano y desinfectante (Trowbridge *et al.*, 2005; Bielecki *et al.*, 2007)

En los últimos años se ha establecido una diferenciación entre PRP y PRGF, al considerar que en este último, además de existir un incremento de la concentración plaquetaria, debe coexistir una ausencia de glóbulos blancos y una confirmación cuantitativa y cualitativa de los principales factores de crecimiento conocidos; obteniéndose también un aumento con respecto a los valores en plasma. Esta nomenclatura confiere una nueva importancia al plasma como fuente de factores de crecimiento de origen plasmático, con importancia similar a las plaquetas (Anitua *et al.*, 2007).

Este sistema autólogo más avanzado del PRP, es el PRGF System, comercializado por BTI system. Cuenta con la certificación CE de las autoridades sanitarias europeas, por lo que está autorizado en Europa para la obtención de factores de crecimiento plasmáticos y su aplicación en diversas especialidades médicas. En USA se comercializa con la denominación ENDORET, es la tecnología PRGF®-Endoret®, pionera en el desarrollo de protocolos específicos para la regeneración tisular y la primera técnica 100% autóloga del mercado. Entre sus ventajas destacan (Anitua *et al.*, 2007):

- Biocompatible, versátil y seguro.
- Control en su activación y utilización.
- **Protocolo sencillo:** un solo centrifugado.
- **Protocolo rápido:** 8 minutos de centrifugación y 20 minutos de preparación.
- No contiene leucocitos, por tanto, evita su actividad proinflamatoria.
- Posee propiedades bacteriostáticas.
- Gran potencial terapéutico, sin efectos secundarios, reduce notablemente el tiempo de recuperación de fracturas, lesiones musculares, tendinosas e intervenciones quirúrgicas.
- Aplicable en numerosos campos de la medicina en los que se ha comprobado su alta eficacia en la regeneración de diferentes tejidos: hueso, piel, mucosa oral, tendones, ligamentos, músculos, cartílago y córnea. Abarcando así especialidades médicas tales como: cirugía oral y maxilofacial, ortopedia y medicina deportiva, dermatología, oftalmología, cirugía vascular, cirugía plástica y estética e incluso cirugía veterinaria.

Otros sistemas comerciales para la preparación de PRP existentes, son (Mishra y Pavelko, 2006; Sánchez *et al.*, 2009):

- **Autologous Conditioned plasma-Arthrex®**: extraen 9cc de sangre venosa, centrifugan durante 5min a 1500 rpm y aplican 2-3 cc de plasma en su totalidad, sin separarlo, refiriendo concentraciones de plaquetas y de FC parecidas y efectos similares.
- **Fibrinet Cascade®-Biotec**: Este sistema produce una matriz biológica consistente, completamente autóloga, con factores de crecimiento, citoquinas y proteínas mitogénicas extraídas de la propia sangre del paciente. Esta matriz biológica se prepara fácilmente a través de un proceso de centrifugación para formar una Matriz de Fibrina Rica en Plaquetas (PRFM). Durante este proceso es muy importante la función que ejerce la fibrina, al ser una matriz que facilita el movimiento de las células regeneradoras hacia el sitio de la lesión.
- **GPS® III system-Biomet**: con este sistema se consigue un volumen fijo de PRP (el 10% del volumen de sangre inicial), que contendrá más del 90% de las plaquetas disponibles, independientemente del hematocrito del paciente. Biomet prepara el PRP basándose en un sistema de émbolos dentro de un cilindro (3200 rpm durante 15min).
- **SmartPREP®-Harvest Technologies**: Harvest (PReGF) presenta una técnica de doble centrifugación con decantación automática (2400 rpm, 15min), argumentando que de esta forma no se lesionan las células y su reproductibilidad es mayor. Procesa cantidades de sangre de 45 a 60 ml para obtener de 5 a 6 ml de PRP por ciclo (Peñarrocha *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2002; Tischler, 2002) en 15 minutos (Sánchez *et al.*, 2003).

Concentración de plaquetas

Las plaquetas, además de su conocida función hemostática, han demostrado ser capaces de liberar ciertas sustancias que juegan un papel vital en la reparación tisular, influyendo de este modo en la reactivación de la vascularización y sobre otras células durante los procesos de inflamación y angiogénesis (Anitua *et al.*, 2004).

Un coágulo de sangre normal contiene 93% de células rojas, 6% de plaquetas y en algunos casos menos de un 1% de células blancas. En contraste, un coágulo de PRP contiene un 94% de plaquetas, sólo un 5% de células rojas y un 1% de células blancas. Esta alteración de las proporciones celulares de las células que no estimulan la cicatrización (células rojas) por las que sí estimulan todas las fases de cicatrización (plaquetas), es lo que explica su habilidad en reforzar la regeneración tisular (Anitua, 2001; Marx 2004; Marx y Garg, 2005; Sampson *et al.*, 2008).

No existen datos concretos sobre la cuenta de plaquetas requerida en un coágulo para calificarlo como PRP, pero una concentración de aproximadamente 1 millón de plaquetas/ μ l o de

4 a 7 veces sobre su cuenta básicamente usual (200.000 plaquetas/ μ l), ha demostrado proporcionar beneficios clínicos (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2001; Weibrich *et al.*, 2004; Marx y Garg, 2005; Sampson *et al.*, 2008).

En cuanto a las concentraciones de FC en el PRP son superiores a las del plasma normal en 5-25 veces (v) según el FC (25 v: PDGF-AB, 5-11v: EGF, VGF, PDGF-BB. 5v: IGF-1, TGF- β 1, y TGF- β 2). Sin embargo no siempre más concentración y más FC suponen un mayor efecto, lo que debe tenerse en cuenta (Weibrich *et al.*, 2002; Kevy y Jacobson, 2004; Weibrich *et al.*, 2005; Beca *et al.*, 2007).

Procedimiento de obtención del PRGF-PRP

La obtención de las plaquetas y su concentración se inician con asepsia y mediante una técnica con mínimo traumatismo para obtener un pequeño volumen de sangre, normalmente entre 10-60 ml, dependiendo de la extensión y el tipo de cirugía (Anitua y Andía, 2000; Marx 2001; Marx y Garg, 2005).

En humana, el clínico debe tener presente que cualquier dispositivo de PRP terapéutico debe procesar una concentración aproximada de 1.000.000 plaquetas/ μ l y la sangre entera contiene aproximadamente 200.000 \pm 75.000 plaquetas/ μ l. Además, 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 el PRGF aquel que posee aproximadamente una concentración de plaquetas 1,5 veces la concentración en sangre entera (Anitua, 2004).

La obtención de PRP debe ser un proceso viable, estéril y libre de pirógenos para que las plaquetas se mantengan ilesas (Anitua y Andía, 2000; Marx, 2001; Marx, 2004; Marx y Garg, 2005).

Para que la muestra no coagule inmediatamente, se coloca en un recipiente estéril (tubo de ensayo) con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante, ya que esta solución capta los iones calcio que se encuentran en la sangre y los neutraliza formando un compuesto químico llamado quelato, impidiendo de esta manera la coagulación sanguínea. Además el citrato sódico no altera los receptores de membrana de las plaquetas y permitirá revertir el proceso al añadir Calcio en forma de Cloruro de Calcio (CaCl_2). Se coloca 1 ml de anticoagulante por cada 5 ml de sangre y ambos se mezclan moviendo el tubo por inversión (Pierce *et al.*, 1992; Anitua y Andía, 2000; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005).

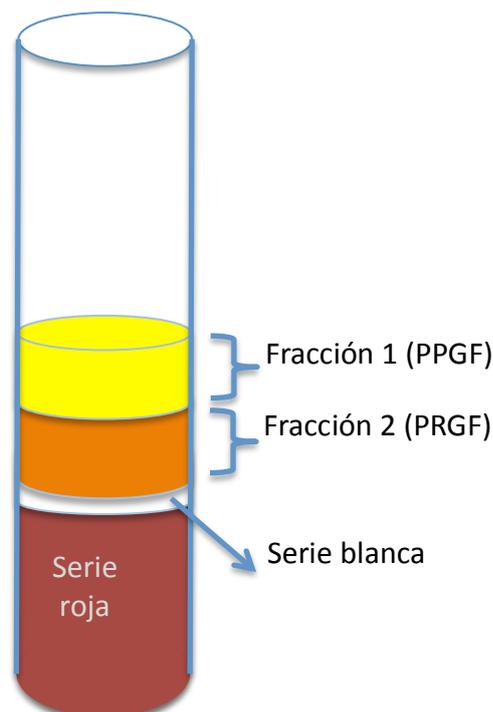
La sangre con anticoagulante se coloca entonces en el dispositivo para su centrifugación. Tras este proceso se separan los componentes sanguíneos en varias fases (Figura 1): en el fondo del tubo quedan las células rojas. La fase superior amarillenta se subdivide en dos fases (Anitua, 2007):

- Fracción 1 (superior): que corresponde al Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PPGF).
- 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. Esta mayor densidad se debe a que son plaquetas jóvenes, llevan pocos días en el torrente sanguíneo y no han sufrido desgaste ni activación (Anitua, 2007).

La concentración de factores de crecimiento en estas plaquetas es significativamente superior al resto de las plaquetas de las otras fracciones plasmáticas. Por esta razón este plasma es muy rico en factores de crecimiento.

- Fracción 3: serie roja.

Figura 1: Fracciones de la separación del Plasma



Tras del proceso de centrifugación, la fracción del PRGF se separa, por medio de un pipeteado y se coloca en un tubo estéril, donde permanecerá hasta su activación. El PRP debe permanecer estéril para que las plaquetas sean viables y bioactivas durante las próximas 8 horas desde que se obtuvieron a temperatura ambiente (Anitua y Andía, 2000; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005). Se recomienda que el PRGF no se coagule hasta que se active, para poder ser colocado de esta manera en el sitio quirúrgico. 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 y Garg, 2005; Omer Mei-Dan *et al.*, 2011).

Métodos de obtención del PRGF-PRP

Una de las principales ventajas del PRP es su facilidad de obtención. Sin embargo, es importante estandarizar el protocolo de preparación para poder controlar la concentración de factores de crecimiento y proteínas que se obtienen, y conseguir así el preparado más adecuado para cada una de las situaciones fisiopatológicas que se pueden presentar (Anitua *et al.*, 2007).

La primera referencia bibliográfica de obtención de plasma rico en plaquetas autólogo es del año 1992. En ésta, la sangre entera se extraía y se almacenaba en tubos de citrato para proceder a su centrifugado (1120 rpm durante 10 minutos) (Uhlen-Hansen *et al.*, 1992).

Los métodos descritos para la obtención de estos concentrados plasmáticos se agrupan en:

- Métodos manuales: que aplican los métodos clásicos de pipeteo manual para la extracción de estas fracciones.
- Kits Comerciales: los cuales logran el concentrado de forma automática y con menor manipulación.

Respecto a los **métodos manuales** de obtención de PRP se han publicado diferentes protocolos en función de las especies objeto de estudio. De este modo encontramos diferentes protocolos descritos (Tabla 3).

En humana, se han referenciado diversos protocolos para la obtención de estos concentrados ricos en factores de crecimiento, empleándose una única centrifugación o centrifugación doble.

Con respecto a la centrifugación única, encontramos:

Anitua y Andia (2000) y Anitua (2001) obtienen el PRP en un proceso de una sola fase, centrifugando el plasma a 1800 rpm durante 8 minutos, separando los componentes sanguíneos en las diferentes fases descritas. Sánchez *et al.* (2007), a partir de sangre depositada en tubos de

citrato sódico de 4,5 ml, con su método a 460 g (o 1800 rpm) durante 8 minutos obtuvieron incrementos en las concentraciones plaquetarias (aproximadamente 300%) y del TGF- β 1 (350%). Prestaron especial atención a la presencia de glóbulos blancos, cuyos valores estuvieron por debajo de los límites de detección, hecho que resaltan estos autores, ya que afirman que la presencia de leucocitos en estas fracciones plasmáticas induce efectos inflamatorios en los tejidos en los que son aplicados.

DeObarrio et al. (2000) y Camargo et al. (2002) utilizaron un protocolo de una centrifugación a 5600 rpm durante 6 minutos, obteniéndose un contaje promedio de la concentración plaquetaria de 5,29% con respecto a la concentración en sangre entera.

Por otro lado, Marx et al. (1998) y Marx (2001) afirman que intentar obtener PRP con una sola centrifugación no produciría un verdadero concentrado terapéutico. En cambio se obtiene una mezcla de PRP y PPP que contiene poca cantidad de plaquetas. Esto se debe principalmente a que mediante la realización de un solo giro, las células rojas interfieren con la separación de las plaquetas. Este es el principal error que ocurre con las centrífugas convencionales de laboratorio, ya que estas son diseñadas con propósitos diagnósticos y no para la preparación de PRP. Dichos dispositivos no producen un rendimiento suficiente y pueden lesionar las mismas (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005).

Jensen et al. (2004) describieron un método manual para concentrar plaquetas de perros utilizando tubos con EDTA para la recolección de la sangre, mediante centrifugación única. Ellos obtenían un incremento de plaquetas en el PRP en relación a sangre entera de 670% (1.884.000 plaquetas/ μ l). Pero el uso de EDTA para obtener PRP podría provocar lesiones estructurales, bioquímicas y funcionales a las plaquetas y ser irritante para los tejidos tratados (White y Escolar 2000).

En el estudio de Peris (2008) en la especie canina, el protocolo propuesto consistió en una única centrifugación, en la que se empleó una fuerza centrífuga relativa de 210 g durante 10 minutos, obteniendo un valor medio en el PRP de 1013×10^3 plaquetas/ μ l, que consigue incremento de entorno al 336% con respecto a la sangre periférica.

Otro método reciente para la obtención de este concentrado autólogo de plaquetas en la especie canina, es el descrito por Silva et al. (2011), que obtuvieron una concentración de plaquetas alrededor de 1,5 veces (1,28) la concentración en sangre entera utilizando una centrifugación de 191 g durante 6 minutos.

En cuanto a la obtención de PRP mediante doble centrifugación, cabe destacar que, Marx (2001) y Marx y Garg (2005), emplean un dispositivo de centrifugación doble. El primer giro

llamado giro fuerte o giro de separación, es a una velocidad de 5600 rpm, obteniendo la separación de las células rojas (glóbulos rojos) del resto de componentes de la sangre. El segundo giro llamado giro suave o giro de concentración, es a una velocidad de 2400 rpm, que separa y une fuertemente a las plaquetas, células blancas y un pequeño número de células rojas residuales del plasma, en función de su densidad, del menos denso al más denso: PPP primero, PRP segundo, y por último las células rojas, que son las más densas. Este giro suave produce el PRP y lo separa del PPP, ambos procedimientos se realizan en un tiempo total de 15 minutos aproximadamente (Marx *et al.*, 1998; Anitua y Andía, 2000; Marx y Garg, 2005).

El componente PPP es el plasma acelular, que cuenta con aproximadamente 200 cc de volumen, el componente de las células rojas se condensa esencialmente y cuenta con aproximadamente 180 cc de volumen. El PRP es el plasma con un número concentrado de plaquetas y células de sangre blancas (Marx, 2001).

Kawase *et al.* (2003) y Okuda *et al.* (2003) describieron un protocolo de dos centrifugaciones, obteniendo incrementos significativos de la concentración plaquetaria (300% aproximadamente). Sánchez *et al.* (2007), obtuvieron resultados similares en la concentración plaquetaria utilizando una única centrifugación.

Una concentración plaquetaria de aproximadamente el 200% obtuvieron García *et al.* (2005) con su técnica de doble centrifugación.

Ouyang Xiang-ying y Qiao Jing (2006) emplearon un protocolo de doble centrifugación obteniendo valores de plaquetas en el PRP alrededor del 539% con respecto a los detectados en sangre periférica.

Respecto a la utilización de los métodos manuales en animales, en la especie canina, De Vasconcelos Gurgel *et al.* (2007) realizaron dos pasos de centrifugación para la obtención de PRP. Tras la primera centrifugación, la porción correspondiente al PPP era desechada y el resto del contenido se centrifuga durante un periodo más prolongado. Con este protocolo obtuvieron un incremento del 320% en la concentración plaquetaria (Tabla 3). Casati *et al.* (2007) publicaron un estudio en perros realizando también doble centrifugación con resultados similares al estudio anterior (148520 plaquetas/ μ l en sangre entera y 460350 plaquetas/ μ l en PRP).

En otras especies, como el conejo (Aghaloo *et al.*, 2002) y el caballo (Carmona *et al.*, 2007) también se obtuvieron fracciones de PRP por medio de protocolos de dos centrifugaciones en sus estudios piloto, obteniendo incrementos en las concentraciones plaquetarias. Además en un estudio con ratones donde obtuvieron 2 muestras (de 5 ml cada una), la primera, sometida a un único centrifugado (muestra1: 160 g durante 6 minutos) y la segunda a doble centrifugación

(muestra 2: 160 g 20 minutos y 400 g 15 minutos), comprobaron que la concentración de plaquetas era mayor en la 2ª muestra (Nagata *et al.*, 2010).

Entre los dispositivos comerciales para obtener PRP en humana, podemos citar el estudio presentado por Weibrich y Kleis (2002), donde se compararon 2 métodos:

- Curasan PRP kit® (Alemania): con un recuento de plaquetas de de 636.000 a 1.075.000.
- PCCS PRP system® (Estados Unidos de Norteamérica): con un recuento de plaquetas de 901.999 a 2.209.000.

El recuento y la concentración de plaquetas fue mayor con el PCCS system®.

Por su parte Appel *et al.* (2002) compararon en su estudio, los mismos Kits que Weibrich y Kleis (2002), obteniendo que el aumento absoluto de plaquetas era mayor con el PCCS PRP system® y la más alta concentración por μl se obtuvo con el sistema Curasan PRP kit®.

Weibrich *et al.* (2003) compararon el sistema Harvest Smart PReP system® (Alemania) con el Friadent-Schutze PRP kit® (Austria). El dispositivo Alemán fue el sistema con mejor facilidad de manejo, mejor tiempo operatorio y de mayor eficacia en la recolección de plaquetas.

En un estudio realizado por Weibrich *et al.* (2005), compararon 2 métodos de obtención del PRP, que difieren en los tiempos de centrifugación:

- “Platelet-Rich-in-Growth-Factors kit” (PRGF kit; G.A.C. Medicales San Antonio, Vitoria, Spain): método propuesto por Anitua, en el que se extraen 3 tubos de sangre de 5 ml y son sometidos a una centrifugación a 1800 rpm durante 8 minutos.
- “Platelet Concentrate Collection System” (PCCS; 3i/Implant Innovations, Palm Beach Gardens, FL): método ya establecido para la obtención de PRP, en el que se extrae mayor volumen de sangre (60 ml) que se somete a doble centrifugación. La primera a 3000 rpm durante 3,75 minutos y la segunda, durante 13 minutos a 3000 rpm.

El producto final obtenido con el PCCS presentó una mayor concentración plaquetaria y por lo tanto, mayores niveles de factores de crecimiento. Es sabido que los niveles de factores de crecimiento en las preparaciones de PRP pueden variar según las concentraciones obtenidas de plaquetas y leucocitos (Weibrich *et al.*, 2005).

En cuanto a los preparados comerciales para la obtención de PRP en animales, Hauschild *et al.* (2005), resolvieron una luxación traumática de la articulación intertarsal en un perro con una artrodesis parcial. En este caso, utilizaron el kit llamado Curasan AG (Kleinostheim, Germany), que resultó de fácil manejo y ofreció buenos resultados en condiciones clínicas.

Otro kit utilizado por Grageda et al. (2005) en un estudio realizado con la especie ovina fue el Harvest Smart PreP Processing unit (Plymouth, Mass). En este se utiliza citrato como anticoagulante y consistía en una doble centrifugación. Obtuvieron una mayor concentración de plaquetas en el PRP (Tabla 3). Este kit fue empleado por Gerard et al. (2006), en un estudio en la especie canina, obteniendo una concentración plaquetaria de 388%, 344%, 386% y 334%, para animales de 1, 2, 3 y 4 meses respectivamente.

Tabla 3: Protocolos para la obtención de PRP-PRGF

Autor	Especie	Método	Centrifugación 1ª centrifugación 2ª centrifugación	Tiempo	Plaquetas en sangre periférica (cel/ μ l)	Plaquetas en PRP (cel/ μ l)
Weibrich ⁽¹⁾ (2005)	Humana	PCCS Kit	3000 rpm 3000 rpm	3,75 min 13 min	274200 \pm 54050	1641800 \pm 426820
Anitua ⁽¹⁾ (2005)	Humana	PRGF Kit	1800 rpm	8 min	274200 \pm 54050	513630 \pm 139470
DeObarrio et al. (2000)	Humana	Manual	5600 rpm	6 min	240000*	125000*
García et al. (2005)	Humana	Manual	1800 rpm 1800 rpm	8 min 8 min	240000*	461000*
Ouyang Xiang- Ying y Qiao Jing (2006)	Humana	Manual	1220 rpm 3600 rpm	15 min 15 min	240900	1300000
Sánchez et al. (2007)	Humana	PRGF System II	460 g	8 min	142000 a 379000	421000 a 1314000
Okuda et al. (2003)	Humana	Manual	2400 rpm 3600 rpm	10 min 15 min	257000 \pm 46000 ⁽⁺⁾	709000 \pm 216000
De Vasconcelos Gurgel et al. (2007)	Canina	Manual	200 g 200 g	10 min 15 min	148250	460350
Carmona et al. (2007)	Caballo	Manual	120 g 240 g	5 min 5 min	-	250x10 ⁸ \pm 71,8x10 ⁸
Grageda et al. ⁽²⁾ (2005)	Ovina	HSPP Kit			261500 \pm 118700	588700 \pm 358000
Aghaloo et al. (2002)	Conejo	Manual	215 g (1500 rpm) 863 g (3000 rpm)	10 min 10 min	144000	1050000
Peris (2008)	Canina	Manual	210 g	10 min	301x10 ³	1013x10 ³
Nagata et al (2010)	Ratón	Manual	160 g 160 g 400 g	6 min 20 min 15 min	80,73 \pm 31,01 347,68 \pm 58	180,73 \pm 31,01 447,68 \pm 58
Silva et al (2011)	Canina	Manual	161 g	6 min	345,3x10 ³	515,9x10 ³

rpm: revoluciones por minuto; min: minutos. ()Valores promedio. (+) El valor referenciado corresponde a la concentración de plaquetas en plasma no concentrado. (1) Estos autores no expresan la velocidad de centrifugación en fuerza centrífuga negativa (g). (2) Estos autores emplean una doble centrifugación, pero no referencian tiempos ni g-rpm.*

Si los resultados obtenidos con los diferentes sistemas son distintos, se debe a la importancia de la influencia del empleo de diferentes dispositivos y equipos de evaluación, y de distintos protocolos de obtención del PRP. El verdadero PRP se obtiene con máquinas calificadas para tal fin; dispositivos en mal estado pueden alterar las proporciones y la calidad del PRP y su beneficio

no será el mismo si se compara con el obtenido por una centrífuga certificada (Marx y Garg, 2005).

La diversidad de resultados que se pueden obtener de acuerdo al dispositivo empleado es numerosa, por lo que es de esperar que, si la concentración plaquetaria difiere de un concentrado a otro, los resultados postoperatorios también serán diferentes. Algunos estudios pueden mostrar grandes beneficios con el PRP al emplear dispositivos que garanticen una óptima concentración de plaquetas (Lucas y García, 2006).

Métodos de activación PRGF-PRP

Para conseguir las ventajas que brinda el plasma rico en plaquetas, éste tiene que activarse, es decir, las plaquetas deben lisarse y/o liberar los gránulos citoplasmáticos, que son los que contienen los factores de crecimiento y los metabolitos activos (Soler, 2006).

Existen diversos protocolos o técnicas de activación para el plasma rico en plaquetas. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, y es por esto que no hay un único modo de activar el PRP. Principalmente podemos dividir estas técnicas en tres.

Congelación y descongelación

El procedimiento de congelación y descongelación del concentrado plaquetario fue el primero en utilizarse.

Este método consiste en congelar y descongelar el plasma, de manera que, al someterlo a bajas temperaturas las plaquetas se lisan y son capaces de liberar los factores de crecimiento contenidos en sus gránulos (Landesberg *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001). Landesberg *et al.* (2000) obtuvieron concentraciones de plaquetas alrededor de tres veces superiores a lo normal en el sobrenadante del Factor de Crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).

Esta técnica tiene como ventaja que al destruir todas las células, el riesgo de contaminación con glóbulos blancos o con bacterias, es prácticamente nulo. El mayor inconveniente es el tiempo que se requiere para la activación, impidiendo en muchas ocasiones su aplicación in vivo en los procedimientos clínicos (Zimmermann *et al.*, 2001).

Sonicación

Consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicadas se pueden destruir asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar los

complejos proteicos. Se puede aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas (Reina, 2005).

Con este método se consigue una reducción del tiempo necesario para la obtención de los factores de crecimiento mediante tres pulsos de 10 segundos, para un posterior centrifugado a 10000 giros durante 20 minutos a 4º C. Teniendo en cuenta la labilidad de alguno de estos productos, reducir el tiempo de procesamiento y mantener unas condiciones estables (sobre todo de pH), puede resultar trascendental para su eficacia (Guillén *et al.*, 2005).

Adición de otras sustancias

Gel de fibrina

A principios de los años 90 se desarrolló el gel de fibrina como material hemostático y con propiedades adhesivas. Yazawa *et al.* (2004) protocolizaron la adición de un gel de fibrina al PRP, de manera que actuaba como malla para permitir el avance de los Factores de Crecimiento.

Oyama *et al.* (2004), en su trabajo obtuvieron hueso esponjoso de la cresta ilíaca, al cual se añadía plasma rico en plaquetas. Este PRP había sido activado previamente con gel de fibrina. De esta manera obtenía un material de trasplante maleable que colocaba en el defecto alveolar. En los pacientes tratados con este hueso esponjoso enriquecido con PRP el porcentaje mínimo que relaciona el volumen del defecto alveolar con el volumen de hueso regenerado fue de 71,27%, mientras que el grupo control fue de 47,47%, siendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Trombina bovina

La actividad plaquetaria se desencadena a través de los receptores de trombina presentes en la superficie de las plaquetas. Aunque diversos autores han utilizado la trombina bovina (Hansen *et al.*, 1992; Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998), actualmente su aplicación está contraindicada por el riesgo potencial de desarrollar coagulopatías (formación de anticuerpos antitrombina que induzcan la deficiencia del factor V de coagulación) (Landdesberg *et al.*, 2000; Anitua y Andía, 2000; Anitua, 2001; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005). Guillén *et al.* (2005) comprobaron en su estudio que los factores obtenidos de las plaquetas son suficientes para provocar la coagulación del plasma, por lo que se podría obviar la adición de trombina. Ante estas contraindicaciones, el empleo de trombina recombinante humana podría ser una alternativa (Anitua *et al.*, 2004; Fuerst *et al.*, 2004; Grageda, 2004).

Existen autores que han empleado esta sustancia de forma aislada (Hansen *et al.*, 1992), junto con Cloruro Cálcico (Marx *et al.*, 1998; Everts *et al.*, 2006) o únicamente Cloruro Cálcico (Anitua, 1999; Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004; Cugat *et al.*, 2005; Tarragó, 2007).

Cloruro Cálcico

La activación del PRP requiere reemplazo del calcio y la iniciación de la cascada de coagulación sanguínea (García, 2008).

Para activar las plaquetas y coagular el fibrinógeno se añade Cloruro Cálcico (50 µl por cada ml de plasma), de manera que el plasma inicia un proceso dinámico de coagulación, que finaliza con la retracción del coágulo. Es en este coágulo de fibrina donde están los factores de crecimiento plaquetarios (Tarragó, 2007).

Hoy día, en la actividad clínica se utiliza principalmente la adición de Cloruro Cálcico 22,8 mM en un incubado a 37°C. Los porcentajes exactos empleados varían entre un 4 a un 14% del sobrenadante (Marx *et al.*, 1998; Anitua *et al.*, 2004; Cugat *et al.*, 2005); consiguiendo así la activación de un modo más seguro (Anitua, 1999).

Aplicaciones del PRGF-PRP

Los inicios en la aplicación clínica de estos concentrados plaquetarios fueron como agentes hemostáticos, ya que producen una activación local de la cascada de coagulación. Una vez que la cascada está activada, una elevada concentración de plaquetas, presente en esta fracción plasmática, se adhiere a la superficie dañada. De este modo, la activación y degranulación de dichas plaquetas produce la liberación de más sustancias hemostáticas (Rieman, 2000).

Los preparados plasmáticos ricos en plaquetas empezaron a desarrollarse a principios de los años 90, siendo sus primeras aplicaciones en cirugías cardíacas (Ferrari *et al.*, 1987; Hood, 1993); es a finales de los 90 cuando se introdujo su uso en cirugía bucal (Withman *et al.*, 1997). A partir de este momento comenzó su aplicación en diversos campos, como: cirugía general, cirugía plástica, neurocirugía, cirugía vascular, oftalmología, cirugía maxilofacial, ortopédica, etc. (Floryan *et al.*, 2004; Sampson *et al.*, 2008).

Con el paso de los años, esta primera aplicación fue abriendo las puertas a sucesivas aplicaciones en otros campos terapéuticos, donde destaca actualmente la medicina regenerativa tisular (Orozco *et al.*, 2010).

PRGF-PRP en lesiones musculares

La Terapia Regenerativa pretende lograr la predominancia de los fenómenos regenerativos sobre los reparativos (*restitución del tejido muscular anatómica y funcional versus cicatriz fibrosa*) mediante la aplicación de agentes inductores celulares como son los Factores de Crecimiento. Esto puede mejorar la “química” de la regeneración fisiológica y/o la aplicación “in situ” de células progenitoras cultivadas “ex vivo” mediante birreactores que pueden conseguir una regeneración tisular más rápida y segura (Orozco *et al.*, 2010).

Mecanismo fisiológico

El PRP tiene un evidente efecto sellante y adherente que ayuda a mantener la coaptación de los planos dificultando la recidiva del hematoma, que es un problema omnipresente en las lesiones musculares, dado que es un tejido altamente vascularizado. Por lo tanto, como mínimo, el PRP debe considerarse un buen adyuvante terapéutico en este tipo de patologías (Sampson y Gerhardt, 2008).

Las plaquetas contienen en sus gránulos alfa un cóctel de mediadores químicos que disparan el inicio de la fase regenerativa, tanto a través de la promoción de la angiogénesis como del inicio de la regeneración celular a través de los mediadores mitóticos de las células mesenquimales, es el “kick-off cocktail”. Además, la presencia del TGF- β en estado latente bloquea la respuesta inflamatoria inhibidora de la regeneración que es mediada por linfocitos (Brunner y Blakytyn 2004; Wang *et al.*, 2005).

La acción de los gránulos de las plaquetas es clave en el pasaje de la fase hemostática a la regenerativa. Sus lisosomas contienen una gran cantidad de enzimas proteolíticas, sus gránulos densos contienen factores protrombóticos y sus gránulos- α un alto contenido en Factores de Crecimiento (FC) pro regenerativos, entre los que destacan el PDGF y el TGF- β . Además, a lo largo de su formación, las plaquetas tienen la propiedad de acumular por endocitosis numerosas moléculas del medio entre las que destacan mediadores lipídicos, como, la esfingosina-1-fosfato (SPP), el ácido fosfatídico y el lisofosfatidato. Estas sustancias tienen efecto antiapoptótico de las células endoteliales, están implicadas en la quimiotaxis de células endoteliales, su proliferación y promoción de uniones adherentes para formar estructuras tipo capilar. La esfingosina parece fundamental en el inicio de la angiogénesis, dado que es el ligando de los receptores EDG (“endothelial differentiation genes”). Finalmente, la sobreexpresión de VEGFR2, hace sensible al endotelio circundante a la producción del VEGF (FC vasculoendotelial) para iniciar la angiogénesis a partir de las células endoteliales (Romagnani, 2004).

Las fases que definen a grandes trazos la denominada regeneración fisiológica son: degenerativa, inflamatoria, regenerativa y fibrosis. Debe entenderse que los conceptos que describen estas fases son interdependientes y se solapan durante gran parte de su tiempo. El coágulo de fibrina actúa como primordio del nuevo tejido y vehículo del reclutamiento celular y vascular. Éste va a ser sustituido por matriz extracelular propia del músculo, que es producida a partir de la diferenciación celular mediada por factores del ambiente. En este sentido las células fibroblásticas y miofibroblásticas juegan un papel fundamental en la regulación de la diferenciación órgano-específica (Li y Huard, 2002).

A continuación, coexistiendo con el proceso de la fibrinólisis y la activación endotelial, se produce la liberación “in situ” de FC secretados por los gránulos- α plaquetarios que han quedado secuestrados en el interior de la malla de fibrina. Este kit disparador químico desempeña el papel de desencadenante de la respuesta regenerativa. El principal FC que hace de bisagra en estas respuestas es el TGF- β que se secreta en dos formas (Weyrich y Zimmerman, 2004):

- Forma latente en complejos pequeños de **acción inmediata**, que promueven la atracción de células inmunitarias y que son degradados por las enzimas “furin-like” liberadas por las mismas plaquetas.
- Forma latente de **liberación tardía**, formando complejos grandes ligados a la matriz extracelular fibrilar (o a la propia fibrina) por medio del LTBP (“latent TGF binding protein”) degradada fundamentalmente por la plasmina en el momento de la fibrinólisis y que desencadena la respuesta regenerativa propiamente dicha. En este momento la acción del TGF- β es fundamentalmente antiinflamatoria.

La regeneración de un tejido exige la formación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis va a ser el motor de la regeneración desde el inicio ya que posibilitará la llegada de células tronco multilineales, y proporcionará factores tróficos necesarios para la homeostasis celular. El inicio de la angiogénesis se desencadena por la SPP, también liberada por las plaquetas, que se une al receptor EDG-1 de las células endoteliales ejerciendo una acción quimioatrayente sobre las mismas. Un cofactor, que parece ser la fibronectina, estabiliza la interacción de la célula endotelial con la matriz extracelular. La acción subsiguiente viene mediada fundamentalmente por el VEGF (FC vasculoendotelial) que actúa como factor proliferador de las células endoteliales y movilizador de células progenitoras del sistema vascular para promover la vasculogénesis. Esta respuesta coordinada a escala local y sistémica producirá un nuevo árbol vascular en la zona dañada gobernando la formación del nuevo tejido. Asegurado el aporte vascular, se forma un tejido intermedio de origen fibroso (fibroblastos y miofibroblastos) y que actúa a modo de nicho

que albergará a las células madre movilizadas por los mediadores del daño celular. Posteriormente se sustituye por tejido muscular a partir de las células satélites o de progenitoras que señalizadas por chemokinas son movilizadas desde otros tejidos (fundamentalmente la médula ósea) (Anitua *et al.*, 2004).

Las células progenitoras llegan al foco de lesión guiadas por gradientes químicos y anidan en el "homing". Normalmente, la célula stem queda regulada en su nicho, que es otra célula de aspecto fibroblástico. En respuesta a estímulos mitógenos va a producir progenitores y precursores de forma ordenada que se encargarán de sustituir el primordio de tejido (tejido fibroso de granulación) por el tejido noble siguiendo el proceso: mioblastos, miotúbos, miofibras multinucleadas (Asakura *et al.*, 2002).

En la fase de proliferación y diferenciación son muy importantes las señales recibidas a través de las citoquinas propias del tejido dañado que van a conducir a la diferenciación tejido específica. Juegan un importante papel la acción de FC como TGF- β , bFGF, EGF, HGF y muy especialmente el IGF-1 parece ser un estímulo necesario para la diferenciación y proliferación mioblástica (Engert, 1996; Damon 1998).

Interés terapéutico de PRP en lesiones musculares

La patología muscular deportiva sigue unos procedimientos terapéuticos normalizados pero en las roturas fibrilares y hematomas postcontusionales se ha propuesto recientemente un nuevo planteamiento terapéutico fundamentado en todo lo dicho anteriormente (Balius, 2005).

En humana, un ejemplo del interés terapéutico de la utilización de PRP ante una lesión muscular, es el efecto positivo de la infiltración del mismo en patologías como la epicondilitis lateral o "codo de tenista" (es una inflamación de las inserciones musculares en el epicóndilo del codo). Se ha demostrado que una única inyección de este concentrado plaquetario disminuye el dolor y mejora la función más que el tratamiento mediante infiltración local de corticoides (Peerbooms *et al.*, 2010).

Ante una lesión muscular el hematoma se produce rápidamente, su contenido no es sólo hemático, ya que contiene también los restos celulares consecuentes a la necrosis de miofibras. En teoría, sí se procede a la evacuación del hematoma y se aporta PRP autólogo, podría disminuirse el riesgo de recidiva del mismo, disminuir, por tanto, "fisiológicamente", la fase inflamatoria y acelerar y mejorar el proceso regenerativo minimizando la fibrosis (Balius, 2005).

La selección evolutiva ha primado la aparición de una respuesta inflamatoria inmediatamente después de una agresión ya que la reabsorción del hematoma y la respuesta ante la infección es

fundamental en la resolución de las agresiones “naturales”, pero puede decirse que la inflamación no es tan necesaria en lesiones inducidas por actos “no naturales” como los quirúrgicos, es decir, en los casos tratados evacuando el hematoma. Pero, aunque es cierto que una inflamación excesiva favorece el desarrollo de cicatriz fibrosa, sigue siendo cierto que tampoco es deseable la ausencia total de inflamación. El funcionalismo muscular correcto a largo plazo (a partir del mes) dependerá de que la construcción del nuevo tejido mantenga una adecuada proporción entre miofibras y matriz extracelular, donde el exceso de antiinflamación puede inclinar la balanza en contra de la matriz extracelular, regenerándose un músculo en apariencia más sano al ser “más celular” que sin embargo resulte menos resistente y que facilite las recaídas (Prisk, 2003).

Actuando con un producto autólogo como es el PRP no hay razón para suponer que se produzcan efectos adversos si se realiza una aplicación aislada y en una fase precoz, después de las 48 horas de la pauta RICE (Reposo, Hielo, Compresión, Elevación) que parece necesaria. Si bajo máximas condiciones asépticas y control ecográfico se practica en medio quirúrgico la evaluación y evacuación del hematoma y, sin retirar la aguja, se practica la infiltración de un volumen de PRP proporcionado al grado de la lesión (entre 4 a 8 ml) el beneficio esperable es la disminución de la sintomatología dolorosa y una mejora en la calidad y celeridad del proceso de curación valorable ecográficamente (Orozco *et al.*, 2010).

En definitiva, ante una lesión muscular podemos optar a la utilización de FC activados con Calcio como opción al tratamiento. El proceso se produce en diversas fases (Tarragó, 2007):

- Sustitución del coágulo inicial por los FC en el mismo lugar de la lesión.
- La presencia de los FC se asocia a la activación de las células satélite.
- La acción de los FC hace proliferar la aparición de marcadores específicos miogénicos.
- Se forman los mioblastos, se fusionan y se forman miotubos que darán lugar a fibras musculares y, por tanto, a la regeneración del músculo.

Tratamiento de lesiones musculares mediante PRGF

La lesión muscular tiene como consecuencia, en una primera fase, la degeneración de las miofibras que se necrosan por la acción de las proteínas de lisis que se liberan durante la lesión. El hematoma se forma rápidamente y contribuye a la degeneración del tejido, se produce la respuesta inflamatoria típica con infiltración de neutrófilos y otros leucocitos. El tratamiento con PRGF implica la sustitución del coágulo inicial, por el PRGF activado con calcio. Las plaquetas liberan los Factores de Crecimiento (FCs) en el mismo lugar de la lesión; la presencia de FCs se asocia con la activación de las células satélite, que por acción de los FCs proliferan y expresan

marcadores específicos miogénicos, llegado a este punto a estas células se les denomina mioblastos. Éstos se fusionan y originan miotubos que evolucionan a fibras musculares promoviendo así la regeneración del músculo. Estudios recientes sugieren que IGF-I, HGF, bFGF, EGF, VEGF, TGF-beta y PDGF regulan la proliferación y diferenciación de células satélite y mioblastos, por lo tanto tienen un papel directo en la reparación y regeneración muscular (Nurden *et al.*, 2008).

Se solicita un estudio de RMN o ecográfico para definir exactamente la localización y el tamaño de la lesión muscular, así como la presencia o no de hematoma intramuscular. Se realiza la extracción de sangre al paciente para la obtención de PRGF según protocolo establecido (Anitua *et al.*, 2007). Se obtienen 20-40 cc de sangre, dependiendo de la magnitud de la lesión. Una vez centrifugada la sangre (1800 rpm/8 minutos), se separa el PRGF; de cada tubo de (de 4,5 cc). Se infiltran 4-8 cc de PRGF (adaptando el volumen al tamaño de la lesión), previamente activado con el 5% del volumen con Cloruro Cálcico. Se realiza un nuevo control ecográfico para localizar el hematoma del que se evacua el máximo posible. Sin retirar la aguja, se inyecta en el foco de la lesión, PRGF recién activado con el cloruro cálcico. Se recomienda al paciente la aplicación de hielo local durante unos minutos. Al cabo de una semana se realiza otro control ecográfico. En caso de persistir un hematoma residual o un seroma se procede de nuevo a su evacuación y la aplicación de una nueva dosis de PRGF, como se ha descrito anteriormente. El número de aplicaciones variará en función del tamaño de la lesión y de la sintomatología dolorosa que produzca. Habitualmente las roturas pequeñas presentan una evolución favorable con una sola aplicación de PRGF. Las roturas medianas o grandes pueden precisar dos o tres aplicaciones de PRGF con la frecuencia de una a la semana (Tarragó, 2007).

En cuanto la sintomatología dolorosa lo permita se iniciará un tratamiento asociado de fisioterapia, ya que está bien demostrado que el estímulo mecánico favorece en gran medida la regeneración muscular. Esta fisioterapia incluye electroestimulación muscular suave, electroterapia analgésica y antiinflamatoria y contracciones musculares isométricas, suaves al inicio del tratamiento, aumentando la intensidad a continuación y asociando estiramientos y contracciones isotónicas en función de la evolución (Balius, 2005).

En resumen, ante una lesión muscular, la aplicación de FCs se realiza mediante los siguientes pasos (Tarragó, 2007):

- Diagnóstico ecográfico y/o resonancia magnética, para definir exactamente la localización de la lesión y el tamaño. Se determina la presencia o no de hematoma en la lesión.
- Aplicación in situ de una cantidad de PRP correspondiente al tamaño de la lesión.

- Nuevo control ecográfico a la semana, si persiste el hematoma se evacúa y se vuelve a aplicar Factores.
- Repetir el procedimiento hasta ver la cicatrización ecográficamente (normalmente entre 4-5 veces).

El código WADA y la utilización de PRGF en lesiones musculares

Como ya hemos dicho, el uso clínico del PRP comenzó a mediados de los años 90 en la cirugía maxilofacial, donde se empleaban concentraciones de factores de crecimiento del propio paciente para la cirugía oral y craneofacial. Sus aplicaciones clínicas han aumentado y actualmente se usan en varios países en diferentes disciplinas médicas como cirugía plástica y ortopedia. En esta última disciplina y gracias al deporte de élite es donde más desafío supone, ya que se ha demostrado que el uso del PRP acelera la cicatrización y recuperación al trabajo tanto en lesiones musculares como tendinosas. Aunque el uso clínico de estos productos se regula por los términos del código antidoping de la Asociación Mundial Anti Doping (WADA), particularmente en lo que concierne al Factor de crecimiento insulínico IGF-I (Creaney y Hamilton, 2008).

Debido a que el PRP contiene factores de crecimiento, la utilización del mismo podría ir en contra de las normas antidopaje. En 2008, la WADA y el Comité Olímpico Internacional (IOC) organizaron una reunión internacional para discutir los posibles conflictos del código anti dopaje. Se estudió la utilización de PRP en lesiones musculares en relación con la medicina basada en la evidencia y el dopaje. Las inyecciones intramusculares de esta sustancia quedaron prohibidas y apareció en la lista de sustancias prohibidas de la WADA (sección S.2.6). En la misma sección (S.2.5), los FC presentes en el PRGF mencionados fueron IGF-I, PDGF, FGFs, VEGF y HGF (Omer Mei-Dan *et al.*, 2011).

Desde Enero del 2010 la WADA prohíbe el uso de preparaciones derivadas de plaquetas en inyección intramuscular, principalmente por la presencia de IGF-I, del que se ha demostrado un efecto anabolizante, suponiendo un efecto beneficioso y ventajista en el rendimiento muscular del atleta tratado (Creaney y Hamilton, 2008).

Sin embargo se debe tener en cuenta que las dosis, modo de aplicación y las isoformas presente en estas preparaciones están lejos de tener la propiedad anabolizante de la IGF-IEc presente en el plasma y sintetizada por el músculo. Los estudios sugieren que el efecto anabólico del IGF-I no se presenta en preparaciones de plasma rico en plaquetas debido a que la isoforma IGF-IEa (producida en el hígado) y presente en esta preparación, no tiene efecto anabólico, a diferencia de la isoforma IGF-IEc derivada del músculo; y esta última no se encuentra presente en esta preparación. Otra característica de la IGF-IEa del PRP, que está en contra del efecto

anabólico, es la vida media de 10 minutos, esto se debe a que no está unida a la IGFBP-3 que es la proteína transportadora del 99% de la IGF-I en suero, se debe tener en cuenta que este complejo IGF-I/IGFBP-3 tiene una vida media de 16 horas (Rigamonti *et al.*, 2009).

Otro punto para tener en cuenta del uso del PRP en medicina deportiva, es la dosis subterapéutica de IGF-I en este concentrado plasmático, que es de 300ng/cc, la cual es muy inferior a las dosis requeridas para obtener un efecto anabólico (Phillippou *et al.*, 2007).

Por otro lado, también es importante mencionar que, la realización de ejercicio tiene efecto sobre la concentración sanguínea de IGF-I, así Berg y Bang (2004) detectaron que tras 10 minutos de ejercicio moderado en personas sanas, se producía un 27% de aumento en la concentración sérica de este FC.

Cirugía oral y maxilofacial

El empleo de PRP en reconstrucción maxilofacial y en terapias de regeneración periodontal, fue uno de los campos pioneros en los que se llevó a cabo su aplicación. Diversos estudios han demostrado cómo la aplicación de PRP favorece el incremento en la formación y densidad del hueso, tanto cortical como alveolar (Withman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998; Kassolis *et al.*, 2000; Shanaman *et al.*, 2001).

La primera prueba clínica de aplicación de plasma rico en plaquetas fue en la cirugía maxilofacial (Uhlin-Hansen *et al.*, 1992) y es en este campo donde se han obtenido los buenos resultados que han impulsado su uso en otras ramas de la medicina (Anitua *et al.*, 2004; Kovacs *et al.*, 2005). Las aplicaciones se orientan desde la aplicación de PRP en los lechos de extracción de piezas dentarias como al intentar que los implantes dentarios queden perfectamente unidos al tejido óseo contiguo, además de promover la regeneración ósea y la osteointegración (Anitua 1999; Kim *et al.*, 2002a y 2002b; Zechner *et al.*, 2003).

Anitua en 1999, publicó en sus conclusiones, que tras el uso de PRP autólogo en las zonas de extracción de piezas dentarias, había logrado la epitelización completa de la zona en el 100% de los casos, siendo significativamente mejor en las áreas tratadas con PRP, que en las no tratadas. Del mismo modo, la cantidad y calidad de la regeneración ósea de la zona era significativamente mejor.

Whitman *et al.* (1997) lo emplearon en cirugía reconstructiva oral y maxilofacial en los procedimientos relacionados con la osteointegración de los implantes de titanio. Otros estudios evaluaron el efecto del PRP autólogo asociado a injertos de hueso esponjoso autólogo durante la reconstrucción de defectos mandibulares, obteniendo unos resultados satisfactorios,

atribuyéndole al PRP un importante efecto osteoconductor (Tayapongsak *et al.*, 1994; Marx *et al.*, 1998).

Cirugía plástica

Los resultados obtenidos en cirugía plástica y reconstructiva han mostrado una significativa disminución de infecciones y en el 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).

Las plaquetas autólogas son especialmente útiles en la reconstrucción de tejidos blandos en la cirugía facial y reconstructiva (Bhanot y Alex, 2002; Frechette *et al.*, 2005).

Su aplicación también es efectiva en cirugía cosmética (estiramientos “lifting” de piel), ya que los factores de crecimiento regulan la remodelación de la epidermis y de la dermis y tienen una profunda influencia sobre la apariencia y textura de la piel (Man *et al.*, 2001).

Se ha comprobado que la aplicación tópica o la inyección subcutánea de estos factores produce fuertes cambios sobre la piel envejecida: restaura la vitalidad cutánea, aumenta su grosor, recupera la consistencia elástica, mejora la afluencia vascular, estimulando las secreciones e incrementando la tersura y apariencia de la piel (Mehta y Watson, 2008). De ahí su utilización junto a terapia láser para el rejuvenecimiento de la piel (Shin *et al.*, 2012).

La utilización más habitual del PRP en medicina estética es (Arquero, 2009):

- Mesoterapia (arrugas, elastosis, discromías).
- En forma de coágulo plaquetario en una desepidermización de un peeling para favorecer la regeneración dérmica y epidérmica (en cicatrices para acelerar el proceso de cicatrización).
- En inyección subdérmica (surcos pronunciados, depresiones cicatriciales, fibrosis).
- En adición a material adipocitario (como injerto).
- En lipotransferencia enriquecida en PRP (arrugas, surcos, aumento o remodelación de pómulos, labios o mentón).
- En reparación tisular en paniculopatía ademado-fibro-esclerótica (celulitis).

Cicatrización de heridas

A principios de los 90 se propuso el uso de factores derivados de las plaquetas de sangre humana autóloga como tratamiento coadyuvante de la cicatrización de úlceras para promover la formación del tejido de granulación en las fases tempranas de cicatrización (Atri *et al.*, 1990).

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 y Schultz, 1993a y b).

Una de las aplicaciones más importantes del PRP en el campo de la dermatología ha sido la aceleración de la cicatrización de las úlceras cutáneas crónicas. Anitua *et al.* (2008), demostraron como a las 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 (un 73% frente a un 21,4%, $P < 0,05$).

Las úlceras son comunes en pacientes con afecciones sistémicas como la diabetes o la β -thalassemia, y acaban teniendo complicaciones vasculares y neuropatías periféricas. El empleo de estos 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 (Gilsanz *et al.*, 2001; Tarroni *et al.*, 2002; Pietrzak y Eppley, 2005; Driver *et al.*, 2006; Salemi *et al.*, 2008).

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; Centella *et al.*, 2005).

En el 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 eran infiltrados (Hom *et al.*, 2007).

En un estudio con una buena calidad metodológica, donde incluyeron 20 ensayos clínicos controlados y aleatorios en pacientes, de los cuales, 11 correspondían a cirugía oral y maxilofacial, 7 a úlceras cutáneas crónicas y 2 a heridas por cirugía, tratados con PRP. Sólo 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, tuvieron un intervalo de confianza (IC) del 95% y un exitoso proceso de curación (Martínez-Zapata *et al.*, 2009).

El rápido desarrollo del tejido de granulación y epitelización que se consigue mediante la aplicación de PRP para la cicatrización de heridas, permite disminuir el dolor y obtener una temprana recuperación del paciente y vuelta a la normalidad (Mehta y Watson, 2008).

Cirugía ortopédica

El uso del PRP en cirugía ortopédica y traumatología ha demostrado tener el efecto clínico esperado. Este concentrado plaquetario se ha utilizado en cirugía protésica de rodilla, rupturas tendinosas, fracturas de cadera y rodilla, fracturas ligamentosas de rodilla, entre otras (Mingo *et al.*, 2007).

PRP en lesiones óseas

El PRP se ha empleado en pacientes sometidos a fusiones vertebrales, mostrando su aplicación una mayor capacidad de regeneración ósea alrededor de los implantes de titanio. Este efecto se debe a que la liberación de factores de crecimiento por las plaquetas tiene un efecto quimiotáctico y mitogénico sobre las células mesenquimales (“stem cells”) y osteoblastos, acelerando la cicatrización ósea (Lowery *et al.*, 1999).

Resultados igualmente esperanzadores fueron los de Oyama *et al.* que en el año 2004, publicaron que el PRP puede acelerar la osteogénesis de una forma más intensa que la resorción ósea, al menos, durante la fase de remodelación dentro de los seis meses después de la cirugía.

Sánchez *et al.* (2003), aplicaron PRP activado como coadyuvante a un tratamiento rutinario de una lesión de cartílago articular, causada por un fallo de osificación endocondral. Los resultados obtenidos marcaron una rápida mejoría clínica con una buena reparación del cartílago, valorado bajo imágenes radiológicas y de resonancia magnética. Además, existen trabajos sobre el empleo de factores de crecimiento aislados y combinados en lesiones condrales y sus efectos en la reparación. En estos trabajos se ha valorado la aplicación de factores de crecimiento como el FGF-2 α y el IGF-I de forma aislada en diversos tipos de lesiones condrales, tras los que se evaluó el tejido de reparación formado, obteniendo unos resultados muy esperanzadores (Chuma *et al.*, 2004; Mizuta *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004).

De esta forma, se abre un nuevo campo de aplicación de este concentrado plaquetario en lesiones condrales. Así, Serra (2006), comprobó que la aplicación de PRP en lesiones condrales de espesor completo producidas en la zona de carga del cóndilo femoral medial de ambas rodillas, en conejos, produce una reparación tisular con una clara tendencia a obtener características histológicas y biomecánicas similares a las de un cartílago articular sano. Al mismo tiempo, Soler (2006), valoró la aplicación de la inyección intraarticular del PRP en la reparación de defectos

condrales de espesor completo en la rodilla de conejos, obteniendo una mejora de esta lesión, cuando lo comparas con un placebo.

Del mismo modo, estos concentrados plaquetarios se han utilizado asociados a diversas sustancias, como coadyuvantes en la reparación de defectos óseos o en la neoformación de este tejido. Es el caso de Kovacs et al. (2005), quienes realizaron una evaluación histomorfométrica y densitométrica de los efectos del PRP utilizado junto a Fosfato β -tricalcico (β -TCP), sustancia utilizada para la sustitución de hueso (Scher *et al.*, 1999; Szabó *et al.*, 2001). Los resultados de dicho estudio indicaron que la adición de PRP al β -TCP acelera la remodelación, mejora la efectividad y la reparación del tejido, que resultaba de una calidad similar a la de hueso autólogo.

En la misma línea, Hauschild et al. (2005) publicaron la resolución de un caso clínico utilizando una combinación de β -TCP y PRP. Observaron como la combinación de estos dos productos en la resolución de una panartrodesis tarsal, evidenciaba un mayor incremento de la densidad ósea en el sitio del injerto comparado con el hueso adyacente, así como una pérdida completa de la estructura granular, lo que indica una degradación del injerto y formación de nuevo hueso. La presencia de factores de crecimiento en el PRP favoreció la revascularización y por lo tanto la síntesis de colágeno y regeneración ósea por la estimulación de fibroblastos, médula ósea y células osteoprecursoras (Marx *et al.*, 1998).

Estos factores de crecimiento también se utilizan como alternativa para mejorar la calidad de vida y la función física de pacientes con enfermedades degenerativas. Así, Sánchez et al (2008), observaron una disminución del dolor y mejora de la función tras la inyección intraarticular de PRP, comparado con inyecciones de ácido hialurónico, en pacientes con OA (Osteoartritis) de rodilla. Resultados similares consiguieron Cugat et al. en un estudio de 2010, ya que comprobaron la mejoría de pacientes con OA de rodilla tras 3 inyecciones intraarticulares de PRP en intervalos de 2 semanas. A los 6 meses del tratamiento detectaron la mejoría en la función de la rodilla, disminución del dolor y por tanto mejora de la calidad de vida.

La regeneración ósea comienza con la liberación del Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el Factor de crecimiento β transformante (TGF- β) desde la degranulación de las plaquetas del concentrado plaquetario. El PDGF estimula la mitosis de los osteoblastos, además inicia la angiogénesis; mientras que el TGF- β estimula la división de las células mesenquimales, activa los fibroblastos y puede potenciar la capacidad osteoinductiva de las proteínas óseas morfogenéticas actuando mediante un mecanismo sinérgico (Mehta y Watson, 2008).

PRP en lesiones tendinosas

Además de la aplicación de los factores de crecimiento en lesiones óseas, a lo largo de estos años se ha podido comprobar su beneficio en la restauración de otros tejidos, como la regeneración de las roturas tendinosas, este es un proceso lento debido al poco aporte sanguíneo de sus células. 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 actúan activamente en el proceso de reparación (Molloy *et al.*, 2003). 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 (Sánchez *et al.*, 2003).

El tratamiento quirúrgico del desgarro del Tendón de Aquiles, asociado a la aplicación de PRP autólogo, supuso un acortamiento en el tiempo de recuperación funcional y con un retorno precoz a sus actividades deportivas (Sánchez *et al.*, 2007; Filardo *et al.*, 2010).

Otros estudios, como el de Maniscalco *et al.* (2008) y Randelli *et al.* (2008), detectaron como la aplicación de PRP en lesiones del tendón del manguito rotador en humana, mejoraron en 6 y 24 meses respectivamente. Al igual que los estudios de Kon *et al.* (2009) y Filardo *et al.* (2010), donde observaron una mejora funcional a los 6 meses de tratamiento basado en 4 y 3 inyecciones de PRP respectivamente, pero esta vez en el tendón rotuliano.

La infiltración de PRP en lesión tendinosa en la especie ovina, mostró que a las 4 y 8 semanas la remodelación del tendón es mayor que en el grupo control (infiltrados con salino: menos células, menor organización de los haces colágeno y menos vasos sanguíneos) (Domínguez y Fernández, 2011).

PRP en lesiones ligamentosas

La lesión ligamentosa es una de las más comunes entre los deportistas, de ahí la importancia de intentar utilizar tratamientos que consigan la recuperación del paciente en el menor tiempo posible. Los ligamentos son los encargados de evitar que la articulación se mueva más allá de los límites normales, y se lesionan en caso de que la articulación sobrepase el rango de movimiento permitido, es decir, se encargan de permitir la mayor movilidad articular sin comprometer la estabilidad (Morrey, 2012).

Entre los estudios que registran mejoras tras el tratamiento con PRP de roturas ligamentosas, Radice *et al.* (2010), evaluaron la maduración de la plastia del ligamento cruzado anterior (LCA) y observaron una mejora en la velocidad de maduración de más del 50%. Mei-Dan *et al.* (2010) comprobaron la recuperación funcional en menos de 6 meses de la rotura del ligamento medial del codo en un medallista Olímpico judoka.

Otras aplicaciones

El PRP es una preparación autóloga inherentemente seguro, que representa una nueva biotecnología de interés creciente en la ingeniería tisular y la terapia celular y que se obtiene mediante un procedimiento sencillo y económico. De ahí, que esta fuente rica en factores de crecimiento, se aplique en múltiples sectores que abarcan desde el campo experimental a la aplicación clínica diaria (Bava y Barber, 2011).

Tras la confirmación de los efectos potencialmente beneficiosos que pueden tener estos concentrados plasmáticos en el campo de la medicina regenerativa, el campo de la biotecnología ha encontrado en esta sustancia un gran interés para su desarrollo. Ejemplo de ello, es la posibilidad que vislumbra este campo de lograr una regulación biotecnológica del porcentaje de factores de crecimiento en el PRP, afectando por lo tanto a sus efectos terapéuticos, al pensar que existe la posibilidad de regularla por medios farmacológicos (Anitua *et al.*, 2007).

Gastroenterología

Wallace *et al* (2006) demostraron que la administración oral de preparados plaquetarios aceleraba la cicatrización de úlceras gástricas a través de la presencia de VEGF. Además sugirieron que el contenido en factores pro y anti-angiogénicos podría ser regulado por diferentes fármacos, como AINE's o trombopoietina. Esta nueva posibilidad, podría tener importantes consideraciones clínicas, ya que estos cambios en los niveles de los factores pro y anti-angiogénicos pueden influir en la cicatrización de úlceras en estómago y colon.

Experimentación in vitro

Se ha empleado como medio de cultivo o coadyuvante a otros medios de cultivo. De este modo, se han observado estudios donde la aplicación de esta sustancia ha traído consigo una mayor diferenciación celular en cultivos tridimensionales de condrocitos humanos y leporinos (Guillén *et al.*, 2005).

En la misma línea, también se ha podido demostrar como el PRP es capaz de estimular la expresión de proteoglicanos, como el condroitín sulfato, en cultivos celulares de monocitos humanos. Esta estimulación, aunque puede estar implicada en los procesos fisiológicos normales, también puede conllevar implicaciones en los procesos patológicos (Hansen *et al.*, 1992).

Del mismo modo, también se han estudiado las interacciones existentes entre los factores de crecimiento contenidos en el PRP con diversas proteínas que intervienen en procesos de inflamación y reparación tisular, como por ejemplo, con PgE2 y la IL-1 (McCarthy *et al.*, 1994).

Sistema nervioso periférico

Este sistema ha sido sometido a pequeños estudios con estos concentrados plasmáticos. Así, Farrag et al. (2007) utilizaron roedores como modelo animal para demostrar que la adición de PRP y fibrina a la sutura de un nervio mejoraba los resultados de regeneración, mostrando que estos concentrados también poseen efectos neurotróficos.

Dermatología

El PRP se ha empleado con el objetivo de acelerar la cicatrización de úlceras cutáneas crónicas. Un estudio de Anitua et al. (2008), mostró como a las 8 semanas de tratamiento de este tipo de úlceras con PRP, el porcentaje de superficie curada en el grupo tratado con PRP fue significativamente mayor que en el grupo control (73% frente a un 21,4%, $p < 0,05$). Ya a principios de los 90, se observó en una revisión de casos clínicos, como la presencia de factores plaquetarios autólogos sobre úlceras cutáneas recalcitrantes, promovía la aparición de un tejido de granulación en fases muy tempranas de cicatrización (Atri *et al.*, 1990). Se ha observado como la aplicación de PRP en pacientes con úlceras maculares respondieron de forma significativamente positiva, alcanzando un elevado porcentaje de resolución anatómica (Gehring *et al.*, 1999).

Oftalmología

En esta disciplina cabe destacar su uso potencial en la reparación de la retina. En un modelo animal (conejo) utilizado por Cullinae et al. (2002) demostraron que el tratamiento adyuvante con PRP originaba un incremento en la proliferación celular en la cicatrización de heridas retinianas.

Con el objetivo de mejorar la clínica de pacientes con queratoconjuntivitis seca, Alio et al. (2008), aplicaron PRP a 18 pacientes con ojo seco y observaron una mejora significativa de la sintomatología en el 89% de los casos.

Asociaciones a Scaffold

En determinadas ocasiones, el objetivo buscado es mantener los factores de crecimiento en el sitio de implantación, evitando el estallido inicial de liberación de dichos factores. En estos casos el "scaffold-like PRGF" puede ser la mejor opción (Anitua *et al.*, 2007). El "scaffold" es una red tridimensional formada por fibrina, cuya obtención es posible controlando el proceso de activación plaquetaria. De este modo se consigue una liberación más controlada de factores de crecimiento.

Combinando este tipo de preparación con otro tipo de biomateriales, tanto naturales como sintéticos, como por ejemplo colágeno y compuestos de sulfato de calcio y policaprolactona (Rai

et al., 2005), se puede conseguir un mayor control sobre la farmacocinética y biodistribución de los factores de crecimiento (Anitua *et al.*, 2007). Estas preparaciones, además de ser portadoras de factores de crecimiento y proteínas, permiten la infiltración celular y consecuentemente la integración de tejido recién formado. Estos “scaffold” son biocompatibles, no citotóxicos y no inmunogénicos (Yamada *et al.*, 2006).

En la actualidad, empieza a utilizarse el PRP en el tratamiento de la alopecia, ya que se ha demostrado que VEGF y PDGF facilitan la angiogénesis alrededor del folículo piloso (Takikawa *et al.*; 2011; Yano *et al.*, 2011).

Riesgos de la utilización del PRGF-PRP

Con el constante aumento del empleo terapéutico del PRP activado, también han surgido complicaciones que pueden suponer un riesgo a la hora de su utilización (Landesberg, 1998).

Hoy día no existe una consciencia de los problemas sanitarios que se pueden presentar debido al uso del PRP autólogo. Evidentemente valores de hematocrito altos o contajes plaquetarios bajos van a ser factores limitantes a la hora de establecer la aplicación óptima (Anitua *et al.*, 2004). Se debe tener cuidado al realizar este procedimiento cerca de grandes vasos, especialmente en pacientes con riesgo de trombosis. El uso paralelo de fármacos antitrombocitarios también podría teóricamente limitar el tratamiento, aunque May *et al.* (2001) observaron que la inducción de úlceras en rata iba asociada con el incremento de los niveles de VEGF y con el descenso de endostatinas (factor antiangiogénico).

Otro riesgo que se debe considerar a la hora de emplear el PRP como tratamiento es la posibilidad de originar coagulopatías cuando se emplea trombina bovina como activación de éste, ya que puede estar relacionado con el desarrollo de anticuerpos anti factores de coagulación V y IX. Han surgido ciertas referencias en la literatura del desarrollo de ciertas coagulopatías tras la exposición a la trombina bovina, e incluso un caso de muerte (Cmolik *et al.*, 1993; Spero, 1993; Muntean *et al.*, 1994; Sosolik *et al.*, 1995; Landsberg, 1998; Anitua *et al.*, 2004; Guillén *et al.*, 2005). Este fenómeno no parece ser dosis dependiente. No obstante, este riesgo ha sido uno de los principales motivos por los que se ha buscado alternativas al método de activación plaquetaria (Landesberg, 1998; Anitua *et al.*, 2004).

También se ha remarcado 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 (Zimmerman *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 (Anitua, 2004).

Una contraindicación clara de aplicación del plasma rico en plaquetas es en pacientes intervenidos de neoplasia o por un mal desarrollo tisular, aunque se haya extirpado ya el tumor, debido a que podría potenciar la mitogénesis de las células cancerígenas (Martínez-González *et al.*, 2002), aunque en este apartado no existen publicaciones que hayan demostrado esta capacidad por parte del PRP.

Motivo de controversia

Se conoce ampliamente los beneficios de los factores de crecimiento en los procesos de reparación y regeneración tisular, y en los últimos años se ha extendido su aplicación en forma de PRP. No obstante, no podemos olvidar que algunos autores han mostrado sus dudas acerca de sus efectos beneficiosos (Grageda, 2004; Oyama *et al.*, 2004; Silva y Sampaio, 2009; De Vos *et al.*, 2010).

En esta línea, Schmitz y Hollinger en 2001, dudaban de los efectos del PRP porque el factor de crecimiento derivado de las plaquetas tiene un efecto inhibitorio sobre las células osteoblásticas, cuya liberación desencadena un incremento en la resorción ósea.

El empleo del PRP conjuntamente con injertos óseos también ha obtenido resultados dispares. Los resultados observados en el empleo conjunto de PRP con injertos no vitales no han sido muy prometedores. Wironen *et al.* (2000), fracasaron al intentar demostrar la osteoconductividad del PRP cuando era combinado con un lecho de matriz ósea mineralizada y otra gelatina de matriz ósea desmineralizada, todos ellos suspendidos en un fluido sobre los músculos rectos del abdomen. La menor formación de hueso encontrada fue en los grupos que se aplicó el PRP.

Otros trabajos han combinado el PRP con hidroxiapatita xenogénica en aumentos de senos maxilares, mostrando en los resultados que no existían diferencias significativas entre los grupos con PRP y sin PRP (Furst *et al.*, 2001).

Froum *et al.* (2002), testaron la eficacia del PRP en tres injertos bilaterales en senos maxilares con hueso inorgánico bovino. En este caso los análisis histomorfométricos demostraron que la adición de PRP a estos injertos no mostraban diferencias significativas, ni en la producción de hueso vital ni en el contacto de la interfase ósea con los implantes.

También desde un punto de vista clínico, se han obtenido resultados no positivos en su empleo en defectos alveolares, observándose como su aplicación no aportaba beneficios ni en la cantidad ni en la calidad del nuevo hueso formado (Shanaman *et al.*, 2001).

Aunque con una menor incidencia, también existen publicaciones que no observan los efectos osteoconductivos del PRP combinado con injertos autólogos. De esta forma, se observó como un estudio en conejos que valoraba la capacidad de regeneración en defectos óseos, la aplicación de PRP no aportó efectos beneficiosos sobre la formación de nuevo hueso, es más los peores resultados se observaron en los grupos en que se empleó únicamente PRP (Agballo *et al.*, 2002). En esta misma línea, encontramos otros autores que muestran sus resultados cuanto menos controvertidos en el empleo del PRP (Galliani *et al.*, 2000; Jackse *et al.*, 2002).

Otro trabajo en los que se ha utilizado PRP para la reparación de lesiones en los que los resultados no eran significativos es el de Silva y Sampaio (2009), que comparó el tratamiento de la lesión del LCA entre un grupo control y el grupo PRP, sin observar diferencias entre grupos. Cabe recalcar que en este trabajo los tiempos de estudio no eran los mismos entre grupos.

Los trabajos anteriormente citados hacen referencia al empleo del PRP en cirugía maxilofacial y traumatológica, campos en los que se inició su empleo y donde más relevancia ha tenido. Con lo que respecta a otros campos, podemos observar como existe cierta deficiencia en estudios y trabajos sobre los efectos de esta sustancia, no obstante al igual que en los observados anteriormente, su empleo no está exento de controversia (Guillén *et al.*, 2005).

Valorando otro punto clave y no ajeno de disparidad de opiniones, parece ser clave la metodología de obtención y activación del PRP para su posterior actuación (Zimmerman *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 2002).

Anteriormente hemos observado los diversos métodos de procesado, observando cómo los métodos de plateféresis parecen mostrar los mejores índices de concentración plaquetaria frente a otros como los de sedimentación en tubo (Zimmerman *et al.*, 2001).

Del mismo modo, se observa como el método de activación realizando diversos procesos de congelación y descongelación parece también mostrar valores sustancialmente superiores en la cantidad de PDGF y TGF (Landesberg *et al.*, 2000; Zimmerman *et al.*, 2001).

No obstante, parece existir una uniformidad de criterios a la hora de referir el hecho de que todos los procesos referenciados para la obtención y activación del PRP obtienen concentrados plaquetarios y de factores de crecimiento superiores a los basales (Zimmerman *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 2002; Guillén *et al.*, 2005; Kathleen y Dardik, 2010).

Otras opciones terapéuticas al PRP

La reparación y resolución de diferentes defectos (cutáneos, óseos, articulares, etc.) ha requerido de diversas técnicas entre las que se ha incluido la aplicación de injertos, plastias e implantes con el objetivo de devolver la continuidad a los tejidos lesionados (De Boer, 1988).

De esta manera podemos encontrarnos que en base a su naturaleza podemos clasificar estos elementos en (Grageda, 2004):

Autoinjertos o injertos autólogos

Han sido durante muchos años los injertos de elección debido a la gran biocompatibilidad y disponibilidad. Este es el caso en que el receptor y el donante son el mismo individuo. El PRP autólogo se considera incluido dentro de este tipo.

A pesar de ser considerado como el mejor material a emplear, su uso en los diversos campos ha estado limitado por el aumento de tiempo quirúrgico, por lo invasivo del procedimiento de obtención en ocasiones y por las limitaciones en volumen entre otros (Goldberg y Stevenson, 1989).

Aloinjertos

Éstos son obtenidos de un donante de la misma especie, sin que sea necesario que el donante permanezca in situ en la intervención, incluso que éste provenga de un cuerpo sin vida. Además, permiten una manipulación y tratamiento previo el cual disminuye el índice de rechazo y al mismo tiempo su viabilidad (Buck y Malinin, 1994).

Aloimplante

Engloban a aquellos implantes realizados con materiales cerámicos y polímeros, que en un principio pueden suponer una alternativa a los auto- y aloinjertos, ya que son capaces de suplir de forma “indefinida” el defecto original. Cada uno de ellos tiene unas características mecánicas y de biocompatibilidad específicas. Ejemplos de estos materiales, en cirugía ortopédica, los pueden constituir la hidroxiapatita, fosfato tricálcico, sulfato cálcico y combinaciones de estos (Grageda, 2004).

Xenoinjertos

Hacen referencia a los injertos tomados de otras especies animales. Estos materiales deben ser sometidos a tratamientos bajo condiciones específicas (presión, temperatura) previamente a su integración en el organismo receptor (Jensen *et al.*, 1996).

Células madre y terapia regenerativa

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 *et al.*, 2003; Chargé *et al.*, 2004).

En cuanto al músculo esquelético, es un tejido con capacidad regenerativa, de hecho la hipertrofia muscular derivada del ejercicio obedece más al desarrollo de nuevas fibras que a la hipertrofia de las fibras presentes. Esta capacidad regenerativa siempre se ha atribuido 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). Se conoce muy bien la capacidad de las células mesenquimales quiescentes en la médula ósea o en el tejido adiposo para migrar hacia el foco de lesión y allí adherirse y diferenciarse hacia mioblastos. 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 (Ferrari *et al.*, 1998; Deasy *et al.*, 2001).

En cuanto a 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 células madre no específicas del tejido muscular, participan en el proceso de reparación invadiendo el área lesional, diferenciándose en células satélite y finalmente participando en la reparación del músculo esquelético (Fukada *et al.*, 2002; LaBarge *et al.*, 2002; Chargé *et al.*, 2004;).

Ya en el año 2000, Galli *et al.* utilizaron células madre neurales para regenerar músculo, cultivándolas con células de músculo progenitoras (mioblastos) o inyectándolas directamente al músculo. Estos resultados son prometedores para las terapias de trasplante de células, debido a que los experimentos sugieren que los tejidos receptores pueden instruir a las células trasplantadas y conseguir el resultado deseado.

En humana, el beneficio clínico esperable ante una lesión muscular, sería lograr una rápida regeneración tisular con la mínima fibrosis. La evacuación del hematoma y la inoculación de células mesenquimales evitarían respectivamente el tiempo necesario para lograr la reabsorción y reclutamiento celular (Jancowski *et al.*, 2002).

Las células madre ofrecen la oportunidad de trasplantar una fuente viva para la auto regeneración. Los trasplantes de médula de los huesos son una reconocida aplicación clínica del

trasplante de células madre. Actualmente, el aislamiento de células madre y células progenitoras adicionales se está desarrollando para diferentes aplicaciones clínicas, como son, reemplazo de piel, trasplante de células cerebrales y tratamiento para la diabetes (Pecorino, 2001).

Respuesta de fase aguda

El término Respuesta de Fase Aguda (RFA) refleja todos los cambios que se producen en el organismo de un animal tras sufrir una lesión tisular, y que van encaminados a restablecer su homeostasis (Kushner *et al.*, 1981).

Esta respuesta no es específica y puede desencadenarse por diversas causas como infecciones, desórdenes inmunológicos, procesos neoplásicos, traumatismos, infecciones parasitarias, quemaduras, estrés, preñez, endotoxemia e intervenciones quirúrgicas (Kushner y Mackiewicz 1987; Gruys *et al.*, 1999; Eckersall, 2000).

Durante el desarrollo de esta respuesta se producen, entre otros cambios, variaciones en los niveles de algunas proteínas plasmáticas, denominándose a éstas de forma general, Proteínas de fase Aguda (PFAs), entre las que se encuentran la proteína C reactiva (CRP), haptoglobina (Hp),

amiloide A sérico (AAS), ceruloplasmina (Cp), fibrinógeno (Fb) y α_1 glicoproteína ácida (AGP) (Eckersall, 2000; Ceron *et al.*, 2005; Crisman *et al.*, 2008).

En perros sanos estas proteínas se encuentran en niveles no detectables o muy bajos; sin embargo, sus concentraciones plasmáticas aumentan rápidamente en respuesta a diversos procesos inflamatorios e infecciosos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

El principal interés de estas proteínas en medicina humana y veterinaria se centra en dos campos:

- Valor diagnóstico como indicador de la presencia de inflamación o infección (Conner y Eckersall, 1988; Conner *et al.* 1989; Eckersall, 1995; Godson *et al.* 1996).
- Utilidad para establecer el pronóstico de procesos infecciosos, para medir la respuesta a diversos tratamientos curativos y como predictoras de la evolución de un proceso patológico en situaciones experimentales (Godson *et al.* 1996).

Por tanto la aparición de un resultado elevado de alguna de estas proteínas en un animal, sería indicativo de que dicho animal no está sano, y constituiría un aviso para la realización de un estudio clínico-diagnóstico más detallado. Además van a tener una importante aplicación en la monitorización de la respuesta a los tratamientos empleados, ayudando a determinar la eficacia de los mismos e incluso a predecir la posible existencia de recidivas (Eckersall, 2000).

Desencadenamiento de la respuesta de fase aguda

La respuesta de fase aguda es la reacción que se produce en el animal como respuesta a disturbios de la hemostasia causados por infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (Kushner *et al.*, 1981).

Las principales funciones de esta respuesta sistémica son (Whicher y Westacott, 1992):

- Proporcionar energía y substratos para la lucha frente a los patógenos invasores.
- Evitar la transferencia de metabolitos necesarios para los patógenos.
- Limitar el daño causado por los patógenos y/o eliminar el tejido dañado o infectado y restaurar el tejido sano.

La RFA se pone en marcha cuando la lesión tisular inducida por inflamación o infección estimula la síntesis de citocinas pro-inflamatorias por parte de los monocitos y macrófagos. Entre las citocinas directamente relacionadas con la RFA se encuentran: interleucina-1 (IL-1),

interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Horadagoga *et al.*, 1994; Webel *et al.*, 1997; Gruys *et al.*, 1999; Eckersall, 2000; Ceron *et al.*, 2005; Crisman *et al.*, 2008).

Las citocinas pro-inflamatorias actúan a través de múltiples vías locales sobre las células que rodean el lugar de la lesión (acción paracrina), y se difunden a la circulación periférica de forma pulsátil, provocando el incremento a nivel sistémico (Eckersall, 2000). Esta RFA sistémica se desarrolla en dos oleadas. La primera se caracteriza por el incremento de la actividad de fibroblastos y células endoteliales en el lugar de la lesión, que a su vez inician la segunda liberación de citocinas. Es la segunda oleada la responsable de los efectos inflamatorios sistémicos (Koj, 1996), así como del incremento de la síntesis hepática de PFAs (Gruys *et al.*, 1994; Van Miert, 1996; Suffredini *et al.*, 1999).

Como se ha citado anteriormente, la respuesta de fase aguda se ve estimulada por la liberación de citocinas, entre las que destacan: la *Interleucina-1* (IL-1), la *Interleucina-6* (IL-6) y el *Factor de Necrosis Tumoral* (TNF- α). Estas citocinas son liberadas por monocitos y macrófagos en el lugar donde se sitúa el foco inflamatorio o infeccioso, y debido a sus acciones paracrinas este aumento inicial va a provocar un incremento sistémico. El aumento de citocinas circulantes provoca la estimulación de la respuesta de fase aguda en el hígado (Suffredini *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2004). En el mecanismo de estimulación hepática para la producción de proteínas de fase aguda se pueden apreciar tres variantes fundamentales según el tipo de citocina implicada (Jensen y Witehead, 1998):

- La **IL-6**, se une a su receptor específico provocando la fosforilación del factor de transcripción, que se trasloca hacia el núcleo donde media para que se produzca la transcripción de los genes que codifican la producción de proteínas de fase aguda.
- La **IL-1** y el **TNF- α** se unen a sus respectivos receptores y causan la degradación del inhibidor del factor de transcripción permitiendo así la producción de este factor y la activación subsecuente de los genes de fase aguda en el núcleo de la célula.
- A su vez la **IL-6** y **TNF- α** estimulan la liberación de ACTH, incrementando de esta forma la liberación de glucocorticoides por parte de las glándulas adrenales. Los glucocorticoides ejercen una doble función contradictoria y todavía no conocida con exactitud ya que por una parte, incrementan el efecto estimulante de las citocinas sobre el hígado, pero a su vez, estabilizan a los monocitos inhibiendo así la liberación de citocinas proinflamatorias (Heinrich *et al.*, 1990).

Determinados procesos inflamatorios locales, que no desarrollan síntomas clínicos ni sintetizan anticuerpos también pueden condicionar una RFA (Suffredini *et al.*, 1999). Al tratarse de una respuesta no específica se puede producir en cualquier forma de daño tisular (Heegard, 2000), induciendo cambios en las PFAs y modificaciones fisiológicas, bioquímicas y nutricionales en el individuo (Gabay y Kushner, 1999). Concretamente, los procesos inflamatorios crónicos, como la artritis, son interpretados como una serie de estímulos inflamatorios consecutivos de forma separada. Generalmente, se observan incrementos de PFAs, aunque inferiores a los que se dan en episodios de inflamación aguda (Sipe, 1985).

Las infecciones bacterianas generalmente conducen a una fuerte RFA sistémica debido a la enérgica reacción de las células del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) (Alsemgeest, 1994; Alsemgeest *et al.*, 1994). De hecho, tanto IL-1 como el TNF- α se sintetizan en respuesta a endotoxinas bacterianas (Schindler *et al.*, 1990; Monshouwer *et al.*, 1996; Werling *et al.*, 1996). Sin embargo, la respuesta en infecciones virales es de menor magnitud (Nakayama *et al.*, 1993; Alsemgeest, 1994; Hofner *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1995). Las citocinas liberadas a partir de las células mononucleares infectadas por virus son los interferones, especialmente el interferon gamma, y desde los tejidos lesionados, el TNF- α y la IL-1. Cuando la destrucción tisular es severa, estas citocinas incrementan notablemente su concentración (Van Reeth *et al.*, 1998).

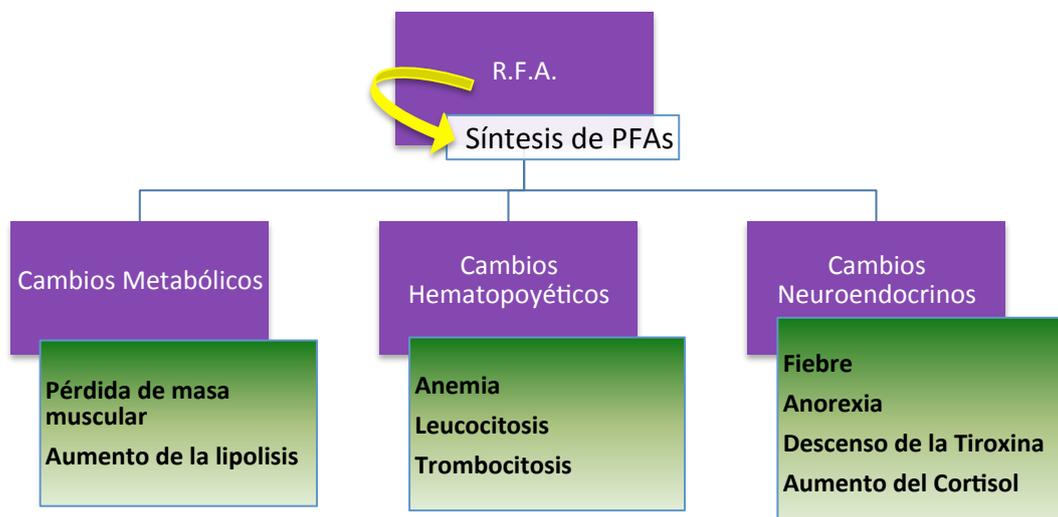
Las citocinas son las responsables de la amplia gama de efectos sinérgicos y antagónicos que determinan el desarrollo de la respuesta inmune específica del organismo frente a antígenos y microorganismos invasores (Van Miert, 1995; Pinelli, 1996), como inducción de la fiebre, anorexia, balance negativo de nitrógeno y catabolismo muscular, activación de precursores de células blancas sanguíneas a nivel medular y desarrollo de fibroblastos y macrófagos a nivel tisular (Dinarello, 1983; Heinrich *et al.*, 1990; Van Miert, 1995; Langhans, 1996).

Por otra parte, las citocinas pro-inflamatorias activan el Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal, reduciendo la hormona de crecimiento e incrementando la ACTH y glucocorticoides (Gruy *et al.*, 1999). Entre los efectos relacionados con estas citocinas se encuentran, disminución de lipoproteínas unidas a colesterol, reducción del volumen plasmático, activación del complemento y del sistema de coagulación sanguínea, fibrinólisis, disminución de los niveles de calcio, hierro y zinc (Gruys *et al.*, 1994; Crisman *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo de la respuesta de fase aguda se liberan citocinas y otros mediadores (Figura 2) que desencadenan, entre otros efectos, la variación de las concentraciones de ciertas proteínas presentes en el plasma, denominadas **Proteínas de Fase Aguda (PFAs)**. En medicina humana, y cada vez más en veterinaria, la monitorización de las concentraciones plasmáticas de

estas proteínas proporciona una valiosa información en diversos problemas patológicos que cursan con inflamación, pudiendo ser utilizada no sólo para el diagnóstico sino también para monitorizar la evolución de la enfermedad y evaluar la respuesta a los tratamientos aplicados.

Figura 2: Cambios durante la respuesta de fase aguda.



Proteínas de fase aguda (PFA)

La respuesta de fase aguda va a alterar la producción y liberación de algunas de las proteínas que son sintetizadas en el hígado, en unos casos incrementando y en otros disminuyendo su concentración plasmática (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Las proteínas de fase aguda se pueden clasificar según dos criterios: el tipo de respuesta cuantitativa ante un estímulo y la función biológica que desempeñan. En base al **tipo de variación de sus niveles** ante un estímulo se diferencian (Tabla 4):

- Proteínas de fase aguda negativas: son aquellas cuyos niveles se ven disminuidos cuando se produce la respuesta de fase aguda (Heinrich *et al.*, 1990). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como la albúmina, la prealbúmina y la transferrina.
- Proteínas de fase aguda positivas: son aquellas cuyos niveles se ven aumentados cuando se produce la respuesta de fase aguda. Aunque existen diferencias entre especies las proteínas de fase aguda positivas se suelen dividir en tres grupos (Kushner *et al.*, 1981):
 - Aquellas cuyos niveles se ven aumentados en un 50%.
 - Aquellas que presentan aumentos de 2 o 3 veces su concentración normal.

- Aquellas que presentan aumentos rápidos de hasta 1000 veces su concentración normal.

Tabla 4: Clasificación de las PFAs en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Proteínas de fase aguda negativas (Descenso de sus niveles)	Proteínas de fase aguda positivas (Aumento de sus niveles)	
Albúmina Prealbúmina Transferrina	PFA principales (aumento hasta 1000 veces)	PFA moderadas (aumento hasta 100 veces)
	Proteína C-reactiva Amiloide A sérico	Haptoglobina Ceruloplasmina α -1 glicoproteína Antiproteasas Fibrinógeno

Según su **función biológica** se diferencian (Kushner y Mackiewicz, 1993):

- Proteínas de Fase aguda que intervienen en la defensa del hospedador. En este grupo se encuadran aquellas proteínas que intervienen en la adaptación o defensa del organismo hospedador frente al patógeno. Dentro se encuentran:
 - **Proteína C reactiva (CRP).**
 - Amiloide A sérico (SSA).
 - Componentes del Complemento.
 - Fibrinógeno.
- Proteínas inhibidoras de las serinproteasas. Estas proteínas juegan un papel muy importante, limitando la actividad de las enzimas liberadas por las células fagocíticas protegiendo así la integridad de los tejidos del hospedador. Dentro de este grupo se engloban:
 - α 1-antitripsina.
 - α 1-antiquimotripsina.
- Proteínas transportadoras con actividad antioxidante. Este grupo de proteínas tiene una importante función protegiendo los tejidos del hospedador de los metabolitos del oxígeno que son liberados por parte de las células fagocíticas durante la inflamación. En este grupo se encuadran:
 - Ceruloplasmina.

- Haptoglobina.
- Hemopexina.

Las proteínas que sufren un mayor incremento son diferentes en cada especie, así en bovino el amiloide A sérico y la haptoglobina se consideran las principales proteínas de fase aguda mientras en el cerdo predomina la CRP y el pig-MAP, y en la especie canina la CRP. En équidos la principal proteína de fase aguda es el amiloide A (Tabla 5).

Tabla 5: Principales PFAs en las diferentes especies (modificado de Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Especie	PFAs Principales (aumentos > 1000 veces)	PFAs Moderadas (aumentos de 2-3 veces)
Hombre	CRP, SAA	α -glicoproteína (AGP), Haptoglobina
Perro	CRP	Haptoglobina
Équido	SAA, CRP	Fibrinógeno
Bovino	Haptoglobina, SAA	AGP, α 1-antitripsina
Porcino	CRP, pig-MAP	Haptoglobina

CRP: Proteína C-reactiva; SAA: Amiloide A Sérico; AGP: α -glicoproteína

El patrón de producción y liberación de estas proteínas es diferente en las distintas especies animales y en los distintos procesos patológicos que puedan padecer, pudiendo incrementar sus niveles hasta 1000 veces durante una infección. La utilidad de la monitorización de sus concentraciones en veterinaria ha sido demostrada en numerosas especies y las investigaciones realizadas en este campo han llevado al desarrollo de diferentes métodos de análisis e incluso en algunos casos de kits comerciales (Concannon *et al.*, 1995; Martínez-Subiela *et al.*, 2002; Matijatko *et al.*, 2002; Martínez-Subiela *et al.*, 2003; Mcgrotty *et al.*, 2003; Tecles *et al.*, 2004; Martínez-Subiela *et al.*, 2004). El principal problema encontrado para el uso habitual de estas proteínas es que existe una escasa comercialización de los kits y que poseen una baja especificidad, ya que hay una gran cantidad de procesos patológicos que pueden producir variaciones de estos analitos. Sin embargo, los resultados derivados de los estudios realizados sugieren que, en el futuro, los análisis de proteínas de fase aguda, pueden tener una aplicación práctica importante en diversos campos como: la valoración del estado sanitario de los animales, detección de procesos subclínicos, control y seguimiento de tratamientos farmacológicos, control sanitario a nivel de matadero y/o monitorización y evaluación del bienestar animal (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Proteína C-Reactiva (CRP)

Fue descubierta en 1930 por William Tillet y Thomas Francis. Se denomina proteína C reactiva porque se detectó en el plasma de pacientes que padecían neumonía pneumocócica y reaccionaba con el polisacárido C del pneumococo.

Es una proteína perteneciente a la familia de las pentraxinas, con un peso molecular de 100 kDa consistente en cinco subunidades polipeptídicas de 20 kDa, unidas por enlaces no covalentes (Caspi *et al.*, 1987; Yamashita *et al.*, 1992). Se sintetiza predominantemente en el hígado y se regula por citoquinas proinflamatorias, tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleukina seis (IL-6) (Aziz *et al.*, 2003). Sus principales funciones biológicas son: activación del complemento y opsonización bacteriana, modulación de monocitos, macrófagos y producción de citoquinas, unión a cromatina bacteriana y prevención de migración tisular de neutrófilos (Petersen *et al.*, 2004).

Su concentración sérica se puede determinar a partir de diversas pruebas como: Elisa, aglutinación reserva rápida en látex, inmunodifusión, electroinmunoensayo y ensayo inmunoturbidimétrico (Hayashi *et al.*, 2001; Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003). Se ha validado para su uso canino un ensayo inmunoturbidimétrico automático para proteína C reactiva sérica humana, lo que constituye un método rápido y rutinario en laboratorios diagnósticos (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003).

Los niveles normales de CRP en suero de perros sanos son <5 g/L (Caspi *et al.*, 1987). Otro rango de referencia descrito es de 0-1 mg/dl (Onishi *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2008). Valores entre 2,2-4,4 mg/L detectaron en un estudio en hembras caninas sanas (Crossley *et al.*, 2010), resultado que coincide con otros autores (Yamashita *et al.*, 1994; López *et al.*, 1998; Martínez-Subiela *et al.*, 2004; Goldsack, 2005), quienes describen valores de hasta 7 mg/L en animales sanos. Por tanto, la CRP está en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos, aumentando su concentración en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Dicha proteína ha sido aislada y caracterizada a partir de suero bovino, pero no responde marcadamente durante la respuesta de fase aguda en esta especie. Sin embargo, su concentración se ve incrementada en leche en animales con mastitis y ha sido introducida como un marcador inflamatorio para controlar el estado de las ubres (Shrödl *et al.*, 1995).

La presencia de esta proteína ha sido documentada en seres humanos, rumiantes, suidos, perros y équidos (Gabay y Kushner, 1999; Murata *et al.*, 2004).

En cerdos y perros se considera como una de las principales proteínas de fase aguda. En el perro se producen de forma rápida aumentos muy evidentes de proteína C- reactiva en respuesta a estímulos como cirugía, inyección de agentes inertes (caseína, turpentina) o infecciones bacterianas (leptospirosis), pudiendo ser esta respuesta incluso más rápida que en humana (Caspi *et al.*, 1987). También se han observado aumentos de esta proteína en Erhlichiosis (Rikihisa *et al.*,

1994), enteritis bacteriana y hemorrágica, tumores, parvovirus (Yamamoto *et al.*, 1993) y en infecciones experimentales con *Bordetella bronchiseptica* (Yamamoto *et al.*, 1994).

Estudios recientes realizados en humanos sugieren a la CRP como potencial biomarcador de un mayor riesgo de cáncer (Allin *et al.*, 2009). En hembras caninas con tumores malignos de la glándula mamaria el aumento de CRP se puede atribuir a una respuesta sistémica a la inflamación (cambios neoplásicos malignos tempranos), ya que las neoplasias malignas pueden estar asociadas con una RFA en ausencia de cualquier otra causa inflamatoria obvia (Lithgow y Covington, 2005; Tecles *et al.*, 2005; Crossley *et al.*, 2010).

Diversos estudios realizados en la mujer han revelado que la CRP se incrementa sustancialmente durante la gestación (Belo *et al.*, 2005; Kristensen *et al.*, 2009; Vonversen-Hoeynck *et al.*, 2009). Este incremento se produce durante el primer trimestre, confirmando la respuesta inflamatoria materna a la gestación (Rebelo *et al.*, 1995; Sacks *et al.*, 2004; Belo *et al.*, 2005). En perras, los estudios relacionados entre la CRP y el ciclo reproductivo mostraron un incremento marcado de CRP hacia los 30-45 días post-ovulación, detectable a partir del día 18-22 tras el pico de LH (Nielsen *et al.*, 1990; Eckersall *et al.*, 1993; Kuribayashi *et al.*, 2003; Ulutas *et al.*, 2009). Este aumento se hace más evidente durante la segunda mitad de la gestación (Eckersall *et al.*, 1993). Por tanto las PFAs podrían ser utilizadas como fuente de diagnóstico de gestación, aunque con cautela, ya que el patrón de liberación difiere entre individuos (Ulutas *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Capilla (2010) demostraron que, en la yegua, las concentraciones de CRP (y de otras PFA como, la haptoglobina y el Amiloide A sérico) durante el ciclo reproductor se encuentran dentro de los rangos fisiológicos de referencia establecidos para esta especie. Además la respuesta inflamatoria a la gestación no mostró modificaciones en las concentraciones de CRP y del Amiloide A sérico (aunque sí un incremento progresivo de las concentraciones de haptoglobina). Así mismo, los perfiles de estas PFAs no presentaron relación temporal con los procesos biológicos que caracterizan la gestación en la yegua. Por este motivo, concluyeron que, las PFAs no pueden ser utilizadas como fuente de diagnóstico de gestación en la yegua.

Otras proteínas de fase aguda

Numerosos estudios demuestran que las distintas proteínas de fase aguda se comportan de modo diferente ante una inflamación y que, a su vez, existen variaciones en la respuesta de fase aguda en las diversas especies animales. En general la síntesis de proteínas de fase aguda se ve estimulada entre 6 y 8 horas después de iniciarse la reacción inflamatoria y llegan a un pico en sus niveles tras 2-5 días (Jain, 1989). En la actualidad no se encuentran en la bibliografía niveles normales o valores de referencia de cada una de las proteínas de fase aguda para cada especie

animal, aunque sí en el perro (Tabla 6). Las razones de este hecho pueden ser que, en algunos casos, como por ejemplo, la haptoglobina en rumiantes, los niveles de estas proteínas no son detectables en animales sanos y, por otra parte, existe una gran variabilidad en los métodos usados para la determinación de las distintas proteínas en los diferentes laboratorios. De esta forma se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia para las proteínas que vaya a determinar (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Tabla 6: Niveles y principales funciones biológicas de PFAs en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Proteínas	Niveles normales en suero canino	Funciones biológicas
Proteína C-reactiva	<5 g/L (Caspi <i>et al.</i> , 1987) 0-1 mg/dl (Onishi <i>et al.</i> , 2000; Nakamura <i>et al.</i> , 2008) 2,2-4,4 mg/L (Crossley <i>et al.</i> , 2010)	Regulación de procesos inflamatorios Defensa frente a microorganismos
Haptoglobina	0-1,69 g/L (Eckersall <i>et al.</i> , 1999)	Unión a hemoglobina libre
Amiloide A Sérico	29,2-69,6 UI/ml (Yamamoto <i>et al.</i> , 1994)	Precursor del Amiloide
Ceruloplasmina	4,31-5,55 mg/dl (Martínez-Subiela <i>et al.</i> , 2002)	Transporte de Cobre Actividad oxidasa
α 1-Glicoproteína ácida	40-1070 mg/L (Thougaard <i>et al.</i> , 1999)	Modulación de la hemostasia Unión a determinadas drogas
Fibrinógeno	0,1-0,4 g/dl (Jain, 1989)	Interviene en la coagulación
Albumina	2,6-3,3 g/dl (Kaneko, 1997)	Regulación de la presión osmótica Transporte de moléculas

g: gramos; mg: miligramos; L: litros; dl: decilitros; ml: mililitros; UI: Unidades Internacionales

PFAs positivas

Haptoglobina (Hp)

Es una glicoproteína plasmática que presenta una estructura tetramérica formada por 2 subunidades α combinadas con 2 subunidades β . Forma un complejo estable al unirse específicamente a la hemoglobina (Makimura y Suzuki, 1980). Este complejo se elimina rápidamente de la circulación por el sistema retículo endotelial (Elson, 1974) y tiene un peso molecular total de 125 kDa (Putnam, 1975). Sus concentraciones plasmáticas aumentan en condiciones inflamatorias o infecciosas, considerándose como una de las principales proteínas de fase aguda en casi todas las especies pero especialmente en vacuno, ya que en condiciones fisiológicas, los niveles de Hp en esta especie no son detectables. Así se han observado aumentos de esta proteína en bóvidos que presentaban diversos problemas patológicos como fiebre aftosa (Höfner *et al.*, 1994), síndrome del hígado graso (Kato y Nagakawa, 1999; Bertoni *et al.*, 2008), diversos desordenes abdominales tratados quirúrgicamente tales como reticuloperitonitis traumática, desplazamiento del abomaso o distocias (Hirvonen y Pyörälä, 1998). También se ha detectado tras la infección experimental con el virus respiratorio sincitial bovino (Heegard *et al.*,

2000), en procesos de mastitis, detectándose en este caso un aumento tanto en suero como en leche (Eckersall *et al.*, 2001; Gronlund *et al.*, 2005). En momentos cercanos al parto, los valores medios gestacionales se incrementan considerablemente (Uchida *et al.*, 1993; Regassa *et al.*, 1999; Furll *et al.*, 2008). En cerdos se ha demostrado que la medición de las concentraciones de haptoglobina ayuda a monitorizar el estado sanitario y el nivel productivo de las explotaciones porcinas (Eurell *et al.*, 1992). Se han observado incrementos de haptoglobina en esta especie en infecciones con *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Hall *et al.*, 1992), *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* tipo D (Van Miert *et al.*, 1996) y *Streptococcus suis* (Toussaint, 2000). Así mismo sus niveles se encuentran correlacionados con las lesiones presentes en animales con rinitis atrófica (Eurell *et al.*, 1990) o neumonía enzoótica (Amory *et al.*, 2000). También en los últimos años se han relacionado sus aumentos con situaciones de estrés como las que se producen en el transporte o el sacrificio de los animales (Piñeiro *et al.*, 2001) y aumentos en suero y leche asociados a mastitis crónicas (Van Gelder y Bilkei, 2005). En perros los niveles de haptoglobina muestran una correlación lineal positiva y un incremento en condiciones inflamatorias y tras la aplicación de corticoterapia (Harvey y West, 1987; Solter *et al.*, 1991). Es más, durante la gestación los niveles de haptoglobina se ven aumentados entre la cuarta y sexta semana, considerando que este parámetro podría ser utilizado como fuente de diagnóstico de gestación durante este periodo (Eckersall *et al.*, 1993; Concannon *et al.*, 1995; Kuribayashi *et al.*, 2003). Su concentración se ve también incrementada en caballos con abscesos de localización profunda, en infecciones bacterianas o víricas (Kent y Goodall, 1991) y durante la fase migratoria de la infestación con *Strongylus vulgaris*. En esta especie se detectan los niveles más altos en el momento del parto, ya que se hipotetiza que los glucocorticoides liberados podrían tener un efecto inductor en la síntesis de esta proteína (Sorrells *et al.*, 2007).

Por otra parte, el análisis de haptoglobina puede ser útil y debe considerarse cuando existen sospechas de la presencia de una anemia hemolítica, ya sea infecciosa, autoinmune o tóxica. Ya que la presencia de un bajo nivel de haptoglobina es, frecuentemente, indicativo de hemólisis intravascular reciente, aunque la ausencia total de haptoglobina puede estar asociada con una lesión hepática grave (Laurell y Grönval, 1962; Mcguire *et al.*, 1969; Lumsden *et al.*, 1975; Kent y Goodall, 1991). Así por ejemplo, se ha puesto de manifiesto la relación existente entre la hemólisis intravascular inducida por el ejercicio y el descenso en los niveles de haptoglobina en el plasma (Tedeschi *et al.*, 2001).

Asimismo la Hp, ejerce un efecto bacteriostático, ya que la formación de complejos Hp-HB limita la disponibilidad del hierro, compuesto esencial para el crecimiento bacteriano. Esta

proteína se relaciona con funciones antioxidantes, inmunomoduladores y antigénicas (Cho *et al.*, 2009).

Amiloide A sérico (SAA)

Es una apolipoproteína que se asocia con las lipoproteínas de alta densidad durante la respuesta de fase aguda (Cooper, 1990; Pannen y Robothan 1995), cuyo peso molecular se estima aproximadamente entre 9 y 11 kDa (Husebekk *et al.*, 1986; Nunokawa *et al.*, 1993).

La isoforma SAA3 se ha aislado tanto en los hepatocitos durante la RFA como en diversos tipos celulares, verificándose la síntesis extrahepática en el tracto digestivo, vías aéreas, glándula mamaria, tejido sinovial, condrocitos y cartílago articular (Jacobsen *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2007). De ahí que los niveles de esta proteína se eleven considerablemente en procesos inflamatorios como artritis y mastitis (McDonald *et al.*, 2001; Jacobsen y Andersen, 2007).

Para monitorizar de forma precisa el proceso inflamatorio y/o infeccioso, los perfiles séricos de SAA son más efectivos, a la hora de reflejar el curso de la inflamación, que los marcadores clásicos de la inflamación como los neutrófilos, ya que presentan una cinética limitada (Jacobsen *et al.*, 2009). Además los niveles de SAA se elevan cuando el proceso inflamatorio está activo, descendiendo tras el cese del estímulo. Así, la recaída o exacerbación de la inflamación irá acompañada de nuevos incrementos, indicando la magnitud de la lesión tisular. En consecuencia, las mediciones repetidas proporcionan un criterio objetivo de valoración del estado de salud, ya que ayudan a supervisar el tratamiento, el grado de recuperación y el retorno a una actividad normal (Jacobsen y Andersen, 2007).

Los niveles séricos de SAA se elevan considerablemente a las pocas horas del establecimiento de una infección, comportándose como indicadores inmediatos de esta patología. Este tipo de respuesta acompaña a infecciones producidas por bacterias (Pepys *et al.*, 1989; Hultén *et al.*, 1999; Heegaard, 2000; Stoneham *et al.*, 2001; Paltrinieri *et al.*, 2008) y virus (Pepys *et al.*, 1989; Hultén *et al.*, 1999).

Esta proteína presenta en bóvidos una gran sensibilidad frente a los cambios inflamatorios. Así se incrementa en diversos procesos como la inoculación con *Pasteurella haemolytica* (Horadagoda *et al.*, 1994), tras infección experimental con el virus respiratorio sincitial bovino (Heegard *et al.*, 2000), tras estrés físico (Alsemgeest *et al.*, 1993) y después de la realización de procedimientos quirúrgicos (Alsemgeest *et al.*, 1992). También se han encontrado niveles elevados de esta proteína en leche de animales con mamitis, permitiendo determinar la gravedad de la misma y llegando a valores de especificidad de un 100% al igual que la haptoglobina

(Eckersall *et al.*, 2001). Se han puesto de manifiesto incrementos de esta proteína en cerdos tras inoculación con *Actinobacillus Pleuropneumoniae*, siendo esta respuesta más rápida que la observada en el caso de la haptoglobina o el pig-MAP (Heegard *et al.*, 2001). En la especie canina ha sido considerado como un biomarcador de infección durante la respuesta a la infección experimental con parvovirus canino (Yule *et al.*, 1997). En équidos se considera la proteína de fase aguda de elección, observándose aumentos en casos de infecciones, bacterianas o víricas ya sean experimentales o naturales, en adultos y neonatos (Pepys *et al.*, 1989; Kent y Whitwell, 1991).

Ceruloplasmina (Cp)

Es una glicoproteína que transporta la mayor parte del cobre sérico. Cada molécula transporta de 6 a 8 átomos de cobre según la especie animal que se considere (Jain, 1993). Se trata de una proteína de fase aguda cuyos aumentos a nivel plasmático, cuando hay un proceso inflamatorio, son leves en rumiantes, cerdos y équidos. Así, su concentración se ve incrementada en terneros tras la administración de endotoxinas pero no en animales infectados con *Pasteurella haemolytica* (Conner *et al.*, 1989). También se ha observado un aumento en sus niveles en vacas que padecían mastitis (Conner *et al.*, 1986), tras infección experimental con *Salmonella dublin* (Piercy, 1979) y tras inoculación nasal del herpesvirus tipo 1 bovino (Arthington *et al.*, 1996). También se ha puesto de manifiesto su utilidad para monitorizar la evolución de la involución uterina tras el parto y en casos de metritis (Sheldon *et al.*, 2001). Su concentración se encuentra elevada en cerdos infectados con *Taenia Solium* (Pathak *et al.*, 1985) y tras la administración de turpentina (Eckersall *et al.*, 1996). También se encuentra incrementada en el suero de caballos varios días después de haber inducido una respuesta inflamatoria con turpentina y se mantiene elevada durante varias semanas (Okumura *et al.*, 1991). Los incrementos de su concentración en perros son mayores y más rápidos que en humana llegando a valores que doblan los normales, tras una cirugía (Conner *et al.*, 1988) y en presencia de diversos procesos inflamatorios como piometras o traumatismos (Solter *et al.*, 1991; Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP)

Es una proteína de fase aguda, altamente glicosilada que posee un elevado contenido en ácido siálico y es el principal componente del seromucoide (fracción del plasma más resistente a la precipitación con ácidos) (Eckersall, 2000).

Se han visto incrementos de esta proteína en diferentes enfermedades que afectan al vacuno como pericarditis traumática, artritis, mastitis, neumonía y theileriosis (Tamura *et al.*, 1989; Glass, 2000). También se considera una proteína de fase aguda en cerdo viéndose su elevación en

animales con enfermedades infecciosas como meningitis o neumonía (Itoh *et al.*, 1992). A su vez se han podido constatar aumentos de esta proteína en la especie canina en casos de Ehrlichiosis (Rikihisa *et al.*, 1994), procesos tumorales (Thougaard, 1999) o tras una cirugía (Conner, 1988), y en équidos en diversas condiciones inflamatorias (Taira *et al.*, 1992).

Fibrinógeno (Fb)

Es una glicoproteína compuesta por dos subunidades cada una de las cuales está formada por tres cadenas polipeptídicas interconectadas por puentes disulfuro (Jain, 1993). Fue durante años la única proteína de fase aguda bien conocida y fácilmente analizable (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

Normalmente circula en plasma niveles uniformes, pero durante la fase aguda de una inflamación se libera en mayor cantidad por los hepatocitos de manera que sus niveles se ven considerablemente aumentados (Cheville, 1988). Este hecho se ha puesto de manifiesto en bovino, observándose el incremento en los valores en diversas condiciones inflamatorias como la peritonitis, endocarditis, pericarditis, neumonía y nefritis (Mcsherry *et al.*, 1970; Sutton y Hobman, 1975). Sin embargo la concentración plasmática de fibrinógeno puede permanecer invariable o descender en esta especie en enfermedades inflamatorias, debido a que su consumo puede exceder a la producción (Welles *et al.*, 1993). También se observa un incremento de esta proteína en caballos con procesos inflamatorios (Van Wuijckhuise-Sjouke, 1984; Auer *et al.*, 1989).

PFA negativa

Albúmina

La albumina es la proteína en mayor proporción en la sangre, se encuentra en la parte plasmática de esta. Es tan importante en el plasma, que su fracción corresponde entre el 50 y 65% de las proteínas totales que circulan en él. Es la responsable de que se mantenga la presión oncótica de la sangre. Por esta razón, si llega a disminuir por diversas razones, el líquido que se encuentra en los vasos sanguíneos (plasma), se desplaza fuera de éste e invade el espacio tisular, haciendo que los tejidos se edematicen (Martínez-Subiela *et al.*, 2001).

La albúmina interviene en el transporte de lípidos en la sangre, y sirve como molécula transportadora de muchas sustancias. Entre sus funciones, destacan: mantenimiento de la presión oncótica, transporte de hormonas tiroideas, transporte de hormonas liposolubles, transporte de ácidos grasos libres (no esterificados), transporte de bilirrubina no conjugada,

transporte de fármacos, unión competitiva con iones de calcio, control del pH, regulador de líquidos extracelulares, funciona como un transportador de la sangre y lo contiene el plasma (Givens, 2005).

Los valores normales de albúmina sérica en perro es de 2,6-3,3 g/dl (Kaneko, 1997). La detección de valores por debajo de este rango, puede deberse a: la disminución de la síntesis de albúmina por parte del hígado (insuficiencia hepática), desnutrición muy grave y pérdidas significativamente importantes de albúmina, principalmente en ciertas patologías del riñón, como es el caso del síndrome nefrótico. También se observa en trastornos digestivos con pérdida de proteínas (sangrados como consecuencia de úlceras, con la concomitante anemia), y en el caso de grandes quemaduras. Y finalmente, también puede observarse disminución de la albúmina en la sangre en el caso de infecciones crónicas importantes o en caso de neoplasias (Mazzaferro, 2010).

Proteínas de fase aguda como método de evaluación de la respuesta inflamatoria en la especie canina

Como ya hemos comentado, las concentraciones de estas proteínas plasmáticas se encuentran en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos; sin embargo aumentan rápidamente en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Tanto en medicina humana, como en veterinaria, estas proteínas poseen valor diagnóstico como indicador de la presencia de inflamación o infección (Eckersall y Conner, 1988; Conner *et al.*, 1989; Eckersall, 1995; Godson *et al.*, 1996).

En la práctica clínica, se emplean de forma rutinaria el fibrinógeno y la albúmina para monitorizar procesos inflamatorios. En la actualidad, la medición de CRP podría ser una herramienta útil en el monitoreo de procesos inflamatorios (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

En medicina humana, la concentración sanguínea de CRP aumenta de 100 a 1000 veces su valor entre las 24-48 horas de la aparición de un proceso inflamatorio. Por lo que se utiliza de forma general como un marcador de la inflamación (Nakamura *et al.*, 2008)

En la especie canina, para determinar la presencia de inflamación, las pruebas que se utilizan habitualmente son el recuento total y el recuento diferencial de leucocitos. Aunque la medición de estos parámetros presenta varios inconvenientes, entre ellos:

- Un proceso inflamatorio, sobre todo si se trata de una inflamación leve, crónica o no invade los tejidos de forma profunda, no siempre conlleva una alteración del leucograma. Por lo que, en estos casos, no sería útil la realización de estas pruebas (Tvedten, 1989).

- Existen patologías localizadas, como el empiema o la piometra, en las que la neutrofilia es más evidente que en infecciones generalizadas o septicemias. Por tanto, la medición del número de leucocitos no permite conocer la gravedad del proceso, ya que no existe una correlación entre el aumento de leucocitos y la severidad del proceso inflamatorio (Duncan *et al.*, 1994).

Las proteínas de fase aguda son consideradas marcadores útiles de la inflamación en diagnóstico clínico, pronóstico y monitoreo de tratamiento en diversas patologías, tanto agudas como crónicas (Martínez-Subiela *et al.*, 2004; Martínez-Subiela y Cerón, 2005). El incremento de los niveles de estas PFA es menor en inflamaciones crónicas que en episodios agudos de inflamación o infección (Cerón *et al.*, 2005).

Está descrito que las concentraciones de CRP se elevan en pacientes caninos con condiciones inflamatorias, como enfermedades infecciosas por leptospira, babesia e infección por parvovirus (Cerón *et al.*, 2005); trauma quirúrgico (Eckersall y Conner, 1988); tumores malignos, como linfoma y hemangiosarcoma (Tecles *et al.*, 2005; Mischke *et al.*, 2007); piometra (Fransson *et al.*, 2004); pancreatitis aguda (Holm *et al.*, 2004); anemia hemolítica inmunomediada, artritis y glomerulonefritis (Onishi *et al.*, 2000). También se ha utilizado para monitorizar la respuesta de la terapia en perros con poliartritis idiopática (Ohno *et al.*, 2007).

En medicina veterinaria, existen estudios que comparan la concentración de CRP con otros parámetros marcadores de procesos inflamatorios, como el recuento de leucocitos y la temperatura corporal. Concluyen que existe correlación entre los 3 parámetros, pero que los niveles de CRP varían más rápidamente que el recuento de leucocitos (Yamashita *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2008), además las concentraciones de CRP son significativamente más altas en pacientes con altos niveles de leucocitos. Por tanto la medición de CRP junto con el recuento de leucocitos debería ser evaluado en pacientes con patología inflamatoria (Nakamura *et al.*, 2008).

La determinación de las PFAs frente a los métodos tradicionales para evaluar la presencia de inflamación presenta una serie de ventajas (Tabla 7), entre las que se encuentran:

- La medición de estas proteínas puede verse menos afectada por estímulos fisiológicos que el recuento de leucocitos, aunque los glucocorticoides exógenos pueden alterar los resultados de algunas proteínas (Harvey y West, 1987).
- Para la detección de procesos inflamatorios, la determinación de la ceruloplasmina y la haptoglobina es 6 veces más sensible que los recuentos de leucocitos y la medición del fibrinógeno (Solter *et al.*, 1991).

- Las PFAs son más estables que los componentes celulares de la sangre, pudiendo realizarse las determinaciones sobre muestras previamente congeladas (Solter *et al.*, 1991).

Tabla 7: Ventajas de la determinación de PFAs como método de evaluación de proceso inflamatorio (modificado de Martínez-Subiela *et al.*, 2004)

Ventajas de PFAs	Desventajas métodos tradicionales
Poco sensibles a estímulos fisiológicos	Variación del leucograma por estímulos fisiológicos
Mayor sensibilidad de detección de procesos inflamatorios	Escasa sensibilidad, sobre todo para detectar procesos inflamatorios leves o crónicos
Permiten determinar la severidad de un proceso	No válidos para detectar la severidad de un proceso
Detectan inflamación en animales con supresión de médula ósea	No válidos en pacientes con supresión de médula ósea
Son estables incluso después de la congelación	Inestabilidad de componentes celulares

Otras aplicaciones clínicas de las Proteínas de Fase Aguda

En el perro la determinación de las proteínas de fase aguda va a ser particularmente útil para (Martínez-Subiela *et al.*, 2004):

- Diagnóstico, pronóstico y evaluación de la respuesta al tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas.
- Diagnóstico y pronóstico de procesos tumorales.
- Detección y evaluación de otros procesos.

Aplicación de las proteínas de fase aguda para el diagnóstico, pronóstico y la evaluación de la respuesta al tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas

Diversos estudios han demostrado las variaciones que experimentan las diferentes proteínas de fase aguda en procesos infecciosos e inflamatorios concretos, así como la utilidad que posee su determinación en estos casos. Entre las patologías estudiadas se encuentran:

- **Leishmaniosis.** Se encontraron niveles altos de haptoglobina, ceruloplasmina y CRP en perros que padecían leishmaniosis mostrándose de esta manera que el parásito es capaz de desencadenar una respuesta de fase aguda en el hospedador. También se ha observado que los perros con síntomas evidentes presentan unos niveles de CRP más elevados que los asintomáticos. Además la determinación de proteínas de fase aguda se ha mostrado más sensible en la detección de los animales infectados con *Leishmania* que el cociente albúmina/globulina o la concentración de gammaglobulinas, no observándose correlación entre los niveles de proteínas de fase aguda y la concentración de

gammaglobulinas, el cociente albúmina/globulina y el título de anticuerpos anti leishmania (Martínez-Subiela *et al.*, 2002).

Adicionalmente se ha comprobado que la monitorización de las concentraciones de CRP y ceruloplasmina, puede ser útil para la evaluación a corto plazo de la respuesta al tratamiento de perros con leishmaniosis, ya que estas proteínas descienden de forma significativa cuando el tratamiento es satisfactorio (Martínez-Subiela *et al.*, 2003).

- **Ehrlichiosis.** Se han detectado aumentos en la CRP y la Alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) durante la fase aguda de la infección, viéndose este aumento en animales infectados de forma natural y experimentalmente (Rikihisa *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 2002). Los niveles máximos que alcanza la CRP en esta enfermedad son menores que los observados en otros procesos como la infección por *Bordetella bronchiseptica* o tras una cirugía, tardando más tiempo en alcanzarse (>4 días en Ehrlichiosis, 1 día en los otros dos procesos). La diferente respuesta podría deberse a que *Ehrlichia canis* posee una tasa de crecimiento lenta, a que se trata de un microorganismo con localización intracelular y que el daño tisular que origina es débil y se produce lentamente. Los niveles de las dos proteínas descienden a la vez que se observa la remisión de los signos clínicos; aunque pueden llegar a alcanzar valores normales aún cuando no se ha conseguido una eliminación del microorganismo y por lo tanto no sirven para detectar cuando el animal está libre de parásito (Cerón *et al.*, 2005)..
- **Tripanosomiasis.** En esta enfermedad se observa una elevación de la CRP llegando a niveles máximos el día 10 postinfección. Los niveles de esta proteína se mantienen elevados mientras el parásito persiste en el organismo del animal, y la vuelta a los niveles normales se produce cuando el parásito es eliminado tras la administración del tratamiento (Ndung'u, 1991).
- **Babesiosis.** Se ha detectado un aumento de la AGP y de la proteína C reactiva en perros con babesiosis, observándose valores de CRP significativamente más elevados en animales con babesiosis severa (Lobetti *et al.* 2000; Matijatko *et al.*, 2002).
- **Infección por *Bordetella bronchiseptica*.** En este caso se observa un incremento en los niveles de Amiloide A sérico llegando a valores entre 9-20 veces mayores que los encontrados en animales sanos 24 h después de la infección (Yamamoto *et al.*, 1994).
- **Leptospirosis.** Se observan aumentos de la CRP con un pico máximo 2-3 días después de la inoculación (Caspi *et al.*, 1987).

- **Enfermedades hepáticas.** La haptoglobina se encuentra elevada en diferentes procesos hepáticos tales como hepatitis aguda, colangiohepatitis crónica, hepatitis crónica no específica y hepatitis crónica progresiva. Por el contrario se observa un descenso de los niveles de esta proteína en perros que presentan cirrosis. Esta disminución puede deberse a la alteración de la función hepática provocada por la cirrosis y que conlleva un descenso en la síntesis de proteínas. La AGP también se encuentra elevada en todos los procesos hepáticos excepto en algunos casos de cirrosis terminal. Este hecho indica otra de las aplicaciones de las proteínas de fase aguda, pues van a permitir diferenciar entre los animales que son capaces de mantener una buena función hepática y aquellos que presentan una función inadecuada o se encuentran en estadios terminales. De esta forma los animales que presenten una buena función hepática serán capaces de desarrollar una respuesta de fase aguda y mantener o elevar los niveles de haptoglobina, AGP y otras proteínas de fase aguda, mientras que los que se encuentren en estado terminal van a presentar un descenso de los niveles de estas proteínas (Sevelius y Anderson, 1995).
- **Enfermedad inflamatoria intestinal.** Las concentraciones medias de CRP y AGP son significativamente más elevadas en animales con enfermedad inflamatoria intestinal comparado con los animales sanos, mostrando los niveles de CRP una elevada correlación con la severidad del proceso. Así mismo se ha comprobado que los valores de CRP descienden en animales que responden de forma satisfactoria al tratamiento, sugiriéndose por tanto, la utilidad de esta proteína para la evaluación de la respuesta al tratamiento de esta enfermedad (Jergens *et al.*, 2003).
- **Endocrinopatías.** Se han detectado aumentos moderados (3-10g/L) de haptoglobina en perros con hiperadrenocorticismos y diabetes no cetoacidótica, y aumentos muy significativos (>10g/L) de dicha proteína en perros con diabetes cetoacidótica (Mc Grotty *et al.*, 2003).
- **Otros procesos inflamatorios.** Se han observado incrementos de ceruloplasmina y haptoglobina en diversos procesos inflamatorios tales como enfermedades del tracto respiratorio o urinario, enfermedades pruríticas de la piel y desórdenes neurológicos (Solter *et al.*, 1991).

Aplicación de las proteínas de fase aguda para el diagnóstico y pronóstico de procesos tumorales en el perro

Los procesos tumorales van a provocar un aumento de las proteínas de fase aguda y la magnitud de éste generalmente va a estar relacionada con el grado de malignidad del tumor y su capacidad para extenderse. Este hecho se ha comprobado en varios tipos de tumores como:

- **Tumor mamario.** Se han encontrado valores de CRP elevados sobre todo en aquellos animales que presentaban tumores malignos con presencia de metástasis (Caspi *et al.*, 1987).
- **Linfoma.** Los niveles de AGP se encontraron elevados en animales que presentaban linfomas en comparación con animales sanos. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los animales con linfoma que presentaban diferentes estadios clínicos (Ogilvie *et al.*, 1993). Por otra parte, los niveles de esta proteína descendieron tras la administración del tratamiento con doxorubicina y se encontraron incrementados 3 semanas antes de que se detectara clínicamente la recaída. Por ello se ha sugerido que la AGP puede ser una herramienta útil para evaluar la respuesta al tratamiento y predecir la posible recaída de un animal incluso antes de que aparezcan los signos clínicos (Hahn *et al.*, 1999).

También se ha observado un aumento significativo de la CRP, haptoglobina, ceruloplasmina y el amiloide A sérico en perros con linfoma o leucemia, descendiendo sus niveles en aquellos animales que presentan una buena respuesta al tratamiento, y manteniéndose elevados en aquellos animales que no muestran una respuesta adecuada a la terapia aplicada (Tecles *et al.*, 2004).

- **Sarcoma, carcinoma, osteosarcoma.** Perros que presentan este tipo de tumores poseen niveles elevados de AGP (Ogilvie *et al.*, 1993).

Aplicación de las proteínas de fase aguda para la detección y evaluación de otros procesos en el perro

Existen diversos procesos no considerados infecciosos o patológicos que van a provocar un aumento de las proteínas de fase aguda. El conocer tanto la existencia de estos procesos como el consiguiente aumento de proteínas de fase aguda que pueden provocar, va a tener una gran importancia, especialmente cuando se utilicen las proteínas de fase aguda para establecer el diagnóstico de una enfermedad concreta, ya que pueden dar lugar a la aparición de falsos resultados positivos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

- **Cirugía.** En la tabla 8 se representan los niveles de CRP en perros sometidos a diferentes intervenciones quirúrgicas. En general, el incremento en la CRP es mayor cuanto más grave es la lesión tisular producida en músculo o médula ósea. También se observaron

aumentos de AGP, ceruloplasmina y haptoglobina tras la realización de cirugía para la colocación de un implante aórtico (Conner *et al.*, 1988).

Tabla 8: Niveles de CRP en intervenciones quirúrgicas en la especie canina (modificado de Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Cirugía	CRP (mg/L) prequirúrgica	CRP (mg/L) postquirúrgica
Ovariohisterectomía	5 (Caspi <i>et al.</i> , 1987)	144 (Caspi <i>et al.</i> , 1987)
	61,4 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)	181,6 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)
Cirugía ortopédica	5 (Caspi <i>et al.</i> , 1987)	83 (Caspi <i>et al.</i> , 1987)
	47,6 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)	383,2 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)
Implante aórtico (Conner <i>et al.</i> , 1988)	0	95
Extracción dentaria (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)	30,5	61,2
Extirpación tumores (Yamamoto <i>et al.</i> , 1993)	78,5	249,2

mg: miligramos; L: litros

- **Administración de fármacos.** Se ha comprobado que la administración de diferentes terapias con glucocorticoides en el perro provoca un incremento en las concentraciones de haptoglobina, no afectando sin embargo a los niveles de CRP, amiloide A sérico y ceruloplasmina (Harvey y West 1987; McGrotty *et al.*, 2003; Martínez-Subiela *et al.*, 2004). Este hecho revela la importancia de conocer si el animal está sujeto a algún tipo de terapia antes de interpretar los resultados analíticos obtenidos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

La administración de antihelmínticos provoca un aumento de los niveles de haptoglobina en el suero (Tosa *et al.*, 1993).

- **Gestación.** El daño que se produce en el endometrio cuando se implanta el embrión, aproximadamente 20 días después de la fecundación, es suficiente para generar una respuesta de fase aguda en la circulación materna y pueden detectarse niveles elevados de CRP (Eckersall *et al.*, 1993), fibrinógeno (Concannon *et al.*, 1995; Hart, 1997), ceruloplasmina y haptoglobina (Vannuchi *et al.*, 2002). Debido a esto el análisis de proteínas de fase aguda podría ser útil como test de gestación en la especie canina (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).
- **Inyección experimental de agentes inertes.**

Inyección de aceite de trementina. La inoculación de este aceite en perros provoca un incremento en la concentración de CRP en el suero llegando a un pico a los dos días después de la inoculación, siendo este pico superior en animales adultos (Hayasi *et al.*, 2001). También provoca el incremento de la AGP alcanzándose un pico en este caso a los 4 días tras la inoculación.

La inoculación de caseína vía intramuscular o subcutánea provoca un incremento en los valores de la CRP, llegando hasta niveles de 260 mg/l a las 24 horas (Caspi *et al.*, 1987).

La aparición de un resultado elevado de alguna de estas proteínas en un animal, sería indicativo de que dicho animal no está sano, y constituiría aviso para la realización de un estudio clínico-diagnóstico más detallado. Además van a tener una importante aplicación en la monitorización de la respuesta a los tratamientos empleados, ayudando a determinar la eficacia de los mismos e incluso a predecir la posible existencia de recidivas (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Por tanto, las proteínas de fase aguda pueden tener una gran utilidad clínica en la valoración general del estado de salud de los animales, habiéndose afirmado incluso que, en el futuro dichas proteínas deberán ser incluidas como un parámetro de rutina en los perfiles bioquímicos realizados en la especie canina (Eckersall, 2004).

Materiales y Métodos

Materiales

Este trabajo continua con la línea de investigación sobre la aplicación de los factores de crecimiento, siendo tremendamente atractiva en el contexto de la investigación tanto en medicina humana como veterinaria y establece una metodología de trabajo de la que nacerán numerosos estudios.

Las instalaciones y las condiciones de hospitalización, así como el protocolo de trabajo y manipulación de los animales han sido aceptados por el Comité de Ético y de Bienestar Animal de la Universidad CEU Cardenal Herrera, siguiendo las normas referentes a 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).

La experiencia fue planteada en tres fases, entre las cuales hubo un mes de descanso para permitir la recuperación de los animales. Debido a que fueron utilizados los mismos 8 perros en los 3 grupos de estudio (grupos 1, 2 y 3).

Para este trabajo se emplearon 8 animales sanos de diferentes edades, sometidos durante 8 semanas (56 días) a cada una de las 3 fases experimentales en las que se dividió este trabajo, con el fin de comparar los 3 grupos de estudio.

Modelo animal

En la presente Tesis doctoral, el animal de estudio fue la especie canina (*Canis familiaris*) de raza Beagle, tanto machos como hembras, cuya procedencia fue la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

A la hora de incluir a los perros en el estudio debían ser animales sanos, esto se evidenció con dos evaluaciones: en primer lugar, un examen clínico completo (exploración física general y valoración de constantes vitales), un hemograma, panel bioquímico básico, electrolitos y una serología (Tabla 9). En segundo lugar, cabe destacar que todos los animales fueron sometidos a una medición de la Proteína de Fase Aguda C-reactiva (CRP), estando ésta dentro de niveles normales para la inclusión del paciente en el trabajo.

Tabla 9: Parámetros hematológicos, bioquímicos y serológicos.

Hematología	Bioquímica	Serologías
Leucocitos (mil/ μ l)	Creatinina (mg/dl)	Leishmania
Eritrocitos (mill/ μ l)	Albúmina (mg/dl)	Ehrlichia canis
Hemoglobina (g/dl)	Calcio (mg/dl)	Borrelia
Hematocrito (%)	Amilasa (U/l)	Dirofilaria
MCV (fl)	CK (U/l)	Enfermedad de Lyme
MCH (pg)	Colesterol (mg/dl)	Electrolitos
MCHC (g/dl)	ALP (U/l)	Na ⁺ (mmol/l)
Plaquetas (mil/ μ l)	Fósforo (mg/dl)	K ⁺ (mmol/l)
Linfocitos (%)	GGT (U/l)	Ca ⁺ (mmol/l)
Monocitos (%)	Glucosa (mg/dl)	Cl ⁻ (mmol/l)
Eosinófilos (%)	AST (U/l)	Lactato (mmol/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; CRP: proteína C-reactiva.

De un grupo inicial de 16 perros de raza Beagle, se escogieron 8, 4 machos (3 enteros y 1 castrado) y 4 hembras (2 enteras y 2 castradas), de edades comprendidas entre los 36-129 meses

y un peso de 10 a 24 kg (Tabla 10). Se estudiaron los mismos pacientes en cada grupo, con un mes de descanso.

Tabla 10: Datos iniciales de los animales incluidos en el estudio

	Perro	Chip	♀/♂	Edad inicio estudio(meses)	Peso (kg)	Castrado
1	LLUNA	985120012837677	♀	120	13,4	Si
2	LIA	941000002332205	♀	48	17,7	No
3	BARRU	941000002290949	♂	48	20,35	No
4	TREPPY	724098101229269	♀	120	15,9	Si
5	NIEBLA	941000011503744	♀	36	11,35	No
6	BILBO	985120016048442	♂	120	17,55	Si
7	BUFO	941000002311041	♂	48	19,1	No
8	JUNIOR	941000002348830	♂	48	19,4	No

♂. Macho. ♀ Hembra

Equipos

Centrífuga PRGF (Centrífuga BTI PRGF SYSTEM®, Vitoria, España).		Centrífuga (Centrífuga P Selecta®, JP Selecta S.A, Barcelona, España).	
Máquina de hematología sanguínea (Celltac α hematology analyzer® 6318 J/K NIHON KOHDEN, Japan).		Máquina de Bioquímica sanguínea (Metrolab 2300®, Random Access Clinical Analyzer, Buenos Aires, Argentina).	
Sistema inmunoenzimático automatizado para IGF-I (Immulite, Siemens Health Diagnostics®, Deerfield, IL, USA)		Sistema de ensayo inmunturbidimétrico automático para proteína C-reactiva sérica humana (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan's mills, Co. Clare, Ireland)	
Ecógrafo (ESAOTE MyLab60®, S.p.A, Italia).		Tomografía axial computerizada (CT MAX®, General Electric, Madrid, España).	

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>Tubos sin anticoagulante de 5 ml (BD. Vacutainer®, Plymouth, UK).</p>		<p>Tubos estériles (PRGF Fractionation tube no additive®, BTI, Vitoria, España).</p>	
<p>Catéter central (Certofix® Mono 18G, B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>		<p>Agujas de 20G (Sterican®, B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>	
<p>Jeringuillas de 2, 5 y 10 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>	

Soluciones y Fármacos

<p>Solución Salina Fisiológica Braun (ClNa 0,9%®. B-Braun, Rubí, Barcelona, España).</p>		<p>Clorhexidina jabonosa (Desinclor®, Clorhexidina Digluconato 4%, AGB, Madrid, España).</p>	
<p>Clorhexidina en solución (Desinclor®, Clorhexidina Digluconato 5%, AGB, Madrid, España).</p>		<p>Alcohol etílico 96º (Alcohol 96º Cidar®, Murcia, España).</p>	
<p>Cloruro cálcico (CaCl₂®, B-Braun, Melsungen, Alemania)</p>		<p>Medetomidina (Domtor®, EsteveVeterinaria, Madrid, España).</p>	
<p>Morfina (Cloruro mórfico 2%®, B-Braun, Melsungen, Alemania).</p>		<p>Midazolam (Midazolam Hospira 1mg/ml®, Roche, Madrid, España).</p>	
<p>Kit de Leishmania® (Snap Leishmania®, Idexx Laboratories, Hoofddorp, Holanda).</p>		<p>Kit diagnóstico ehrlichia (Canine Snap 4x®, Idexx Laboratories, Hoofddorp, Holanda).</p>	

Instalaciones

Los pacientes eran trasladados desde la Granja Docente y de Investigación de la Universidad CEU Cardenal Herrera al Hospital Clínico Veterinario de esta Universidad, donde eran estabulados de forma individual en una habitación controlada durante los días de estudio y desde 3 días anteriores al mismo para su aclimatación. Tenían acceso *ad libitum* al agua y eran alimentados dos veces al día con 150 gr del mismo pienso comercial (Hill's® perro adulto). Además se sacaban a pasear 3 veces al día, siempre por el mismo personal, con el fin de que se acostumbraran al manejo y facilitar así las manipulaciones necesarias.

El control de los animales se llevó a cabo con la realización de una ficha diaria (Tabla 11).

Tabla 11: Control de los animales en las instalaciones.

	Perro	Chip	Peso	Bebe	Come	Paseo	Observaciones
1	LLUNA	985120012837677					
2	LIA	941000002332205					
3	BARRU	941000002290949					
4	TREPPY	724098101229269					
5	NIEBLA	941000011503744					
6	BILBO	985120016048442					
7	BUFO	941000002311041					
8	JUNIOR	941000002348830					

Métodos

Diseño experimental

Se realizó un estudio experimental doble ciego para evaluar la aplicación de PRGF sobre los niveles de IGF-I y CRP en el perro. El estudio se planteó en 3 grupos diferentes, donde los mismos animales fueron sometidos a 3 protocolos distintos:

- Lote 1: **PCB**: 8 animales a los que se inyectó, en músculo sano, solución salina (1ml) más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,05 ml).
- Lote 2: **PRGF**: 8 animales a los que se les inyectó una dosis normal (1 ml) de PRGF más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,05 ml).
- Lote 3: **HPRGF**: 8 animales a los que inyectamos una dosis exagerada de PRGF (3 ml) más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,15 ml).

Para ello se tomó una muestra sanguínea una vez inyectado el producto, SSF/PRGF/HRGF, según el grupo de estudio, en los tiempos que se describen a continuación:

- Basal (**B**): antes de la extracción de la sangre para la obtención del plasma rico en Factores de Crecimiento.
- 1 minuto (**1'**): justo después de la inyección intramuscular del producto.
- 15 minutos (**15'**): tras la infiltración del producto.
- 30 minutos (**30'**): desde la aplicación del producto.
- 1 hora (**1h**): tras la inyección intramuscular del preparado.
- 6 horas (**6h**): después de la aplicación del producto.
- 12 horas (**12h**): posteriores a la infiltración intramuscular.
- 24 horas (**24h**): desde la inyección del producto.
- 7 días (**7d**): después de la aplicación del preparado.
- 14 días (**14d**): tras la infiltración del producto.
- 21 días (**21d**): desde la infiltración intramuscular.
- 28 días (**28d**): posteriores a la aplicación del producto.
- 35 días (**35d**): después de la inyección intramuscular.
- 42 días (**42d**): tras la inyección intramuscular del preparado.
- 49 días (**49d**): después de la aplicación del producto.
- 56 días (**56d**): posteriores a la infiltración intramuscular del preparado.

Preparación del paciente

Veinticuatro horas antes de la realización del estudio y con un periodo de ayuno sólido de 12 horas y líquido de 2 horas, procedimos a la sedación de los animales, previamente pesados, mediante punción intramuscular de medetomidina, morfina y midazolam a las dosis de 0,01 mg/kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente (Figura 3a), para la colocación de un catéter central en la vena yugular izquierda en condiciones estrictas de asepsia (Figura 3b). Este se mantuvo hasta el día 3 del procedimiento, con el fin de obtener las primeras muestras sanguíneas con el menor trauma posible y facilitar la extracción del volumen de sangre necesario para la obtención del PRGF. A partir del día 7, la recolección de sangre se realizó mediante venopunción yugular directa (Figura 11), alternando ambas venas yugulares en las diferentes semanas.

Figura 3: Sedación del paciente (a) y colocación de catéter central (b).



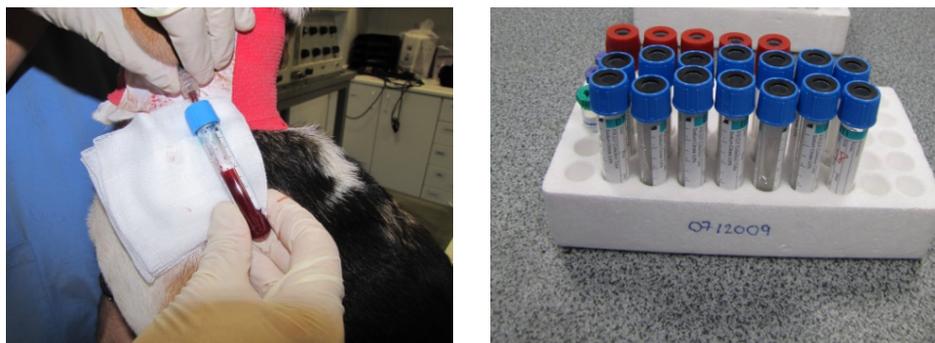
Descripción de la técnica

Obtención del PRGF

La metodología empleada para la obtención y preparación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento ha sido el método publicado por Anitua (2007) para su uso en medicina humana, empleando material de PRGF®-Endoret®, que se describe a continuación:

- **Extracción:** de cada uno de los perros se extrajeron a través del catéter yugular (Figura 4a), la cantidad de sangre necesaria para la obtención del PRGF necesario en cada grupo y para una muestra que se analizó posteriormente en el laboratorio. Estas muestras se depositaron en tubos de citrato sódico de cristal de 4,5 ml (Figura 4b).

Figura 4: Extracción sanguínea para la preparación de PRGF (a), colocación en tubos de citrato sódico (b)



- **Centrifugación:** se llevó a cabo una única centrifugación de las muestras sanguíneas a 460g durante 8 minutos, ya que se emplearon tubos de 4,5 ml (Figura 5a), obteniendo 2 fracciones diferentes (Anitua *et al.*, 2007) (Figura 5b):

- 1ª fracción. Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (**PP**): los 60 μ L superiores por cada 100 μ L de plasma.
- 2ª fracción. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (**PR**): los 40 μ L inferiores por cada 100 μ L de plasma, sin incluir el “*buffy-coat*.”

Figura 5: Centrifugación muestras sanguíneas (a) y aspecto del plasma tras el centrifugado (b).



- **Pipeteado:** el procedimiento de extracción de las fracciones plasmáticas se realizó bajo las máximas condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (Cabina de flujo laminar vertical con seguridad biológica clase II®, Telsar Bio II A, Telsar Life Science Solutions, Barcelona, España) y siempre por el mismo individuo (Figura 6). 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.

Figura 6: Extracción de PRGF en Cabina de flujo para la obtención de PRGF.



- **Activación:** 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 Cálculo (Figura 7) (50 μ l en grupo 2 y 150 μ l en grupo 3) con el fin de lograr la

degranulación de las plaquetas que permite la liberación de los Factores de Crecimiento (Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004).

Figura 7: Material necesario para la activación del PRGF



Aplicación del PRGF

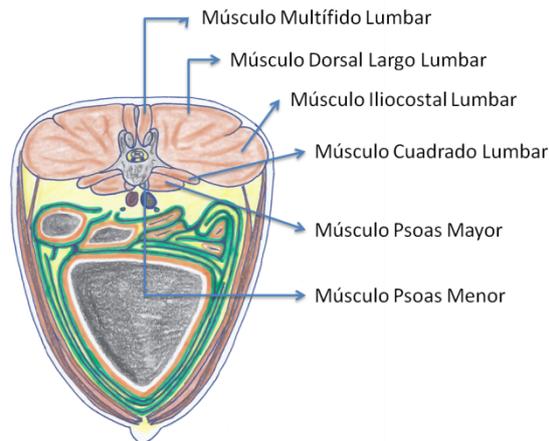
Previamente a la inoculación, se preparó la zona a nivel lumbar mediante el rasurado de la misma (Figura 8) con máquina eléctrica y la posterior desinfección con un lavado con solución de clorhexidina jabonosa y limpieza de la zona con clorhexidina.

Figura 8: Depilación y limpieza de la zona de infiltración.



La zona de inoculación fue el lado izquierdo de la musculatura lumbar a nivel de la 5ª vértebra lumbar, de este modo nos encontramos con los siguientes músculos de medial a lateral: multifido lumbar, dorsal largo lumbar e iliocostal lumbar (Figura 9).

Figura 9: Esquema de un corte transversal a nivel de la 5ª vértebra lumbar donde se puede apreciar la musculatura de la zona de infiltración.



Con el animal de pie sobre la mesa de exploración se inyectó en condiciones de estricta esterilidad y con agujas de 20G y jeringas de 5 ml (Figura 10):

- **Grupo PCB:** 1 ml de SSF activado con cloruro cálcico (0,05 ml).
- **Grupo PRGF:** 1 ml de PRGF activado con cloruro cálcico (0,05 ml).
- **Grupo HPRGF:** 3 ml de PRGF activado con cloruro cálcico (0,15 ml).

Figura 10: Posición del paciente para la inoculación de PRGF



Obtención de las muestras sanguíneas

La obtención del PRGF se realizó en las instalaciones de laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera mediante la técnica citada en el apartado anterior.

Las muestras para la valoración de los niveles de IGF-I y CRP se realizaron en los tiempos: basal (justo antes de la extracción de la sangre para la preparación del PRGF), y en los siguientes tiempos pos inyección: 1', 15', 30', 60', 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días.

Previamente a la extracción, se rasuró la zona yugular con máquina eléctrica y se desinfectó con clorhexidina jabonosa, alcohol etílico 96º y clorhexidina en solución.

Para la obtención de sangre de la vena yugular (Figura 11), se utilizaron agujas de 20G y jeringuillas de 5 ml.

La sangre se depositó en tubos sin anticoagulante con un volumen de 5 ml. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos (Crossley *et al.*, 2010), y posteriormente pipeteado y almacenado en tubos eppendorf.

Las muestras se conservaron en congelación a -20ºC en tubos eppendorf y posteriormente se envió al laboratorio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde fueron analizadas.

Figura 11: Venopunción yugular



Procesado de las muestras sanguíneas

Todas las muestras del estudio se analizaron en el laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

La IGF-I se analizó mediante un sistema inmunoenzimático automatizado previamente validado para su uso óptimo en el perro. Además, se determinó la concentración de la CRP mediante un sistema de ensayo inmunturbidimétrico automático para CRP sérica humana, que ha sido validado para mediciones de concentración sérica de esta proteína en caninos (Martínez-Subiela y Cerón, 2005).

Evaluación del PRGF

Al mismo tiempo, se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar y comparar la calidad del PRGF en los tres grupos.

Para ello se recolectaron 3 muestras de cada animal, en cada grupo estudiado, con la finalidad de comparar la composición entre sangre entera (SE), en el Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PP) y en el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PR).

La sangre se depositó en tubos de EDTA y fue directamente analizada. Se separaron el PPGF y el PRGF y se colocaron en tubos eppendorf, para analizarlos antes de la activación.

El estudio consistió en contrastar la concentración de plaquetas, IGF-I, glóbulos blancos y el valor hematocrito entre las 3 muestras y los 3 grupos.

Estudio por imagen

Con la finalidad de valorar la evolución del volumen de la musculatura tras la inoculación de SSF o plasma, en los diferentes lotes, se procedió a la realización de un estudio ecográfico y un estudio por tomografía axial computarizada (TC). El efecto local de la infiltración se valoró con la evolución en el tiempo del volumen del lado afectado y con la comparación con el lado contralateral. Además se evaluó el posible efecto sistémico.

Ecografía

En cuanto a la ecografía, se realizaron cada semana durante las 8 semanas que duraba el estudio de cada grupo, de manera que se obtuvieron imágenes en basal, 1 minuto, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días tras la inoculación del SSF o preparado rico en plaquetas.

Para la realización de las imágenes ecográficas, con el animal despierto, se mantuvo sujeto por un clínico, de pie en la mesa de exploración, con el cuello estirado y manteniendo la columna lo más recta posible (Figura 12).

Figura 12: Posición del paciente en ecografía



Se tomaron tres puntos de referencia para la obtención de las imágenes ecográficas:

- L4: En el espacio intervertebral entre la 4ª y 5ª vértebras lumbares.

- L5: En el punto medio de la 5ª vértebra lumbar.
- L6: En el espacio intervertebral entre la 5ª y 6ª vértebras lumbares.

En cada uno de estos puntos se obtuvieron 3 imágenes de cada uno de los lados (derecho e izquierdo). Seguidamente, y con el fin de obtener una medida lo más precisa posible, se procedió al cálculo de la media aritmética de las 3 medidas de cada nivel.

Tomografía Axial Computerizada (TC)

En el caso de la TC se llevó a cabo con un intervalo de 14 días dentro de los 56 días de estudio. De manera que se obtuvieron medidas en basal, 14, 28, 42 y 56 días.

Antes de la realización de la TC se procedió a la sedación de los animales con medetomidina, morfina y midazolam a las dosis de 0,01 mg /kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente, en inyección intramuscular.

Una vez sedado, se posicionó al paciente en la mesa en decúbito esternal y manteniendo la columna recta (Figura 13).

Figura 13: Posición del paciente para la TC



Al igual que en el caso de las ecografías se tomaron tres puntos de referencia para la obtención de las imágenes ecográficas:

- L4: En el espacio intervertebral entre la 4ª y 5ª vértebras lumbares.
- L5: En el punto medio de la 5ª vértebra lumbar.
- L6: En el espacio intervertebral entre la 5ª y 6ª vértebras lumbares.

De cada una de las imágenes se obtuvieron las medidas correspondientes a los dos lados.

Procesado de las imágenes

Una vez obtenidas las imágenes, tanto las realizadas por ecografía como por TC, se guardaban en formato *jpg* para su posterior evaluación.

Las mediciones del área muscular se llevaron a cabo con el programa Image Pro-plus® (for Windows 2000, Maryland, EEUU) mediante un lápiz sensible a la presión que incorpora una tableta adaptable al ordenador con cable USB (Bamboo® Fun Pen & Touch, 2010, Wacom Company). Se obtuvieron los resultados de las áreas en píxeles, y posteriormente se convirtieron a centímetros cuadrados (cm^2) según la escala de cada una de las imágenes.

En todas las imágenes, se llevó a cabo la medición del grupo muscular lumbar (Multífido, Dorsal largo e Íliocostal), de ambos lados (derecha e izquierda). Se realizó la medición total del área de cada una de las 3 imágenes obtenidas en cada nivel de estudio (L4, L5, L6) de los músculos de la zona tanto del lado derecho como del izquierdo. De manera que se obtuvo un total de 6 medidas por cada paciente y día de estudio tanto en ecografía (Figura 14a) como en TC (Figura 14b).

Figura 14: Esquema de la medida de las imágenes ecográficas (a) y por TC (b) obtenidas con el programa Image Pro-Plus®



Estudio estadístico

Los datos se analizaron con el programa informático SPSS 15.0 para Windows (Chicago, EEUU). Todas las variables continuas se evaluaron con un test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para comprobar su normalidad, y en caso de necesidad se realizó una transformación logarítmica para los cálculos estadísticos. Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral se han analizado en varios apartados diferentes, para todos ellos se ha tomado una $p < 0,01$ como diferencias estadísticamente significativas.

Estudio descriptivo de los pacientes: Se realizó un estudio descriptivo del peso y la edad de cada uno de los animales en cada grupo de estudio. Los datos obtenidos se compararon con un Anova de un factor y un test posthoc de Tuckey para comprobar las diferencias entre los grupos y los tiempos. A su vez se realizó un estudio descriptivo del estado analítico de los animales antes de ser incluidos en el estudio.

Análisis del Plasma Rico en Factores de Crecimiento: Se analizaron en los tres grupos las diferencias existentes entre la sangre entera (SE), el Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PP) y el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PR). Para ello se realizó un estudio a través de un Modelo Lineal General de Medidas repetidas con un test posthoc de Tuckey en la concentración de plaquetas, IGF-I y Leucocitos, así como en el valor hematocrito.

En cuanto a los estudios realizados sobre el Factor de Crecimiento Insulínico tipo I (IGF-I) y la Proteína C-Reactiva (CRP), en primer lugar se realizó el estudio descriptivo en cada una de las variables en los 3 grupos y su evolución en el tiempo. En segundo lugar, para valorar la existencia de diferencias entre los grupos y los tiempos de estudio se realizó un Modelo Lineal General de Medidas repetidas con un test posthoc de Tuckey. Para comprobar la influencia del sexo se realizó un Análisis Univariante. Para valorar la influencia de la edad, se dividió a los animales en dos grupos, menores de 8 años (adultos jóvenes) y mayores de 8 años (adultos), y al igual que en el caso anterior se realizó un Análisis Univariante con la edad como factor de estudio. Para el estudio del peso, éste se incluyó como covariable (ya que se trata de una variable continua que se modificaba en cada uno de los días de estudio) dentro de un Analisis Univariante. Al ser un factor de tanta variabilidad se realizó también un estudio de la correlación existente entre éste y la IGF-I, con un test de correlación de Pearson.

Además se ha realizado un estudio sobre la correlación existente entre las dos variables del estudio, IGF-I y CRP, para ello se realizó un test de correlación de Pearson.

En relación a las medidas obtenidas por ecografía y por TC, primero se realizó un estudio descriptivo de cada una de las medidas obtenidas en cada grupo, en cada uno de los niveles (L4, L5, L6) y en cada uno de los lados (derecho e izquierdo) y su evolución en el tiempo. En segundo lugar, para valorar la influencia local de la aplicación de PRGF sobre el músculo, se realizaron comparaciones con Anova de un factor para el grupo y el tiempo, con test posthoc de Tuckey. En el estudio de la influencia sistémica de la aplicación de PRGF sobre el músculo, se compararon las mediciones del tamaño muscular del lado infiltrado con el contralateral en cada una de las zonas de estudio (L4, L5, L6) y su evolución en el tiempo, mediante un Anova de un factor y un test posthoc de Tuckey.

Resultados

Resultados

A continuación se relacionan los datos obtenidos durante la fase experimental en los diferentes protocolos, recogidos en tablas y figuras. Inicialmente se realizó un test de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de las variables y realizar una transformación logarítmica en caso necesario. En esos casos los estudios estadísticos se han realizado con la variable logarítmica, mientras que los valores expuestos, y las figuras se han realizado con los valores reales de cada variable. 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 $p < 0,01$.

Las claves utilizadas han sido:

- IGF-I: Factor de Crecimiento Insulínico Tipo I.
- CRP: Proteína C-Reactiva.
- PCB: Placebo (lote 1).

- PRGF: Plasma rico en Factores de Crecimiento (lote 2).
- HPRGF: Altas dosis de Plasma rico en Factores de Crecimiento (lote 3).
- SE: Sangre entera.
- PR: Plasma rico en factores de crecimiento.
- PP: Plasma pobre en factores de crecimiento.
- TC: Tomografía Axial Computerizada
- L4: Medidas tomadas por ecografía y TC a nivel del espacio entre L4-L5.
- L5: Medidas tomadas por ecografía y TC en el centro de L5.
- L6: Medidas tomadas por ecografía y TC a nivel del espacio entre L5-L6.
- DE: Desviación estándar.
- N: Tamaño de la muestra.
- Sig: Significación.
- B: Basal.
- X': X minutos.
- h: Horas.
- d: Días.
- Kg: Kilogramos.
- μg o mcg: Microgramos.
- ng: Nanogramos.
- cm^2 : Centímetro cuadrado.
- U: Unidades.
- l: Litro.
- dl: Decilitro.
- ml: Mililitro.

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

- Estudio descriptivo de los pacientes.
 - Edad de los animales incluidos en el estudio durante las fases de estudio.
 - Peso de los pacientes y su evolución durante los tiempos de estudio. Evolución del peso en el tiempo en cada grupo y estudio comparativo entre ellos.
 - Estado analítico de los pacientes antes del estudio.

- Estudio descriptivo y comparativo de las características del plasma rico en factores de crecimiento, con el plasma pobre en factores de crecimiento y la sangre.
 - Estudio de la cantidad de plaquetas.
 - Estudio de la cantidad de IGF-I.
 - Estudio de la cantidad de leucocitos.
 - Estudio del valor hematocrito.
- Estudio descriptivo y comparativo de la evolución de la IGF-I en el tiempo en cada uno de los lotes de la investigación. Estudio sobre la influencia del sexo, peso y edad en la concentración de IGF-I.
- Estudio descriptivo y comparativo de la evolución de la CRP en el tiempo en cada uno de los lotes de la investigación. Estudio sobre la influencia del sexo, peso y edad en la concentración de CRP.
- Estudio de la relación existente entre las dos variables del estudio, IGF-I y CRP.
- Estudio descriptivo y comparativo de las medidas obtenidas por ecografía:
 - Estudio de la influencia local de la aplicación de PRGF sobre el músculo. Comparaciones del tamaño muscular sobre el lado de la aplicación y su evolución en el tiempo.
 - Estudio de la influencia sistémica de la aplicación de PRGF sobre el músculo. Comparaciones del tamaño muscular con el lado contra lateral y su evolución en el tiempo.
- Estudio descriptivo y comparativo de las medidas obtenidas por tomografía axial computerizada:
 - Estudio de la influencia local de la aplicación de PRGF sobre el músculo. Comparaciones del tamaño muscular sobre el lado de la aplicación y su evolución en el tiempo.
 - Estudio de la influencia sistémica de la aplicación de PRGF sobre el músculo. Comparaciones del tamaño muscular con el lado contra lateral y su evolución en el tiempo.

Exclusión de animales durante el estudio

En los 3 grupos de estudio se utilizaron los mismos 8 perros de raza Beagle.

Durante el estudio tuvo que ser descartado 1 animal en cada uno de los grupos por diferentes alteraciones fisiológicas, como fueron, una hernia discal, alteraciones gastrointestinales y una artritis secundaria a un traumatismo.

De esta manera todos los grupos quedaron compuestos por un total de 7 perros. Todos los resultados que se presentan a continuación no contienen los datos de estos animales.

Estudio de los pacientes

A continuación se presenta el estudio descriptivo de los pacientes durante el desarrollo de cada uno de los grupos de estudio. En primer lugar los datos obtenidos de la edad de los pacientes, en segundo el estudio de los pesos y sus variaciones a lo largo de este trabajo, así como un estudio comparativo entre ellos. Por último se presentan los resultados descriptivos del estado analítico de cada paciente en el momento de su inclusión en la investigación.

Edad

En la tabla siguiente se describe la edad en meses de los animales el primer día de cada uno de los 3 grupos en los que se dividió la parte experimental (Tabla 12).

Tabla 12: Edad en meses de los 3 grupos de estudio

Perro	Lote1	Lote2	Lote3
1	120	123	126
2	48	51	54
3	48	51	54
4	120	123	126
5	36	39	42
6	120	123	126
7	48	51	54
8	48	51	54
Media±DE	73,5±38,8	76,5±38,7	79,4±38,9

DE: desviación estándar

Peso

Durante la realización de este estudio y en cada uno de los 3 lotes los animales se pesaban antes de cada toma de muestra.

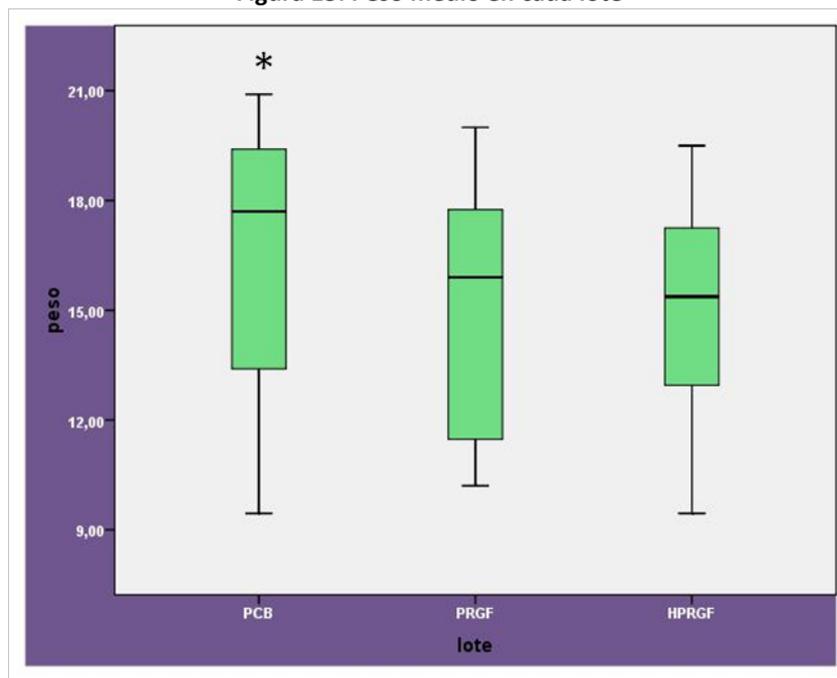
Los pesos medios de los grupos se han comparado para evaluar las diferencias entre los tres lotes. Los resultados se muestran en la tabla 13 y en la gráfica 15.

Tabla 13: Peso medio en kg de los animales en cada grupo durante el estudio.

Lote	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
PCB	7	16,9786	3,34326	13,8866	20,0706	11,35	20,35
PRGF	7	14,7571	3,17115	11,8243	17,6900	10,20	17,80
HPRGF	7	14,8857	2,54275	12,5341	17,2374	11,50	18,00
Total	21	15,5405	3,06568	14,1450	16,9360	10,20	20,35

PCB: Placebo; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; HPRGF: Altas dosis de Plasma Rico en Factores de Crecimiento; N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 15. Peso medio en cada lote



* Diferencias estadísticamente significativas. $P=0,000$.

Como se aprecia en la gráfica existen diferencias entre grupo placebo y los otros dos. Se aprecia que el peso de los animales se ha modificado ligeramente a lo largo de los meses del estudio. La evolución de esta variable a lo largo del tiempo aparece en las tablas siguientes (Tablas 14, 15 y 16).

Tabla 14: Peso en Kg de los perros en el lote 1

Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	Media±DE
B	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
1'	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
15'	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
30'	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
1h	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
6h	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
12h	13,40	17,70	20,35	-	11,35	17,55	19,10	19,40	17±3,3
24h	12,95	18,15	20,80	-	10,45	18,20	19,45	20,10	17±3,3
7d	12,10	17,70	19,40	-	9,55	16,90	19,10	19,50	16,3±3,8
14d	12,90	18,30	20,30	-	10,35	17,50	20,70	20,00	17,2±3,9
21d	13,70	18,05	20,00	-	9,65	18,20	20,20	20,80	17,2±3,9
28d	12,25	18,70	20,20	-	10,50	16,95	20,90	20,65	17,2±4
35d	13,45	17,95	19,30	-	10,50	17,10	19,60	18,70	16,7±3,3
42d	12,65	17,25	18,50	-	9,45	16,55	19,20	19,05	16±3,5
49d	13,35	16,75	19,60	-	10,55	17,25	18,35	18,50	16,3±3,1
56d	13,15	17,00	19,30	-	10,20	17,10	18,60	19,80	16,5±3,4

B: tiempo basal; h: horas; d: días. DE: desviación estándar

Tabla 15: Peso en Kg de los perros en el lote 2

Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	Media±DE
B	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
1´	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
15´	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
30´	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
1h	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
6h	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
12h	11,30	15,90	17,70	13,20	10,20	-	17,20	17,80	14,8±3,2
24h	11,90	16,20	18,50	12,40	10,30	-	17,00	17,50	14,8±3,2
7d	11,45	16,10	17,70	13,35	10,85	-	17,30	17,80	14,9±2,9
14d	12,20	15,50	18,20	12,95	10,45	-	17,40	18,80	15±3,1
21d	11,20	16,60	18,20	11,20	11,40	-	17,80	18,25	15±3,4
28d	11,50	16,80	18,20	13,60	11,00	-	18,50	20,00	15,7±3,5
35d	11,50	14,70	17,80	13,00	10,70	-	17,40	18,00	14,7±3
42d	11,20	16,70	18,60	13,15	11,00	-	18,00	18,40	15,3±3,3
49d	11,30	16,00	18,50	13,00	10,80	-	18,00	19,00	15,2±3,4
56d	11,50	16,40	18,20	13,10	11,00	-	18,20	18,70	15,3±3,2

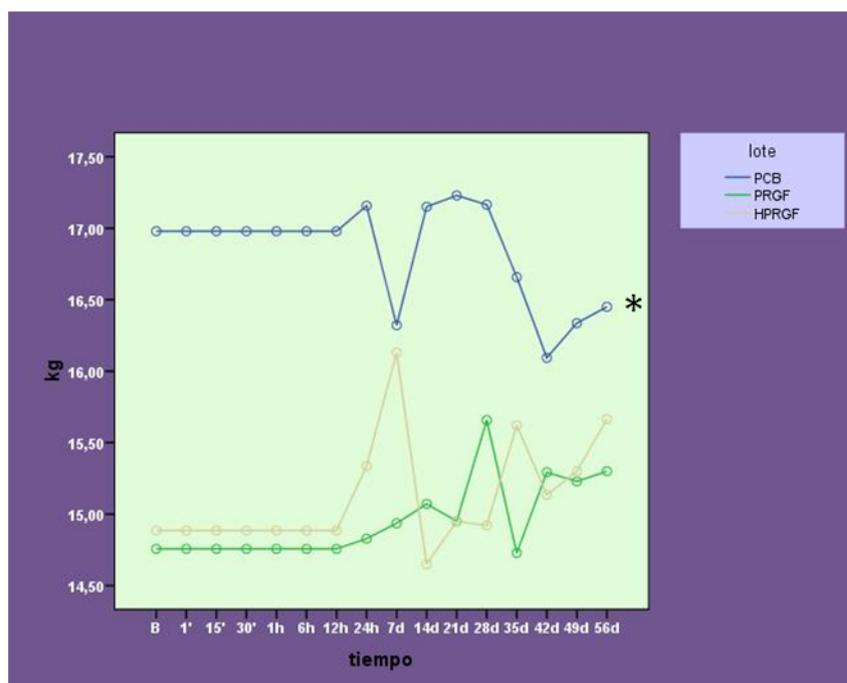
B: tiempo basal; h: horas; d: días. DE: desviación estándar

Tabla 16: Peso en Kg de los perros en el lote 3

Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	Media±DE
B	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
1´	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
15´	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
30´	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
1h	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
6h	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
12h	-	14,00	18,00	12,15	11,50	14,50	17,20	16,85	14,9±2,5
24h	-	14,75	18,40	12,45	11,00	14,80	18,10	17,85	14,9±2,5
7d	-	15,40	18,50	13,40	10,50	16,60	19,50	19,00	16,1±3,2
14d	-	13,45	16,70	12,70	10,20	14,90	16,90	17,70	14,7±2,6
21d	-	14,45	16,65	12,40	10,20	15,65	17,35	17,95	15±2,7
28d	-	14,70	17,60	12,40	9,80	15,50	16,85	17,60	14,9±2,8
35d	-	16,15	18,60	13,70	11,30	15,30	16,50	17,80	15,6±2,4
42d	-	16,10	18,20	12,80	9,45	14,60	16,70	18,10	15,1±3
49d	-	16,35	18,20	13,10	10,35	14,40	17,30	17,40	15,3±2,7
56d	-	15,60	18,05	13,55	10,90	15,35	17,50	18,70	15,7±2,6

B: tiempo basal; h: horas; d: días. DE: desviación estándar

Figura 16: Evolución de los pesos en el tiempo



*. Diferencias estadísticamente significativas. $P=0,000$.

Analíticas sanguíneas

A continuación se detallan las analíticas sanguíneas de los pacientes antes de su introducción en el estudio. En primer lugar el hemograma (Tabla 17), la bioquímica sanguínea (Tabla 18) y las serologías (Tabla 19).

Tabla 17: Hemograma de los pacientes

Perro	WBC ($\times 10^3$ cells/ μ l)	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	HGB (g/dl)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	CHCM (g/dl)	RDW (%)	PLT($\times 10^3$ cells/ μ l)
1	5,73	5,22	11,2	36,4	69,8	21,5	31,8	12,1	103
2	8,61	6,31	14	45	72,1	22,2	32,7	13,4	280
3	10,23	7,6	16,2	51,2	67,3	21,3	32,9	13,6	178
4	4,96	6,44	13,7	44,5	69,1	21,3	32,1	12,8	317
5	12,8	7,24	15,8	50,6	69,9	21,9	32,7	11,9	337
6	5,71	6,44	13,3	43,1	66,9	20,7	32,1	12,2	138
7	7,88	6,7	14,4	45,9	68,5	21,5	33	12,6	223
8	10,07	7,15	15,5	47,9	67	21,7	33	12,7	264

WBC: glóbulos blancos; RBC: glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: reticulocitos; PLT: plaquetas. Cells: células; g: gramos; dl: decilitros; fl: femtolitros; pg: picogramos

Tabla 18: Bioquímica de los pacientes antes de entrar en el estudio

Perro	Creatinina (mg/dl)	Albumina (mg/dl)	Calcio (mg/dl)	Amilasa (U/L)	CK (U/L)	Colesterol (mg/dl)	ALP (U/L)	Fósforo (mg/dl)	GGT (U/L)	Glucosa (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Proteínas		Urea (mg/dl)	Bilirrubina Total (mg/dl)
													Totales (g/dl)	Triglicéridos (mg/dl)		
1	0,56	3	8,1	987,4	81	144,5	61,5	2,9	4,3	97,8	37,8	27,8	6,2	117,2	29,6	0,2
2	0,84	3,4	8,9	383,6	469	200,3	58,6	4,6	3,6	110,1	40,2	33,3	5,8	59	37,2	0,2
3	0,93	3,5	9,6	672,9	92,2	160,3	74,6	4,1	2,1	107,8	31,6	49,6	5,5	57,2	42	0,1
4	0,71	3,5	8,7	364,4	70,3	196,4	53,2	3,5	3	109	33,5	41	6	87,9	34,8	0,1
5	0,9	3,3	8	1071,4	88,5	136,2	54,6	3,4	2,1	91,5	24,3	36,9	5,7	46,2	36	0,1
6	0,76	3	8	695,3	70,9	159,6	36,7	3,7	1,9	102	35,5	32,9	6,2	96,5	37,7	0,1
7	0,91	3,4	9,2	706,9	75,7	138,5	37,7	3,8	3,4	99,2	36	37,2	5,8	41,2	46	0,1
8	0,8	3,5	8,8	606,3	76,2	148,8	47,7	3,4	2,3	103,7	32,6	45,5	5,5	60,5	38,5	0,1

CK: Creatinquinasa; ALP: Fosfatasa Alcalina; GGT: Gamma-glutamil transferasa; AST: Aspartato Aminotransferasa; ALT: Alanina Aminotransferasa. mg: miligramos; dl: decilitros; U: unidades; L: litros; g: gramos.

Tabla 19: Electrolitos y serología de los pacientes antes de entrar en el estudio

Perro	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Ca ⁺⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	Lactato (mmol/L)	Leishmania	Ehrlichia canis	Dirofilaria immitis	Anaplasma phagocytophilum	Borrelia burgdorferi	CRP (µg/ml)
1	144	4,9	1,22	112	2,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	10,9
2	147	4,2	1,31	111	2,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	5
3	142	4,3	1,23	108	3,1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	5
4	143	4,4	1,17	110	2,4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	5
5	144	4	1,22	113	2,9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	18
6	144	4,5	1,22	113	1,6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	5,4
7	143	4,1	1,24	110	2,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	12,6
8	140	4,3	1,17	109	2,2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	5

Na⁺: sodio; K⁺: potasio; Ca⁺⁺: calcio; Cl⁻: cloro. mmol: milimoles; L: litros; µg: microgramos; ml: mililitros.

Estudio del Plasma Rico en Factores de Crecimiento

Se ha realizado un estudio del PRGF en cada uno de los lotes para evaluar la relación existente entre la IGF-I, las plaquetas, el valor hematocrito y la presencia de leucocitos entre la sangre completa, el plasma rico en factores de crecimiento y el plasma pobre en factores de crecimiento.

Plaquetas

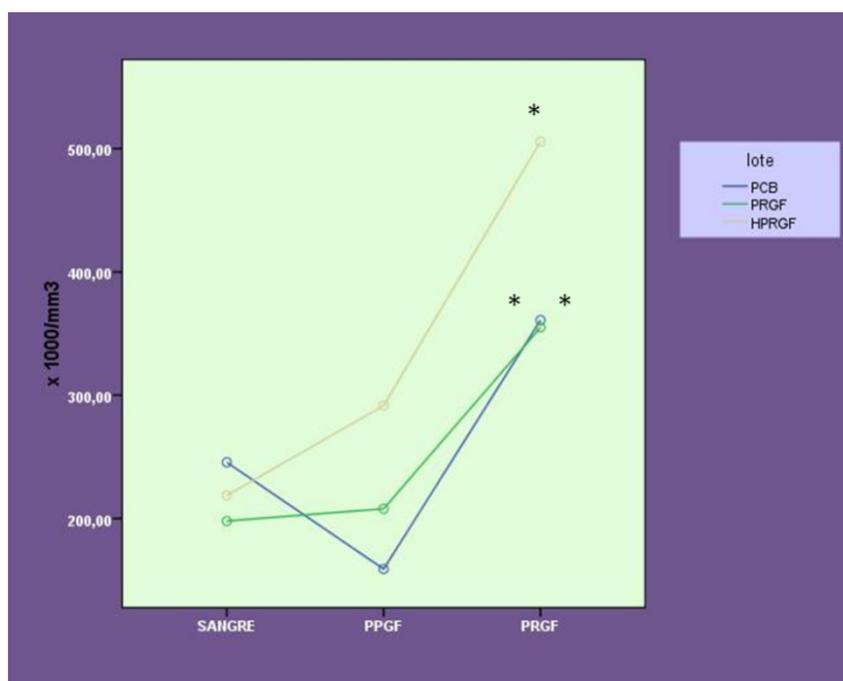
En primer lugar se exponen los resultados del estudio de las plaquetas entre los tres tipos de muestras y entre los tres grupos de estudio (Tabla 20 y gráfica 17).

Tabla 20: Estudio descriptivo de las plaquetas en sangre (SE), plasma rico en factores de crecimiento (PR) y el plasma pobre en factores de crecimiento (PP) entre grupos

Muestra	Lote	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
SE	PCB	7	245,5714	35,80759	157,9534	333,1895	130,00	403,00
	PRGF	7	198,0000	51,93907	70,9097	325,0903	22,00	410,00
	HPRGF	7	218,7143	42,74270	114,1267	323,3019	69,00	419,00
	Total	21	220,7619	24,48760	169,6817	271,8421	22,00	419,00
PP	PCB	7	159,0000	41,03483	58,5914	259,4086	67,00	372,00
	PRGF	7	207,8571	27,77583	139,8921	275,8221	113,00	290,00
	HPRGF	7	291,5714	45,64973	179,8706	403,2723	154,00	487,00
	Total	21	219,4762	24,57153	168,2209	270,7315	67,00	487,00
PR	PCB	7	360,8571	105,60606	102,4484	619,2659	105,00	781,00
	PRGF	7	355,0000	87,79522	140,1728	569,8272	,00	700,00
	HPRGF	7	505,7143	69,09507	336,6447	674,7838	317,00	794,00
	Total	21	407,1905	51,05327	300,6952	513,6857	,00	794,00

SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento; N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 17: Comparación del número de plaquetas entre las muestras en cada grupo



SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento *Diferencias significativas entre PR y PP y SE. $P=0,000$.

Como se puede apreciar en la figura existen diferencias en el número de plaquetas entre el plasma rico en factores de crecimiento y el plasma pobre y la sangre completa presentando valores entre 1,5 y dos veces superiores a los otros grupos.

IGF-I

En la tabla siguiente (Tabla 21), aparecen las concentraciones obtenidas de IGF-I en cada una de las muestras de los tres grupos.

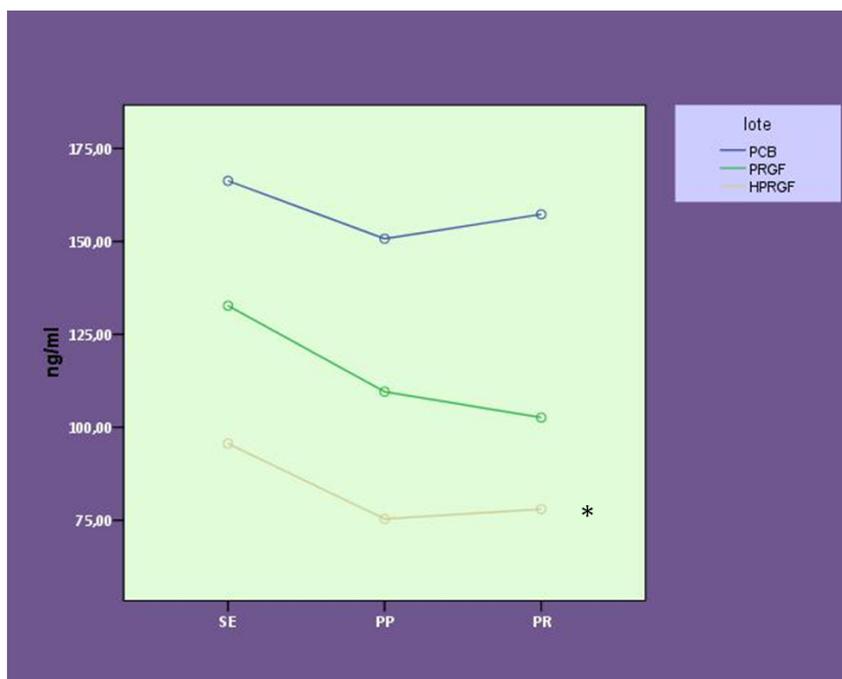
Tabla 21: Estudio descriptivo de la concentración de IGF-I en Sangre (SE), Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PR) y el Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PP) entre grupos

Muestras		N	Media	Desviación típica	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
SE	PCB	7	166,2857	31,07901	137,5424	195,0290	122,00	203,00
	PRGF	7	132,7000	49,05544	87,3313	178,0687	83,80	205,00
	HPRGF	7	95,6000	31,53670	66,4334	124,7666	29,00	128,00
	Total	21	131,5286	46,74585	110,2501	152,8070	29,00	205,00
PP	PCB	7	150,7143	26,34840	126,3461	175,0825	107,00	179,00
	PRGF	7	109,5571	32,77112	79,2489	139,8654	60,80	146,00
	HPRGF	7	75,3429	22,23660	54,7774	95,9083	28,00	91,00
	Total	21	111,8714	40,93600	93,2376	130,5053	28,00	179,00
PR	PCB	7	157,2857	27,32956	132,0101	182,5613	122,00	191,00
	PRGF	7	102,6143	34,75785	70,4686	134,7599	56,20	148,00
	HPRGF	7	77,9857	23,66470	56,0995	99,8719	27,80	95,40
	Total	21	112,6286	43,67660	92,7472	132,5099	27,80	191,00

SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento; N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

En la figura 18 aparecen las diferencias existentes entre los grupos de estudio y las muestras.

Figura 18: Comparación de la concentración de IGF-I entre las muestras en cada grupo



SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento *Diferencias significativas con HPRGF. P=0,000.

Como se puede observar los valores obtenidos en el grupo HPRGF son significativamente menores que en los otros dos grupos, aunque no existe variación en los niveles de IGF-I entre las muestras en ninguno de los 3 grupos, de manera que se mantienen los niveles de IGF-I tanto en el plasma rico como en el plasma pobre a unos niveles similares a los de la sangre.

Leucocitos

A continuación se muestra el estudio de los leucocitos en los tres tipos de muestra y entre grupos. En la tabla 22 aparecen los resultados descriptivos y en la figura 19 se muestran las diferencias existentes entre ellos.

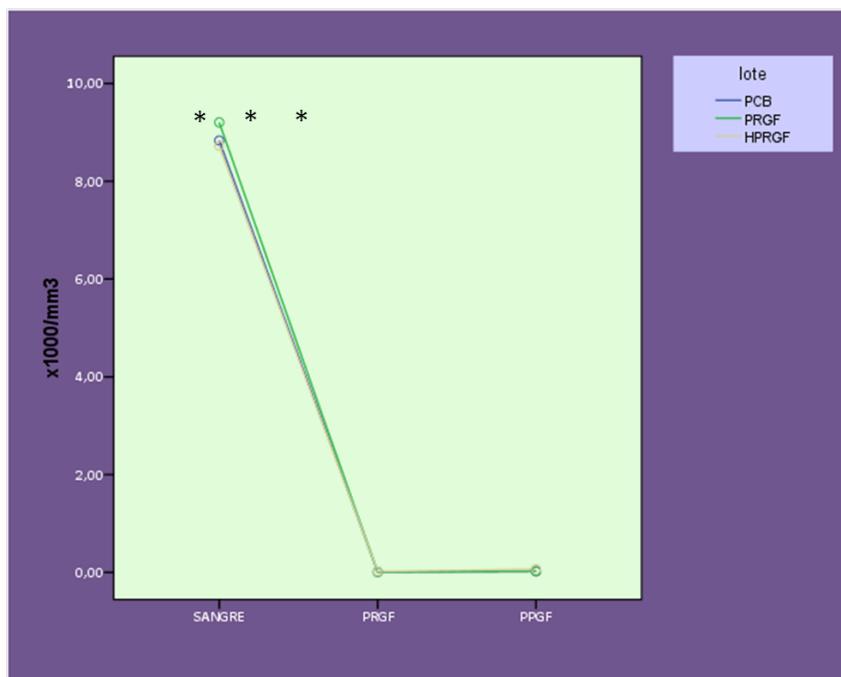
Tabla 22: Estudio descriptivo de la presencia de leucocitos en SE, PR y PP por grupos de estudio

Muestra	Lote	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
SE	PCB	7	8,8329	2,56634	6,4594	11,2063	5,63	12,45
	PRGF	7	9,2029	2,83181	6,5839	11,8218	4,93	11,72
	HPRGF	7	8,7257	2,08929	6,7934	10,6580	5,75	11,37
	Total	21	8,9205	2,39478	7,8304	10,0106	4,93	12,45
PP	PCB	7	,0100	,00000	,0100	,0100	,01	,01
	PRGF	7	,0086	,00690	,0022	,0150	,00	,02
	HPRGF	7	,0200	,01155	,0093	,0307	,01	,04
	Total	21	,0129	,00902	,0087	,0170	,00	,04
PR	PCB	7	,0229	,01890	,0054	,0403	,00	,04
	PRGF	7	,0271	,01604	,0123	,0420	,01	,06
	HPRGF	7	,0671	,06448	,0075	,1268	,01	,19
	Total	21	,0390	,04300	,0195	,0586	,00	,19

SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento; N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Como se puede observar en la figura 19 hay diferencias estadísticamente significativas entre la sangre y el plasma rico y el plasma pobre en factores de crecimiento en los tres grupos del estudio. Estos resultados confirman la ausencia de glóbulos blancos tras la centrifugación de la sangre y la separación de los diferentes tipos de plasma.

Figura 19: Diferencias entre las medias de leucocitos en los tres tipos de muestra.



SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento *Diferencias significativas entre PR y PP y SE. $P=0,000$.

Valor hematocrito

En el apartado siguiente se muestran los resultados del valor hematocrito entre los tres tipos de muestras y entre los 3 lotes.

Tabla 23: Valor hematocrito de la SE, PP y PR en los 3 grupos

Muestra	Lote	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
SE	PCB	7	8,8329	2,56634	6,4594	11,2063	5,63	12,45
	PRGF	7	9,2029	2,83181	6,5839	11,8218	4,93	11,72
	HPRGF	7	8,7257	2,08929	6,7934	10,6580	5,75	11,37
	Total	21	8,9205	2,39478	7,8304	10,0106	4,93	12,45
PP	PCB	7	,0100	,00000	,0100	,0100	,01	,01
	PRGF	7	,0086	,00690	,0022	,0150	,00	,02
	HPRGF	7	,0200	,01155	,0093	,0307	,01	,04
	Total	21	,0129	,00902	,0087	,0170	,00	,04
PR	PCB	7	,0229	,01890	,0054	,0403	,00	,04
	PRGF	7	,0271	,01604	,0123	,0420	,01	,06
	HPRGF	7	,0671	,06448	,0075	,1268	,01	,19
	Total	21	,0390	,04300	,0195	,0586	,00	,19

SE: Sangre; PR: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; PP: Plasma Pobre en Factores de Crecimiento; N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 20: Comparación del valor hematocrito en los diferentes tipos de muestra y en los tres grupos.

**Diferencias significativas entre PR y PP y SE. P=0,000.*

Al igual que en el caso de los leucocitos, existe una clara disminución de este valor con respecto a la sangre entera, presentando una ausencia de glóbulos rojos a nivel de PP y PR, en los tres grupos de estudio.

FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO I (IGF-I)

En relación al factor de crecimiento insulínico tipo I, se presentan en primer lugar los resultados obtenidos del estudio descriptivo de este factor en cada uno de los grupos PCB, PRGF y HPRGF en las tablas 24, 25 y 26, respectivamente.

En segundo lugar se presentan los datos obtenidos de la realización de un análisis con un Modelo Lineal General de Medidas Repetidas para cada uno de los grupos, y un test posthoc de Tukey.

Tabla 24: Medias obtenidas del IGF-I en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	166,2857	31,07901	137,5424	195,0290	122,00	203,00
1'	7	165,1429	31,08284	136,3960	193,8897	120,00	198,00
15'	7	162,5714	27,84994	136,8145	188,3283	120,00	192,00
30'	7	155,8571	30,60734	127,5501	184,1642	113,00	198,00
1h	7	158,5714	25,52030	134,9691	182,1738	122,00	189,00
6h	7	143,7143	26,37369	119,3227	168,1059	104,00	173,00
12h	7	139,4286	20,83952	120,1552	158,7019	109,00	166,00
24h	7	137,4286	25,24452	114,0813	160,7759	104,00	167,00
7d	7	151,7286	37,55639	116,9947	186,4624	89,10	195,00
14d	7	174,7143	25,07133	151,5272	197,9014	132,00	206,00
21d	7	158,7143	20,42641	139,8230	177,6056	124,00	183,00
28d	7	157,8571	26,36556	133,4731	182,2412	123,00	192,00
35d	7	157,1429	19,70980	138,9143	175,3714	138,00	185,00
42d	7	134,5714	20,04044	116,0371	153,1057	104,00	168,00
49d	7	153,0000	19,28730	135,1622	170,8378	125,00	184,00
56d	7	155,5714	24,34377	133,0572	178,0857	122,00	203,00
Total	112	154,5187	26,60672	149,5369	159,5006	89,10	206,00

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tras la comparación entre cada uno de los tiempos se ha observado que no existen diferencias entre ninguno de ellos.

Tabla 25: Medias obtenidas del IGF-I en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	132,7000	49,05544	87,3313	178,0687	83,80	205,00
1'	7	111,5429	50,07534	65,2309	157,8548	44,10	185,00
15'	7	113,2143	57,52746	60,0103	166,4183	56,00	195,00
30'	7	99,1429	51,97829	51,0710	147,2148	43,70	177,00
1h	7	104,9143	37,91198	69,8516	139,9770	58,00	174,00
6h	7	109,3429	48,22350	64,7436	153,9422	54,70	192,00
12h	7	109,8143	37,56357	75,0738	144,5548	42,10	153,00
24h	7	95,6000	33,91111	64,2375	126,9625	50,90	135,00
7d	7	117,1571	46,55312	74,1027	160,2116	67,90	183,00
14d	7	114,4714	40,23393	77,2613	151,6816	69,40	173,00
21d	7	113,0571	37,73676	78,1565	147,9578	61,60	167,00
28d	7	133,7571	46,69525	90,5712	176,9430	78,00	192,00
35d	7	95,4000	42,49584	56,0979	134,7021	33,00	156,00
42d	7	143,9000	48,47745	99,0658	188,7342	68,20	184,00
49d	7	145,2857	56,47794	93,0523	197,5191	79,40	252,00
56d	7	139,4143	49,87372	93,2888	185,5398	70,70	196,00
Total	112	117,4196	46,07570	108,7924	126,0469	33,00	252,00

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

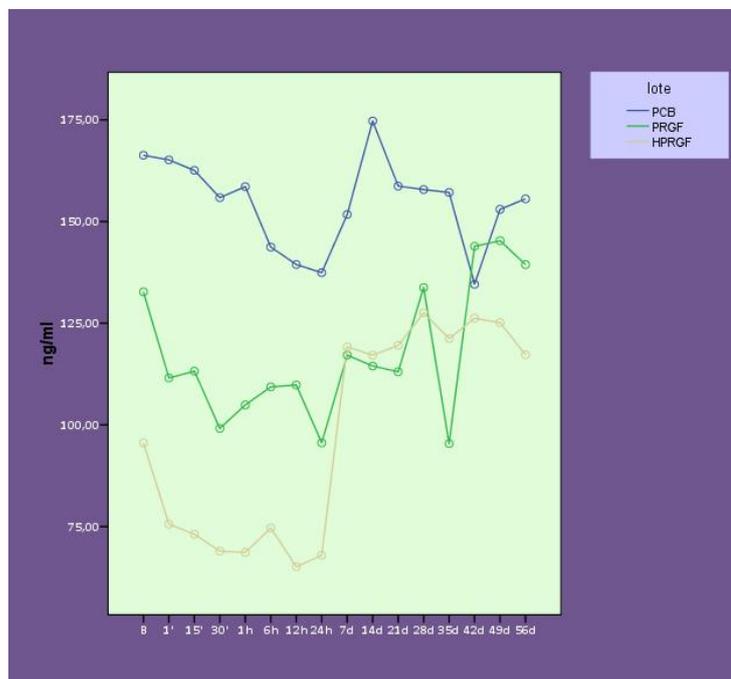
Al igual que en el grupo anterior, en el grupo PRGF, tampoco existen diferencias entre tiempos.

Tabla 26: Medias obtenidas del IGF-I en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	95,6000	31,53670	66,4334	124,7666	29,00	128,00
1'	7	75,5857	30,76180	47,1358	104,0356	27,90	105,00
15'	7	73,1429	27,56041	47,6537	98,6320	26,00	98,40
30'	7	68,9571	26,20107	44,7252	93,1891	23,80	107,00
1h	7	68,6429	23,42014	46,9828	90,3029	19,30	90,70
6h	7	74,6714	26,56261	50,1051	99,2377	20,60	101,00
12h	7	65,1429	19,55129	47,0609	83,2248	28,70	93,10
24h	7	67,9571	20,76029	48,7571	87,1572	30,70	92,60
7d	7	119,1714	29,22908	92,1390	146,2038	62,20	158,00
14d	7	117,1429	30,43807	88,9923	145,2934	59,00	146,00
21d	7	119,5429	29,66501	92,1073	146,9784	66,50	151,00
28d	7	127,5429	34,02249	96,0773	159,0084	68,80	168,00
35d	7	121,2571	26,92452	96,3561	146,1582	65,80	149,00
42d	7	126,2143	33,08557	95,6152	156,8133	67,50	170,00
49d	7	125,1286	30,81313	96,6312	153,6260	65,90	162,00
56d	7	117,2429	38,46400	81,6696	152,8161	64,70	161,00
Total	112	97,6839	36,85655	90,7829	104,5850	19,30	170,00

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 21: Comparación de la evolución del IGF-I en el tiempo en los tres grupos de estudio



Como se puede apreciar tanto en las tablas como en la figura, los valores de IGF-I se han mantenido muy estables en los tres grupos, con variaciones no significativas entre ellos.

Influencia del peso sexo y edad en los niveles séricos del IGF-I

Peso

Todos los animales se pesaron justo antes de la toma de muestra en cada uno de los días de estudio, de manera que se evaluó en el tiempo la relación existente entre estas dos variables a través de un análisis de varianza. En los tres grupos de estudio se ha observado que existe una influencia del peso sobre los niveles de IGF-I ($p < 0,000$), aunque no existen diferencias entre los grupos de estudio, como se puede apreciar en la tabla 27. Existe una correlación positiva ($p < 0,000$) entre ellas, de manera que los niveles de IGF-I se incrementan cuando aumenta el peso del animal (Tabla 28).

Tabla 27: Significación estadística del peso sobre los niveles séricos de IGF-I en el estudio.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,179 ^a	3	3,060	8,289	,000
Intersección	101,766	1	101,766	275,713	,000
Peso	8,735	1	8,735	23,666	,000
Lote	,146	2	,073	,197	,821
Error	122,541	332	,369		
Total	1585,698	336			
Total corregida	131,720	335			
a. R cuadrado = ,070 (R cuadrado corregida = ,061)					

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación.

Tabla 28: Correlación existente entre IGF-I y el peso de los pacientes

		Peso	IGF
Peso	Correlación de Pearson	1	,416
	Sig. (bilateral)		,000
	N	336	336
IGF	Correlación de Pearson	,416	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	336	336

Sig: significación

Sexo

Para evaluar si existe o no influencia de este factor sobre la IGF-I, se ha realizado un análisis univariante con un test posthoc de Tuckey para los tres grupos. Los resultados se muestran en la Tabla 29 y en la figura 22.

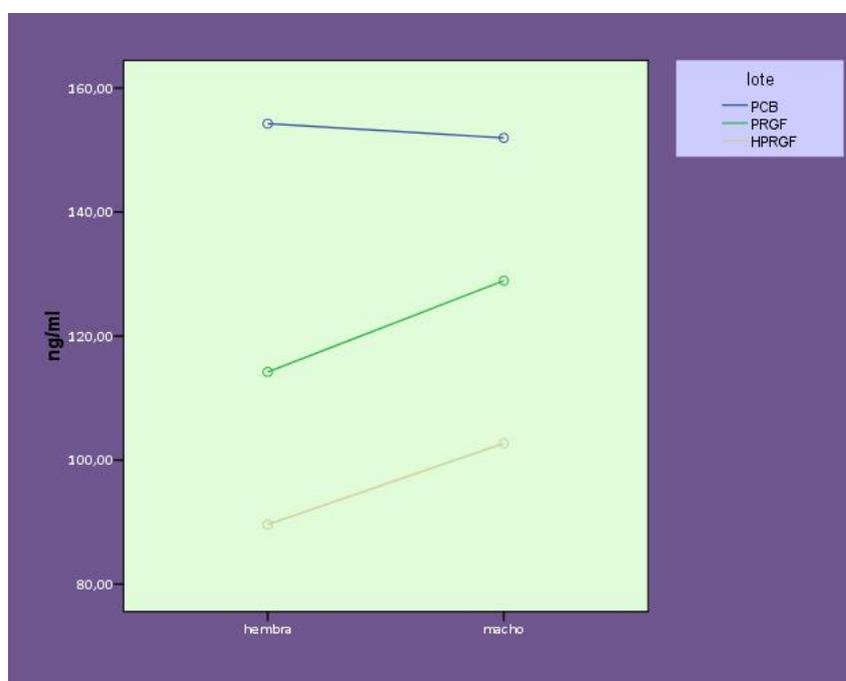
Tabla 29: Significación estadística del sexo sobre los niveles séricos de IGF-I

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	22,374 ^a	5	4,475	36,276	,000
Intersección	7387,498	1	7387,498	59887,517	,000
Lote	16,747	2	8,373	67,880	,000
Sexo	4,507	1	4,507	36,539	,000
lote * sexo	1,756	2	,878	7,119	,001
Error	40,708	330	,123		
Total	7618,833	336			
Total corregida	63,082	335			

a. R cuadrado = ,355 (R cuadrado corregida = ,345)

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación.

Figura 22: Comparación de los niveles de IGF-I por sexos en cada uno de los grupos de estudio



Como se puede apreciar, existen diferencias entre los tres grupos y entre los machos y las hembras (Tabla 29), observándose niveles más elevados en los machos y en los lotes PCB y PRGF. En el grupo PCB las concentraciones de CRP fueron mayores, pero con menor diferencia entre sexos (Figura 22).

Edad

Para evaluar la influencia de este factor sobre los niveles séricos de IGF-I, se han dividido a los animales en dos grandes grupos, separándolos en:

- Adultos jóvenes, aquellos animales menores de 8 años.
- Adultos maduros, animales con más de 8 años.

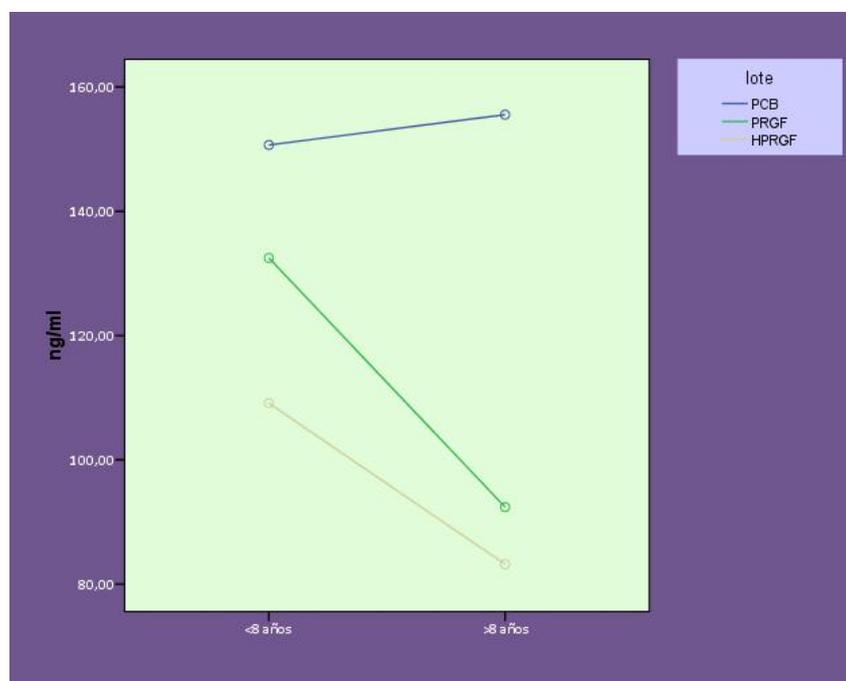
Tabla 30: Significación estadística de la edad sobre los niveles séricos de IGF-I

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	27,665 ^a	5	5,533	51,555	,000
Intersección	5980,225	1	5980,225	55721,439	,000
Lote	18,996	2	9,498	88,499	,000
Edadcod	7,898	1	7,898	73,593	,000
lote * edadcod	3,651	2	1,826	17,011	,000
Error	35,417	330	,107		
Total	7618,833	336			
Total corregida	63,082	335			

a. R cuadrado = ,439 (R cuadrado corregida = ,430)

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación.

Figura 23: Comparación de los niveles de IGF-I por edad en cada uno de los grupos de estudio



A excepción del grupo PCB, que tiene valores mayores que el resto de los grupos. Son los animales de mayor edad los que presentan niveles menores de IGF-I.

PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP)

En cuanto a la Proteína C-Reactiva, al igual que en el IGF-I, en primer lugar se muestran los resultados obtenidos del estudio descriptivo de cada uno de los lotes (Tablas 31, 32 y 33) y en la figura 24 aparece la evolución en el tiempo de esta variable y su comparación entre grupos. Para valorar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos y los tiempos, se han realizado un Modelo Lineal General de Medidas Repetidas con test posthoc de Tuckey.

Tabla 31: Medias obtenidas de la CRP en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	8,6857	3,48876	5,4592	11,9123	5,80	16,30
1'	7	7,5143	3,75785	4,0389	10,9897	4,00	15,30
15'	7	7,8000	3,76696	4,3161	11,2839	4,00	15,60
30'	7	7,2429	3,78279	3,7444	10,7414	4,00	15,30
1h	7	7,4429	3,78367	3,9435	10,9422	4,00	15,60
6h	7	6,7286	4,21296	2,8322	10,6249	4,00	16,00
12h	7	7,2714	3,52454	4,0118	10,5311	4,00	14,80
24h	7	7,8857	4,66134	3,5747	12,1967	4,00	18,00
7d	7	4,7286	1,92762	2,9458	6,5113	4,00	9,10
14d	7	4,8857	2,34338	2,7184	7,0530	4,00	10,20
21d	7	10,3143	13,75869	-2,4104	23,0389	4,00	40,90
28d	7	7,4571	4,16488	3,6053	11,3090	4,00	14,10
35d	7	7,8714	5,09402	3,1602	12,5826	4,00	14,90
42d	7	8,2286	3,67637	4,8285	11,6286	4,00	12,30
49d	7	7,2571	3,74070	3,7976	10,7167	4,00	12,30
56d	7	9,8714	7,74870	2,7051	17,0378	4,00	20,90
Total	112	7,5741	5,12863	6,6138	8,5344	4,00	40,90

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 32: Medias obtenidas de la CRP en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	7,7857	5,51224	2,6877	12,8837	1,40	13,80
1'	7	6,9143	4,18506	3,0437	10,7848	2,80	13,10
15'	7	6,4429	4,09140	2,6589	10,2268	1,70	12,70
30'	7	5,7571	4,47581	1,6177	9,8966	2,10	12,70
1h	7	5,8000	4,46505	1,6705	9,9295	1,00	12,30
6h	7	5,8714	3,89774	2,2666	9,4762	1,00	13,10
12h	7	5,8857	4,12287	2,0727	9,6987	2,10	12,80
24h	7	9,5429	5,94218	4,0473	15,0385	1,70	18,30
7d	7	25,6143	17,12001	9,7809	41,4477	3,60	57,80
14d	7	15,4000	9,84276	6,2970	24,5030	4,70	35,90
21d	7	5,0714	3,79373	1,5628	8,5800	1,70	13,00
28d	7	7,2857	,92273	6,4323	8,1391	6,10	9,10
35d	7	7,3000	1,34412	6,0569	8,5431	5,80	9,10
42d	7	8,0714	2,44725	5,8081	10,3348	6,10	13,10
49d	7	9,0571	3,43213	5,8830	12,2313	5,80	14,20
56d	7	11,1571	4,93385	6,5941	15,7202	5,80	20,90
Total	112	8,9348	7,65455	7,5016	10,3681	1,00	57,80

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

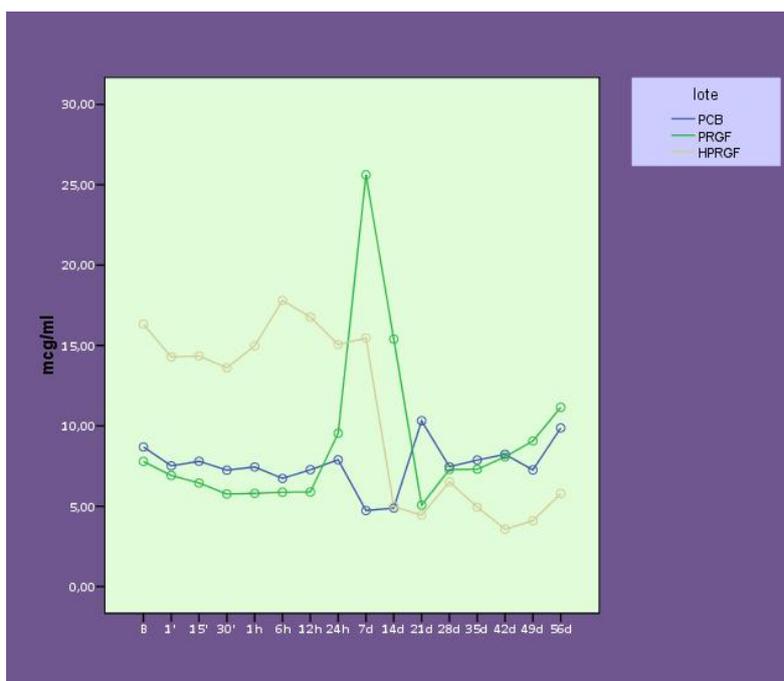
Tabla 33: Medias obtenidas de la CRP en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	16,3286	18,68259	-,9499	33,6071	4,00	56,60
1'	7	14,2857	16,02991	-,5395	29,1109	4,00	48,60
15'	7	14,3429	16,41197	-,8357	29,5214	4,00	49,80
30'	7	13,6143	14,50396	,2004	27,0282	4,00	44,70
1h	7	14,9857	14,72735	1,3652	28,6062	4,00	46,60
6h	7	17,8000	14,54659	4,3466	31,2534	4,00	47,40
12h	7	16,7714	12,53019	5,1829	28,3599	4,00	41,10
24h	7	15,0571	11,50925	4,4129	25,7014	4,00	37,20
7d	7	15,4714	23,23487	-6,0172	36,9601	3,00	67,00
14d	7	4,9857	4,39713	,9190	9,0524	3,00	14,90
21d	7	4,4429	1,91647	2,6704	6,2153	3,00	8,00
28d	7	6,5143	4,56816	2,2894	10,7391	3,00	14,90
35d	7	4,9429	2,29700	2,8185	7,0672	3,00	9,80
42d	7	3,5714	,53452	3,0771	4,0658	3,00	4,00
49d	7	4,1000	2,08247	2,1740	6,0260	3,00	8,70
56d	7	5,7857	6,06807	,1737	11,3977	3,00	19,50
Total	112	10,8125	12,65845	8,4423	13,1827	3,00	67,00

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

En ninguno de los grupos de estudio han existido diferencias entre los distintos tiempos, manteniéndose un valor estable de la CRP durante los 56 días (Figura 24).

Figura 24: Comparación de la evolución de la CRP en el tiempo en los tres grupos de estudio



La comparación entre grupos de estudio aparece reflejada en la figura 24, no existiendo diferencias significativas entre los 3 lotes de estudio. En el grupo PRGF aparece un pico de CRP en el día 7 de estudio, aunque no es significativo, creemos que se debe a una dermatitis por rascado que presentaron 3 de los animales de este grupo.

Influencia del peso, sexo y edad en los niveles séricos de CRP

Peso

En la evaluación del efecto del peso sobre la CRP en cada uno de los lotes de estudio se ha observado una diferencia significativa ($p < 0,000$), sin embargo no existen diferencias entre los tres grupos de estudio, como se puede observar en la tabla 34:

Tabla 34: Significación estadística del peso sobre los niveles séricos de CRP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,179 ^a	3	3,060	8,289	,000
Intersección	101,766	1	101,766	275,713	,000
Peso	8,735	1	8,735	23,666	,000
Lote	,146	2	,073	,197	,821
Error	122,541	332	,369		
Total	1585,698	336			
Total corregida	131,720	335			
a. R cuadrado = ,070 (R cuadrado corregida = ,061)					

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación.

Se ha realizado una correlación de Pearson entre el peso y la CRP ($p < 0,000$) (Tabla 35), existiendo una relación negativa, de manera que cuando aumenta el peso disminuye la CRP en los pacientes.

Tabla 35: Correlación entre CRP y el peso

		Peso	CRP
Peso	Correlación de Pearson	1	-,278
	Sig. (bilateral)		,000
	N	336	336
CRP	Correlación de Pearson	-,278	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	336	336

Sig: significación; N: tamaño de la muestra.

Sexo

En cuanto al estudio de los efectos que tiene el sexo en los niveles de CRP en los tres grupos a estudiar se ha observado que no existe una diferencia ni en los diferentes grupos ni entre machos y hembras, con una $p < 0,01$ (Tabla 36 y Figura 25).

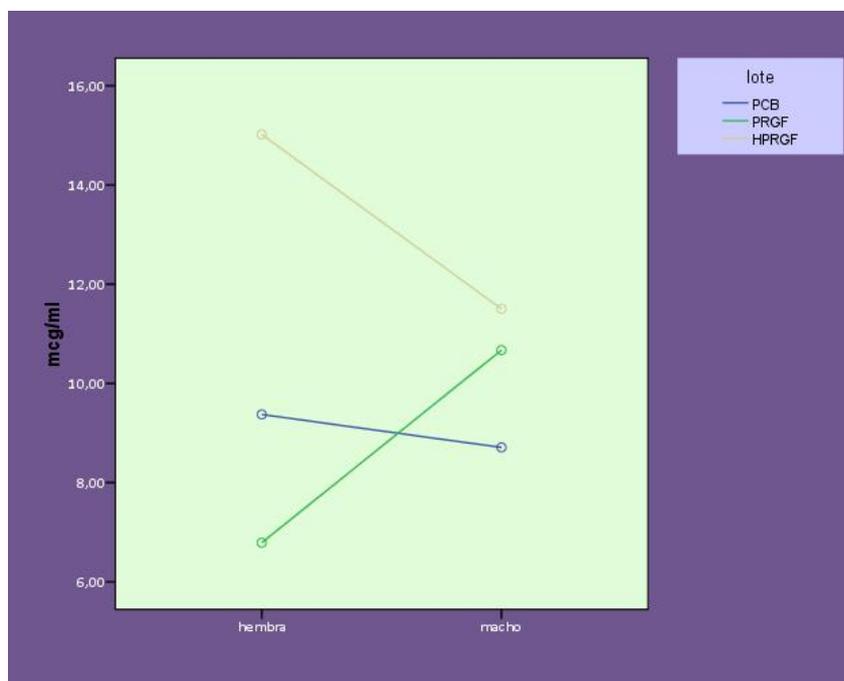
Tabla 36: Significación estadística del sexo sobre los niveles séricos de CRP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	6,136 ^a	5	1,227	3,225	,007
Intersección	1447,572	1	1447,572	3803,808	,000
Lote	,421	2	,210	,553	,576
Sexo	1,924	1	1,924	5,057	,025
lote * sexo	3,774	2	1,887	4,959	,008
Error	125,584	330	,381		
Total	1585,698	336			
Total corregida	131,720	335			

a. R cuadrado = ,047 (R cuadrado corregida = ,032)

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación

Figura 25: Comparación de los niveles de CRP por sexo en cada uno de los grupos de estudio



Edad

En cuanto al estudio de la edad sobre esta variable podemos decir que no existen diferencias entre los tres grupos de estudio, sin embargo son los animales jóvenes los que presentan menores niveles de CRP en sangre ($p= 0,000$) (Tabla 37 y Figura 26).

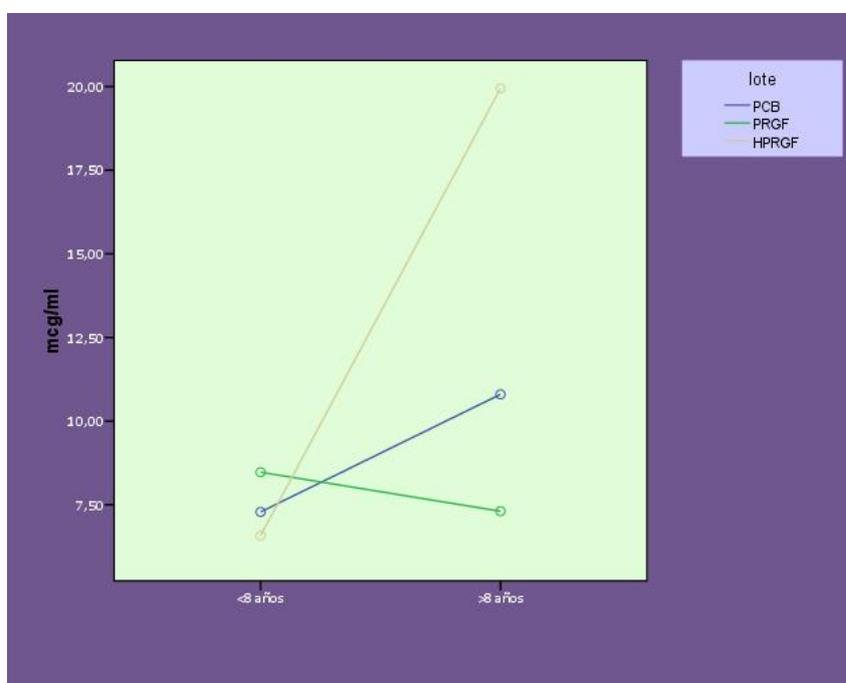
Tabla 37: Significación estadística de la edad sobre los niveles séricos de CRP

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	25,070 ^a	5	5,014	15,514	,000
Intersección	1325,037	1	1325,037	4099,966	,000
Lote	1,597	2	,798	2,470	,086
Edadcod	20,689	1	20,689	64,015	,000
lote * edadcod	3,938	2	1,969	6,092	,003
Error	106,650	330	,323		
Total	1585,698	336			
Total corregida	131,720	335			

a. R cuadrado = ,190 (R cuadrado corregida = ,178)

gl: grados de libertad; F: estadístico de contraste de Anova; Sig: significación.

Figura 26: Comparación de los niveles de CRP por edad en cada uno de los grupos de estudio



Correlación existente entre el IGF-I y la CRP

Para evaluar la relación que pueda existir entre estas dos variables se ha realizado un estudio de correlación bivalente de Pearson, que se muestra en la tabla 38.

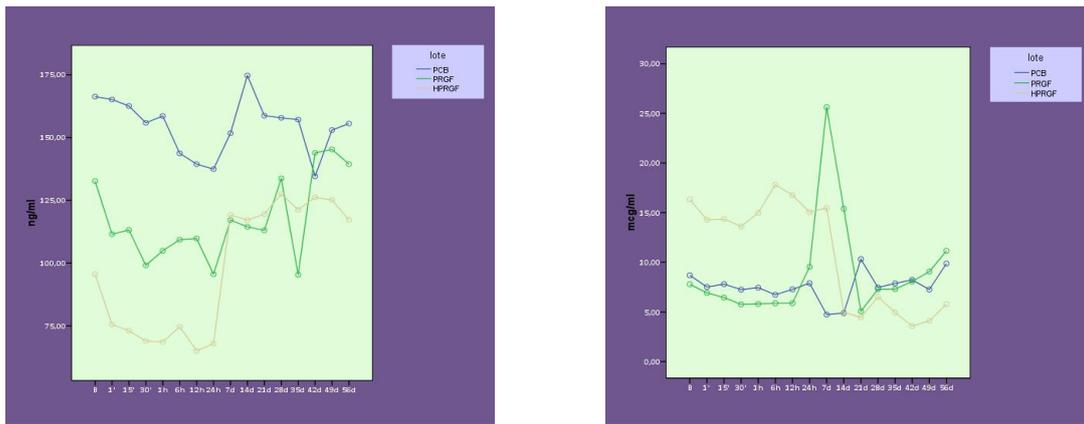
Tabla 38: Correlación de Pearson bivalente entre IGF-I y CRP

Proteínas		IGF	CRP
IGF	Correlación de Pearson	1	-,272
	Sig. (bilateral)		,000
	N	336	336
CRP	Correlación de Pearson	-,272	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	336	336

Sig: significación; N: tamaño de la muestra.

Como se puede observar existe una relación significativa inversa entre estas dos variables, que podemos valorar gráficamente (Figura 27 a y b), al comparar de manera conjunta la evolución de las dos variables en los tiempos.

Figura 27: Evolución de IGF-I (a) y CRP (b) en el tiempo por lotes de estudio



Estudio ecográfico

Dentro de este estudio se evaluaron las medidas musculares obtenidas de las imágenes ecográficas. El procesamiento de estas imágenes está dividido en 2 partes. Por un lado el estudio de la influencia a nivel sistémico de la inyección de PRGF, para ello se ha realizado un estudio de las medidas musculares comparando cada lado (derecho e izquierdo) dentro de cada lote. En segundo lugar, para evaluar el efecto local a lo largo del tiempo y las diferencias entre lotes, se ha comparado las medidas de cada lado evaluado, en el tiempo y en cada uno de los grupos de estudio.

Comparación de las imágenes ecográficas por lotes de estudio

A continuación se describen los resultados de las medidas musculares obtenidas de las imágenes ecográficas, por grupo de estudio y por tiempo. Para ello se realizó el ANOVA de un factor.

GRUPO PCB**MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4**

En cuanto a las medidas musculares de L4 en este grupo (Tablas 39 y 40), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 lados estudiados (Figura 28).

Tabla 39: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,7352	2,97375	10,9849	16,4854	9,23	17,44
1'	7	13,6837	2,73107	11,1579	16,2095	9,45	17,32
7d	7	13,7898	2,95159	11,0601	16,5196	9,72	17,75
14d	7	13,5832	3,01174	10,7978	16,3686	9,42	18,03
21d	7	13,5983	3,08128	10,7486	16,4480	9,45	18,11
28d	7	13,6510	2,90806	10,9615	16,3405	9,81	18,13
35d	7	13,6287	2,79528	11,0435	16,2139	9,56	18,09
42d	7	13,6286	2,95451	10,8961	16,3610	9,50	18,20
49d	7	13,4996	2,98452	10,7394	16,2599	9,36	17,98
56d	7	13,3583	2,91668	10,6608	16,0558	9,48	18,09
Total	70	13,6156	2,73697	12,9630	14,2682	9,23	18,20

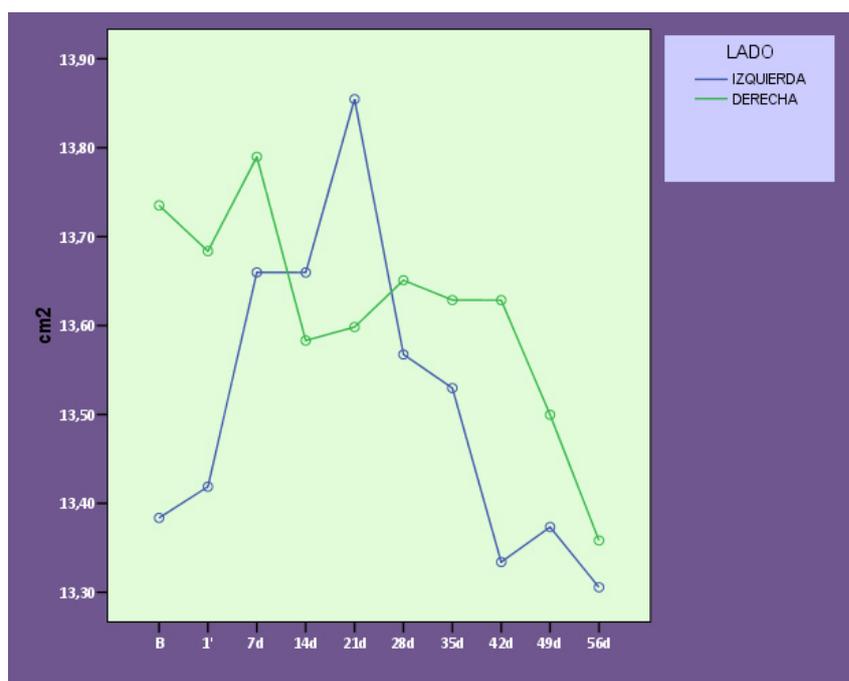
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 40: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,3836	3,66186	9,9970	16,7703	7,67	19,56
1'	7	13,4188	3,61523	10,0753	16,7623	8,28	19,87
7d	7	13,6598	3,34301	10,5680	16,7516	9,09	19,46
14d	7	13,6597	3,21865	10,6829	16,6364	9,67	19,32
21d	7	13,8546	3,20705	10,8886	16,8207	9,26	19,21
28d	7	13,5675	3,21020	10,5986	16,5364	8,90	18,98
35d	7	13,5297	3,28993	10,4871	16,5724	9,01	19,26
42d	7	13,3340	3,24610	10,3319	16,3362	8,95	18,87
49d	7	13,3734	3,14543	10,4644	16,2824	9,05	18,83
56d	7	13,3056	3,12607	10,4145	16,1968	9,15	18,67
Total	70	13,5087	3,09223	12,7714	14,2460	7,67	19,87

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 28: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PCB



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

En cuanto a las medidas realizadas sobre L5 (Tablas 41 y 42), no existe influencia sistémica de la inyección de PRGF, ya que no hay diferencias significativas entre los lados evaluados dentro del grupo PCB (Figura 29).

Tabla 41: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,6929	3,05795	10,8648	16,5211	8,62	17,79
1'	7	13,3995	2,83489	10,7776	16,0213	9,03	17,30
7d	7	13,9167	3,31052	10,8549	16,9784	8,77	18,44
14d	7	13,6377	3,18017	10,6965	16,5789	8,93	18,45
21d	7	13,7032	2,97231	10,9543	16,4521	9,33	18,03
28d	7	13,4095	3,00316	10,6321	16,1870	8,79	17,47
35d	7	13,4432	2,94789	10,7169	16,1696	9,07	17,79
42d	7	13,5218	2,96844	10,7765	16,2672	8,99	17,71
49d	7	13,2510	2,98239	10,4928	16,0093	8,52	17,32
56d	7	13,3312	3,01350	10,5442	16,1182	8,67	17,55
Total	70	13,5307	2,83194	12,8554	14,2059	8,52	18,45

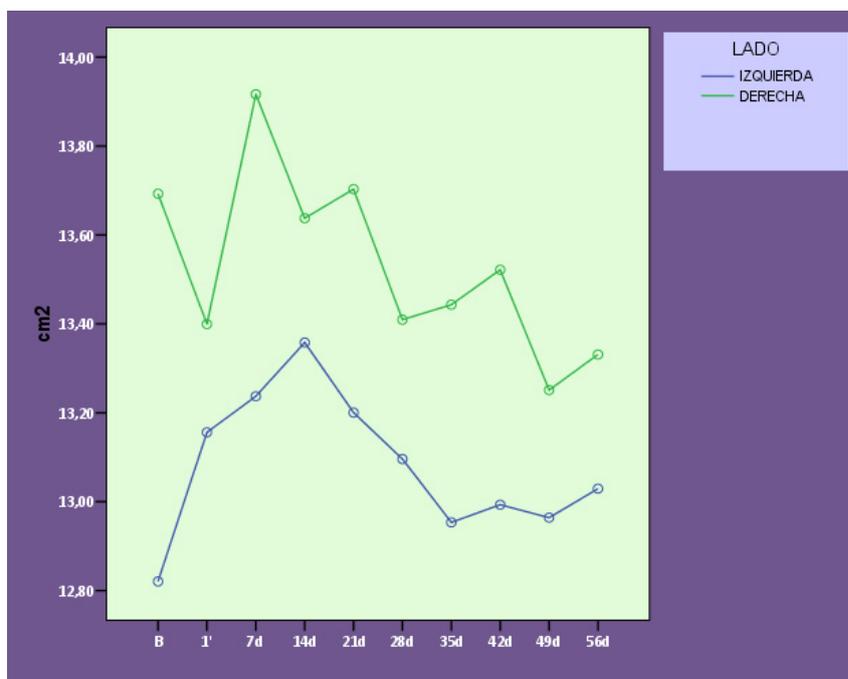
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 42: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,8206	3,59447	9,4963	16,1449	8,07	18,54
1'	7	13,1561	3,29802	10,1060	16,2063	8,75	19,00
7d	7	13,2373	3,06516	10,4025	16,0721	8,90	17,75
14d	7	13,3581	3,33807	10,2709	16,4453	8,38	18,22
21d	7	13,2005	3,18566	10,2543	16,1468	8,54	17,70
28d	7	13,0960	3,22172	10,1164	16,0756	8,35	18,00
35d	7	12,9534	3,21839	9,9769	15,9299	8,22	17,64
42d	7	12,9933	3,13842	10,0907	15,8958	8,40	17,58
49d	7	12,9641	3,15289	10,0482	15,8801	8,42	17,91
56d	7	13,0294	3,07111	10,1891	15,8697	8,69	17,79
Total	70	13,0809	3,01750	12,3614	13,8004	8,07	19,00

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 29: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PCB



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

A nivel de L6, entre las medidas de cada lado (Tablas 43 y 44), no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 30).

Tabla 43: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,9177	2,96131	10,1789	15,6564	7,95	16,35
1'	7	13,1437	2,59703	10,7418	15,5456	8,58	16,74
7d	7	13,1924	3,15377	10,2757	16,1092	8,71	17,51
14d	7	13,1645	2,98446	10,4044	15,9247	8,69	17,51
21d	7	13,2891	2,72951	10,7647	15,8135	9,04	16,99
28d	7	13,3006	3,03051	10,4978	16,1033	8,43	17,47
35d	7	13,2437	3,01849	10,4521	16,0353	8,41	17,53
42d	7	13,3174	2,88798	10,6465	15,9884	8,85	17,45
49d	7	13,0672	2,94021	10,3479	15,7864	8,18	17,00
56d	7	12,9077	2,87636	10,2476	15,5679	8,19	16,69
Total	70	13,1544	2,72835	12,5039	13,8050	7,95	17,53

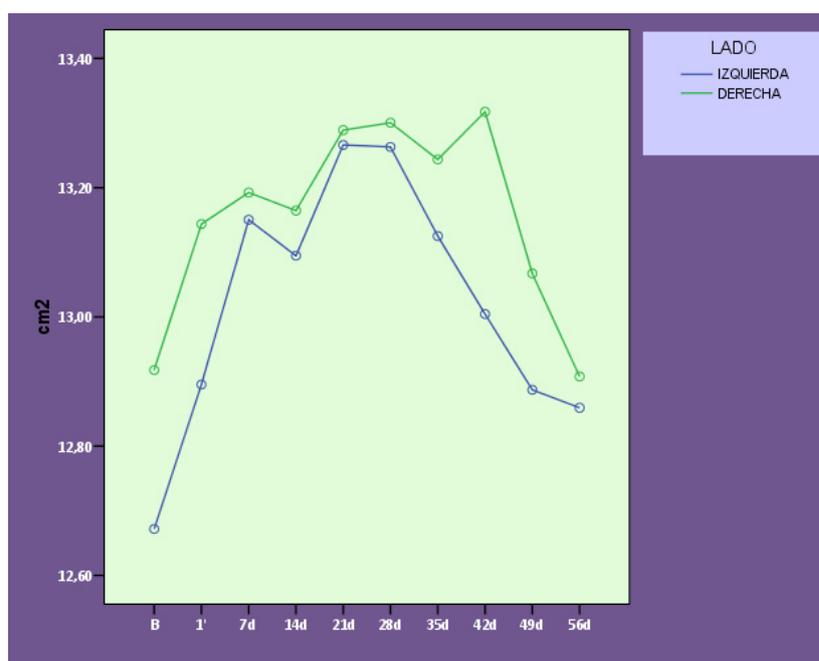
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 44: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6718	3,21722	9,6964	15,6472	7,98	16,36
1'	7	12,8954	3,64143	9,5276	16,2632	8,07	18,35
7d	7	13,1504	3,17001	10,2186	16,0821	8,44	18,09
14d	7	13,0946	3,05501	10,2692	15,9200	8,49	17,42
21d	7	13,2661	3,28404	10,2289	16,3033	8,50	17,78
28d	7	13,2631	3,41416	10,1055	16,4206	8,39	18,30
35d	7	13,1250	3,20805	10,1581	16,0920	8,43	17,58
42d	7	13,0044	3,17828	10,0650	15,9438	8,48	17,59
49d	7	12,8872	3,05782	10,0591	15,7152	8,52	17,03
56d	7	12,8594	3,21200	9,8888	15,8300	8,57	17,47
Total	70	13,0217	3,03435	12,2982	13,7452	7,98	18,35

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 30: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote PCB



GRUPO PRGF**MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4**

Al realizar la comparación entre el lado derecho y el izquierdo (Tablas 45 y 46) para valorar la existencia de efecto sistémico de la aplicación del PRGF, se observó que no hubo diferencias significativas a este nivel (Figura 31).

Tabla 45: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,6849	3,22287	10,7043	16,6656	9,49	18,34
1'	7	13,8237	3,48507	10,6005	17,0468	9,43	18,75
7d	7	13,6218	3,26706	10,6002	16,6433	9,12	18,22
14d	7	13,3332	3,31283	10,2693	16,3971	8,70	18,10
21d	7	13,3385	3,42606	10,1700	16,5071	8,64	18,32
28d	7	13,4206	3,43676	10,2421	16,5990	8,93	18,30
35d	7	13,4759	3,34329	10,3839	16,5679	8,96	18,06
42d	7	13,3231	3,34203	10,2322	16,4140	9,02	18,18
49d	7	13,2280	3,30381	10,1725	16,2835	8,94	17,69
56d	7	13,1721	3,29362	10,1260	16,2182	8,86	17,58
Total	70	13,4422	3,12493	12,6971	14,1873	8,64	18,75

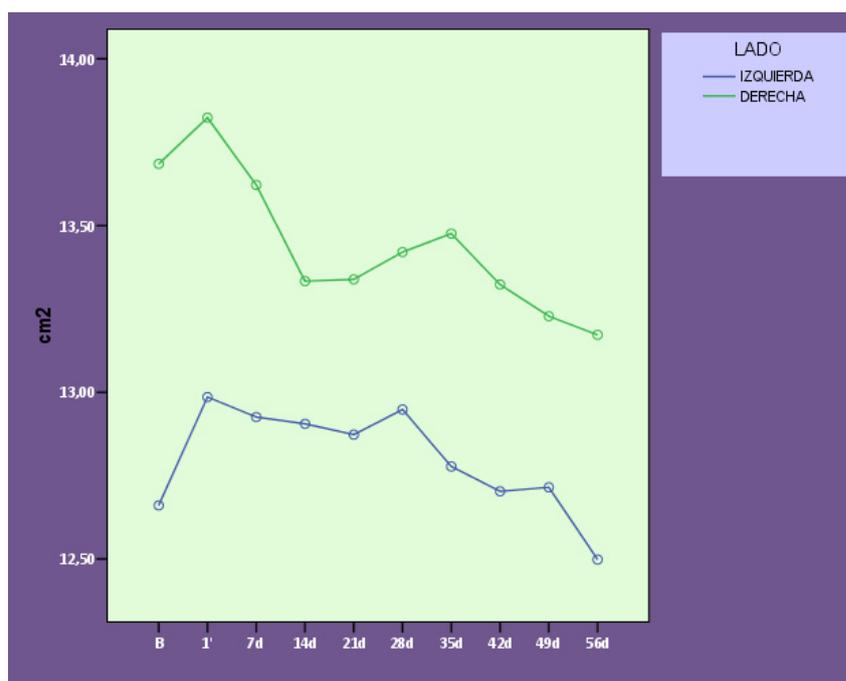
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 46: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6606	3,21875	9,6837	15,6374	8,18	17,04
1'	7	12,9856	3,66803	9,5932	16,3779	8,55	18,16
7d	7	12,9257	3,45443	9,7308	16,1205	9,09	18,15
14d	7	12,9053	3,27150	9,8797	15,9309	9,10	17,54
21d	7	12,8730	3,41776	9,7121	16,0339	9,14	17,83
28d	7	12,9483	3,38653	9,8162	16,0803	9,17	18,00
35d	7	12,7773	3,32008	9,7068	15,8479	9,03	17,69
42d	7	12,7029	3,14839	9,7911	15,6146	9,00	17,12
49d	7	12,7149	3,28303	9,6786	15,7512	8,94	17,34
56d	7	12,4981	3,29712	9,4488	15,5475	8,63	17,12
Total	70	12,7992	3,12684	12,0536	13,5447	8,18	18,16

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 31: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PRGF



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

A nivel de L5, no se obtuvieron diferencias significativas entre las medidas de cada lado (Tablas 47 y 48), (Figura 32).

Tabla 47: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,0306	3,65232	9,6528	16,4085	8,66	16,81
1'	7	12,7695	3,43927	9,5887	15,9503	8,67	16,72
7d	7	13,1736	3,77334	9,6838	16,6633	8,99	17,60
14d	7	13,2148	3,91752	9,5917	16,8379	8,92	17,39
21d	7	13,1586	3,80278	9,6416	16,6756	8,99	17,24
28d	7	13,0974	3,75187	9,6275	16,5673	8,90	17,08
35d	7	12,9476	3,66365	9,5593	16,3359	9,01	17,27
42d	7	12,9430	3,63191	9,5840	16,3020	8,89	16,98
49d	7	13,0097	3,73815	9,5525	16,4669	9,03	17,24
56d	7	12,8471	3,70990	9,4160	16,2782	8,77	16,87
Total	70	13,0192	3,46239	12,1936	13,8448	8,66	17,60

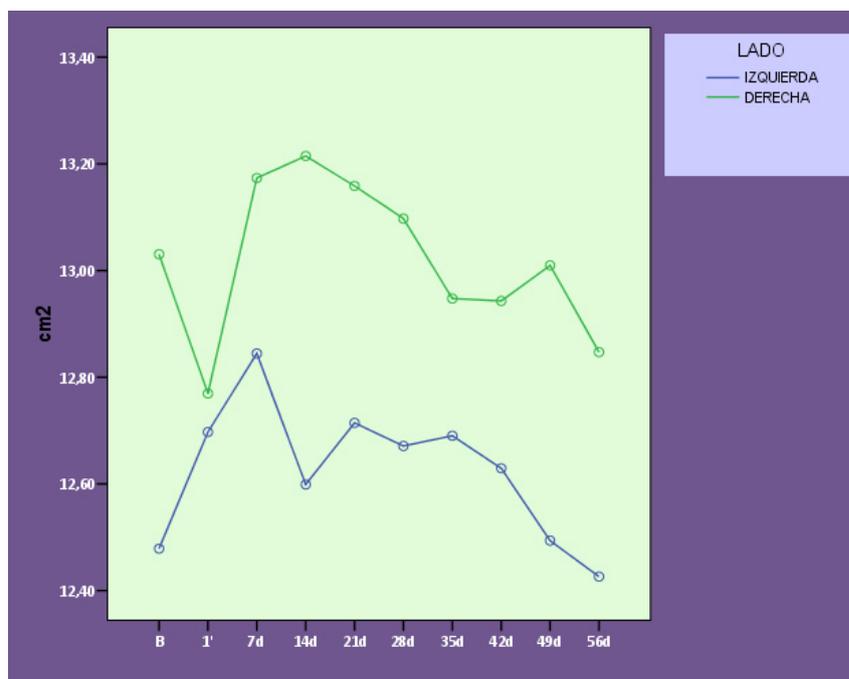
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 48: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda del lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,4787	3,05952	9,6491	15,3083	8,55	16,87
1'	7	12,6973	3,13883	9,7944	15,6002	8,46	16,73
7d	7	12,8446	3,17956	9,9040	15,7852	9,25	17,39
14d	7	12,5990	2,98462	9,8387	15,3593	8,96	17,23
21d	7	12,7145	3,09607	9,8511	15,5778	9,05	17,23
28d	7	12,6711	3,03263	9,8664	15,4758	9,05	17,11
35d	7	12,6903	3,04750	9,8718	15,5088	8,95	17,03
42d	7	12,6294	3,12420	9,7400	15,5188	8,90	17,02
49d	7	12,4938	3,09277	9,6334	15,3541	8,83	16,95
56d	7	12,4263	3,09189	9,5668	15,2858	8,76	16,80
Total	70	12,6245	2,87957	11,9379	13,3111	8,46	17,39

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 32: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PRGF



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

Entre las medidas de cada lado estudiado (Tablas 49 y 50), a nivel de L6 no existen diferencias significativas (Figura 33).

Tabla 49: Medidas musculares a nivel de L6 derecha del lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,3081	3,02466	10,5108	16,1055	8,98	17,11
1'	7	12,9881	2,82409	10,3762	15,5999	8,85	16,00
7d	7	13,3294	3,12493	10,4393	16,2195	9,34	17,70
14d	7	13,0357	3,14029	10,1314	15,9400	9,01	17,53
21d	7	13,1255	3,08157	10,2756	15,9755	8,98	17,31
28d	7	13,2074	3,08769	10,3518	16,0631	9,09	17,49
35d	7	13,0173	3,08580	10,1635	15,8712	8,85	17,18
42d	7	12,9165	3,04155	10,1035	15,7295	9,04	16,95
49d	7	12,9906	3,16436	10,0640	15,9171	9,00	17,32
56d	7	12,8458	3,03041	10,0432	15,6485	8,97	17,00
Total	70	13,0765	2,85940	12,3947	13,7583	8,85	17,70

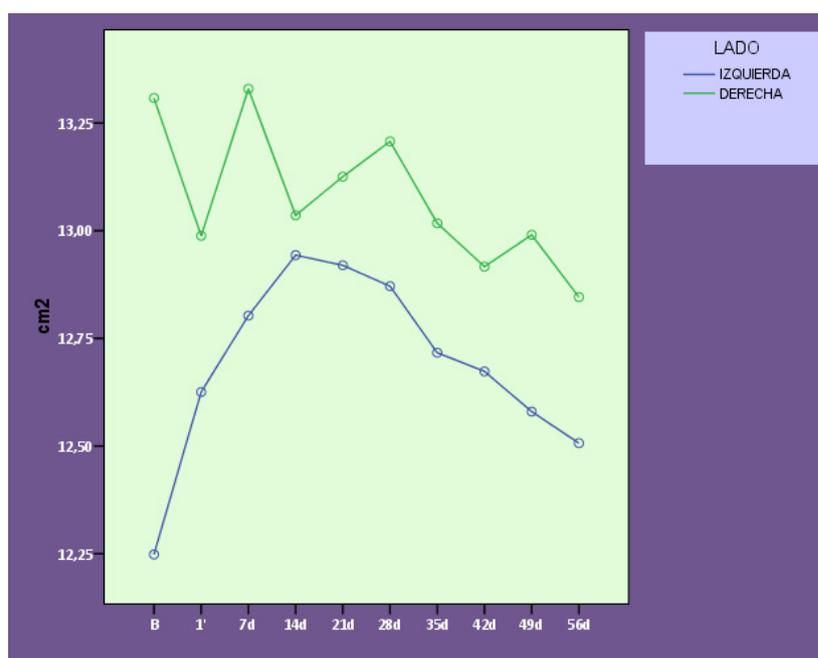
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 50: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda del lote PRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,2483	2,95542	9,5150	14,9816	8,20	16,32
1'	7	12,6254	3,19816	9,6676	15,5832	8,65	17,34
7d	7	12,8029	3,26397	9,7842	15,8216	9,07	17,27
14d	7	12,9432	3,61504	9,5999	16,2866	8,94	18,56
21d	7	12,9197	3,59860	9,5915	16,2478	8,72	18,44
28d	7	12,8711	3,46338	9,6680	16,0742	8,89	18,13
35d	7	12,7167	3,30792	9,6574	15,7760	8,79	17,45
42d	7	12,6733	3,40436	9,5248	15,8218	8,85	17,79
49d	7	12,5800	3,37927	9,4547	15,7053	8,67	17,54
56d	7	12,5067	3,38670	9,3745	15,6389	8,50	17,34
Total	70	12,6887	3,14196	11,9396	13,4379	8,20	18,56

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 33: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote PRGF



GRUPO HPRGF**MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4**

En cuanto a las medidas musculares de L4 (Tablas 51 y 52), no se encontraron diferencias significativas entre los lados evaluados (Figura 34).

Tabla 51: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	14,0574	2,66965	11,5884	16,5264	9,19	17,84
1'	7	14,1189	2,67266	11,6471	16,5907	9,07	17,28
7d	7	14,1080	2,61363	11,6908	16,5252	8,92	17,40
14d	7	14,0531	2,66139	11,5918	16,5145	8,97	17,51
21d	7	14,1743	2,70973	11,6682	16,6804	8,91	17,60
28d	7	13,9111	2,62255	11,4857	16,3366	8,88	17,38
35d	7	13,9342	2,65372	11,4799	16,3884	8,73	17,34
42d	7	13,9850	2,68011	11,5063	16,4637	8,92	17,71
49d	7	13,8203	2,62984	11,3881	16,2525	8,67	17,24
56d	7	13,7965	2,62306	11,3706	16,2225	8,71	17,27
Total	70	13,9959	2,47771	13,4051	14,5867	8,67	17,84

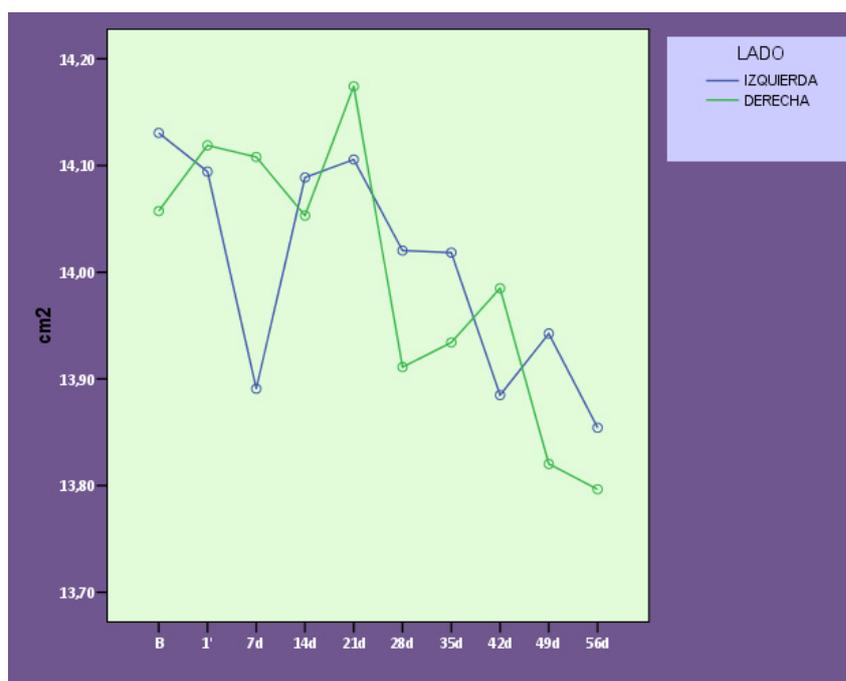
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 52: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	14,1306	3,18878	11,1814	17,0797	10,32	19,53
1'	7	14,0943	3,16958	11,1629	17,0257	9,95	18,64
7d	7	13,8908	2,96269	11,1508	16,6309	10,15	18,45
14d	7	14,0888	3,14237	11,1826	16,9950	9,92	19,03
21d	7	14,1056	2,91245	11,4121	16,7992	10,50	18,48
28d	7	14,0203	2,91996	11,3198	16,7208	10,37	18,51
35d	7	14,0184	2,97835	11,2639	16,7729	10,10	18,38
42d	7	13,8848	2,99590	11,1141	16,6556	10,25	18,21
49d	7	13,9425	2,87334	11,2851	16,5999	10,44	18,20
56d	7	13,8543	2,96583	11,1113	16,5972	10,10	18,39
Total	70	14,0030	2,81123	13,3327	14,6734	9,92	19,53

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 34: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote HPRGF



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

Entre lados (Tablas 53 y 54), a nivel de L5, no hubo diferencias estadísticamente significativas (Figura 35).

Tabla 53: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,3420	3,26811	10,3195	16,3645	8,76	17,39
1'	7	13,7942	3,26939	10,7705	16,8178	9,38	17,22
7d	7	13,7503	3,47386	10,5375	16,9631	8,81	17,63
14d	7	13,8477	3,27942	10,8147	16,8806	8,93	17,44
21d	7	13,7918	3,13532	10,8921	16,6915	9,12	17,56
28d	7	13,7508	3,20884	10,7832	16,7185	9,24	17,44
35d	7	13,5856	3,13683	10,6845	16,4866	9,13	17,56
42d	7	13,5114	3,11436	10,6311	16,3917	9,18	17,45
49d	7	13,4836	3,03343	10,6782	16,2891	8,95	17,09
56d	7	13,3124	3,16431	10,3859	16,2389	9,01	17,15
Total	70	13,6170	2,99970	12,9017	14,3322	8,76	17,63

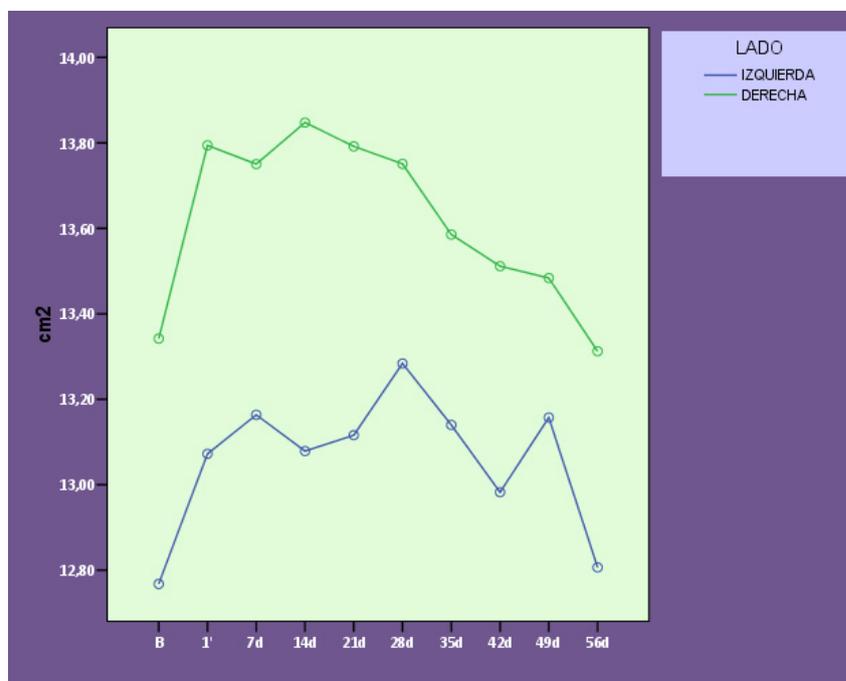
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 54: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,7679	3,53558	9,4980	16,0377	9,56	18,80
1'	7	13,0724	3,19566	10,1169	16,0279	9,63	17,86
7d	7	13,1636	3,17265	10,2294	16,0978	9,81	18,20
14d	7	13,0788	3,30212	10,0248	16,1327	9,27	18,32
21d	7	13,1161	3,23571	10,1235	16,1086	9,53	18,24
28d	7	13,2839	3,07828	10,4369	16,1308	9,62	18,10
35d	7	13,1399	3,09266	10,2797	16,0001	9,77	18,11
42d	7	12,9825	3,08857	10,1261	15,8390	9,54	18,06
49d	7	13,1573	2,98856	10,3933	15,9213	9,67	17,77
56d	7	12,8065	3,15579	9,8879	15,7251	9,44	17,70
Total	70	13,0569	2,97668	12,3471	13,7666	9,27	18,80

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 35: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote HPRGF



MEDIDAS ECOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

A nivel de L6, no se observaron diferencias significativas entre el lado derecho (Tabla 55) e izquierdo (Tabla 56), (Figura 36).

Tabla 55: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,4114	2,89002	10,7386	16,0843	8,82	16,44
1'	7	13,8065	3,03459	10,9999	16,6130	8,39	17,10
7d	7	13,6718	3,15831	10,7508	16,5927	9,67	17,47
14d	7	13,4457	3,08835	10,5894	16,3019	9,16	16,81
21d	7	13,5048	3,05652	10,6779	16,3316	9,32	17,07
28d	7	13,5623	2,88694	10,8923	16,2323	9,60	16,71
35d	7	13,5258	2,82729	10,9110	16,1406	9,60	16,56
42d	7	13,6287	2,72911	11,1047	16,1527	9,67	16,50
49d	7	13,4117	2,90212	10,7277	16,0957	9,17	16,27
56d	7	13,3515	2,90901	10,6611	16,0419	9,21	16,33
Total	70	13,5320	2,75493	12,8751	14,1889	8,39	17,47

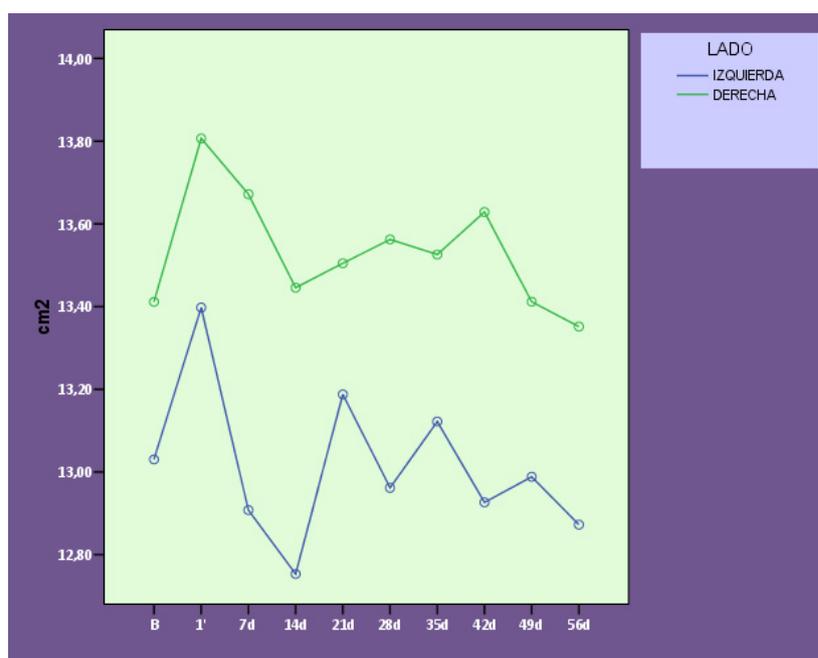
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 56: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,0303	3,00073	10,2551	15,8055	10,24	17,53
1'	7	13,3977	3,21298	10,4261	16,3692	10,27	18,68
7d	7	12,9078	2,50484	10,5912	15,2244	10,79	17,34
14d	7	12,7535	2,91556	10,0570	15,4499	9,42	17,42
21d	7	13,1877	2,93968	10,4689	15,9064	10,49	18,04
28d	7	12,9618	2,85039	10,3256	15,5979	10,03	17,64
35d	7	13,1220	2,70177	10,6233	15,6207	10,34	17,47
42d	7	12,9265	2,69229	10,4366	15,4165	9,98	17,38
49d	7	12,9884	2,76611	10,4301	15,5466	10,31	17,46
56d	7	12,8727	2,68767	10,3870	15,3584	10,17	17,21
Total	70	13,0148	2,64807	12,3834	13,6462	9,42	18,68

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 36: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 derecha e izquierda en el lote HPRGF



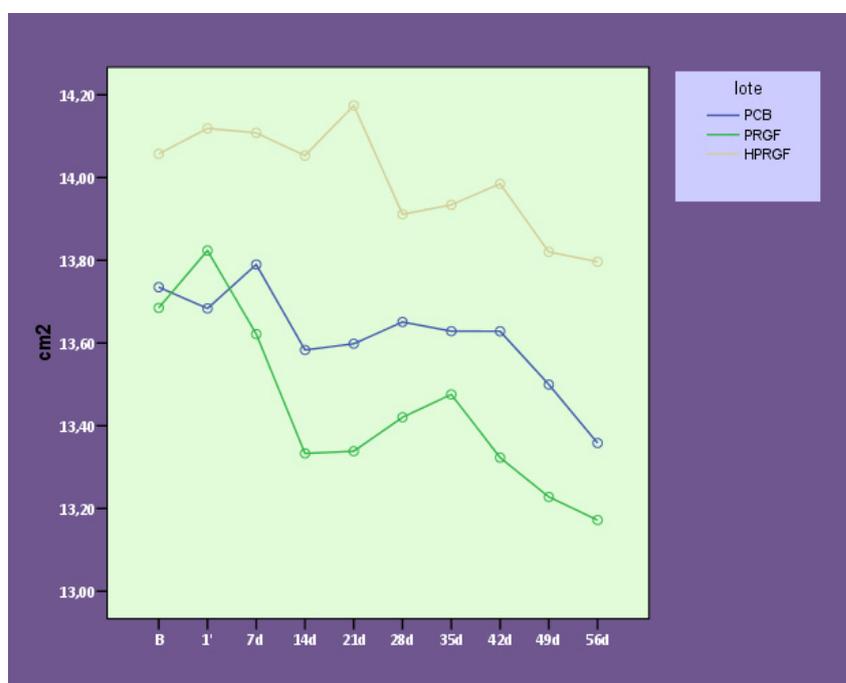
Comparación de las imágenes ecográficas entre lotes de estudio

Para la comparación de las diferentes medidas musculares entre los lotes de estudio y evaluar la influencia sobre la musculatura de la inyección de PRGF, se realizó un ANOVA y una prueba posthoc de tukey, para contrastar el volumen muscular en el tiempo.

MEDIDAS DE L4 A NIVEL DEL LADO DERECHO

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las medidas de L4 en el lado derecho entre los 3 grupos de estudio (Figura 37).

Figura 37: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel derecho entre los 3 lotes.

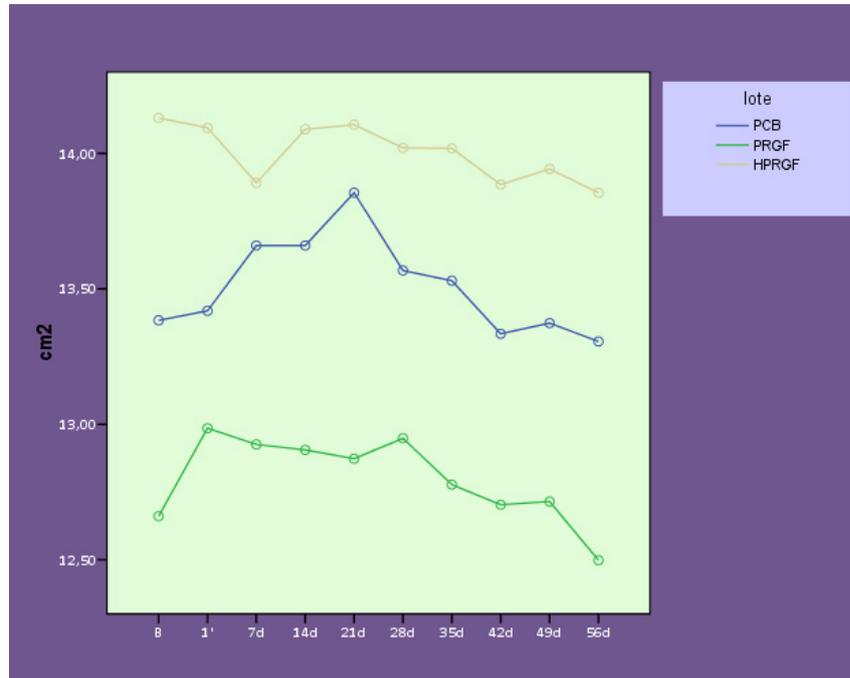


cm²: centímetros cuadrados.

MEDIDAS DE L4 A NIVEL DEL LADO IZQUIERDO

En cuanto a los resultados de L4 a nivel del lado izquierdo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos de estudio (Figura 38).

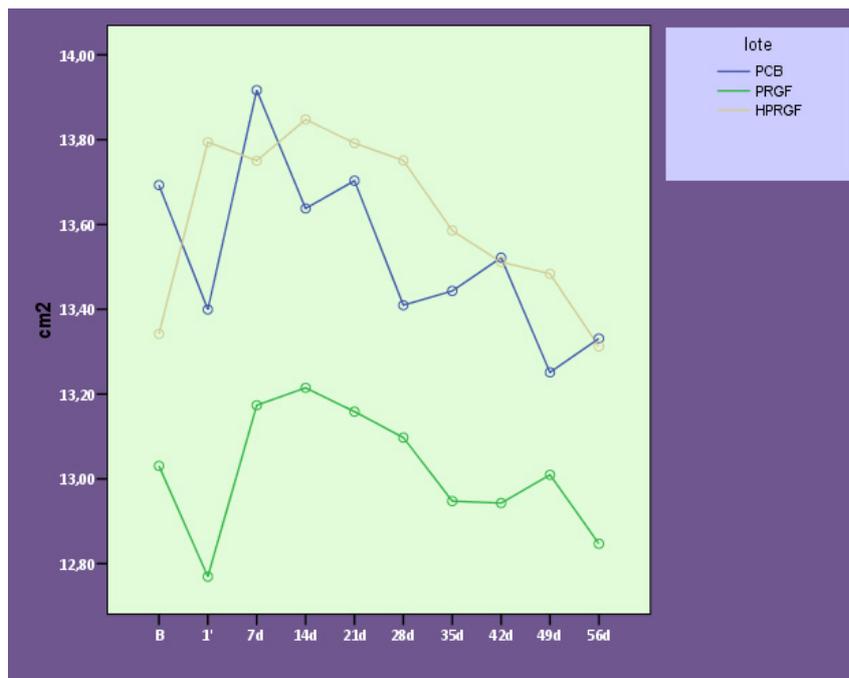
Figura 38: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L5 A NIVEL DEL LADO DERECHO

Entre las medidas musculares a nivel de L5 en el lado derecho, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Figura 39).

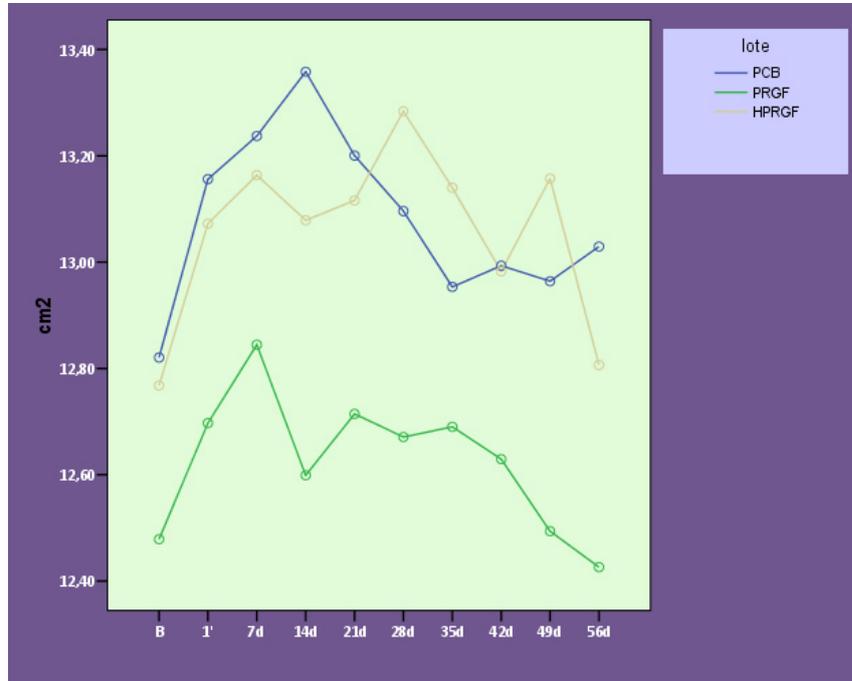
Figura 39: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel derecho entre los 3 lotes



MEDIDAS DE L5 A NIVEL DEL LADO IZQUIERDO

En el lado izquierdo de L5 no se detectaron diferencias significativas entre grupos (Figura 40).

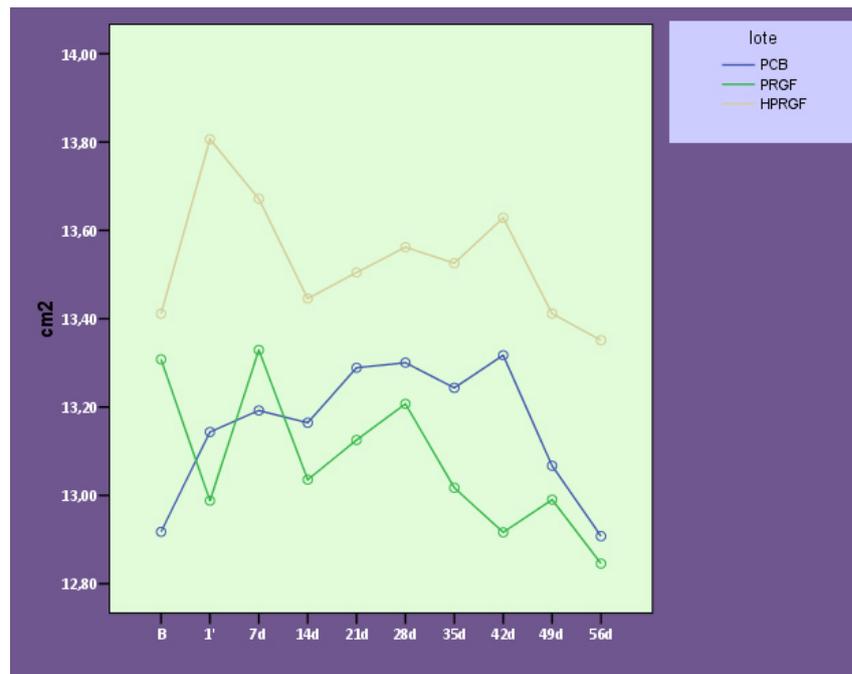
Figura 40: Comparación de la evolución en el tiempo de L5 a nivel izquierdo entre los 3 lotes



MEDIDAS DE L6 A NIVEL DEL LADO DERECHO

En este nivel no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de estudio (Figura 41).

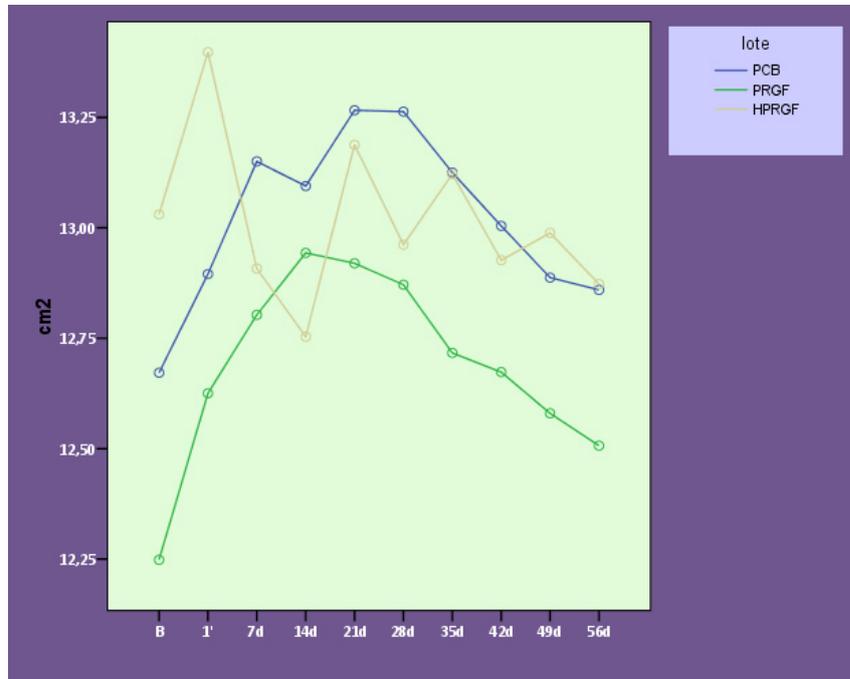
Figura 41: Comparación de la evolución en el tiempo de L6 a nivel derecho entre los 3 lotes



MEDIDAS DE L6 A NIVEL IZQUIERDO

Entre los 3 lotes de estudio, no se observaron diferencias significativas en el lado izquierdo de L6 (Figura 42).

Figura 42: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel izquierdo entre los 3 lotes



Estudio de las imágenes obtenidas por Tomografía Axial Computerizada

Dentro de este estudio se evaluaron las medidas musculares obtenidas de las imágenes tomadas por TC. Al igual que en las imágenes ecográficas, el procesamiento de estas imágenes está dividido en 2 partes, por un lado el estudio de las medidas musculares comparando cada lado (derecho e izquierdo) dentro de cada lote y por otro, la comparación entre lotes de estudio de las medidas de cada lado evaluado y su evolución en el tiempo.

Comparación de las imágenes de la TC por lotes de estudio

A continuación se describen los resultados de las medidas musculares obtenidas por TC, por grupo de estudio y por tiempo. Para ello se realizó el ANOVA de un factor.

GRUPO PCB

MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4

En cuanto a las medidas musculares de L4 en este grupo (Tablas 57 y 58), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 2 lados estudiados (Figura 43).

Tabla 57: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,1238	2,47471	10,8350	15,4125	10,29	16,57
14d	7	13,4636	2,65400	11,0090	15,9181	10,05	17,85
28d	7	12,9709	2,80134	10,3801	15,5617	9,26	17,42
42d	7	12,8849	2,84805	10,2509	15,5189	9,55	17,33
56d	7	12,9410	2,54142	10,5905	15,2914	10,20	17,52
Total	35	13,0768	2,51491	12,2129	13,9407	9,26	17,85

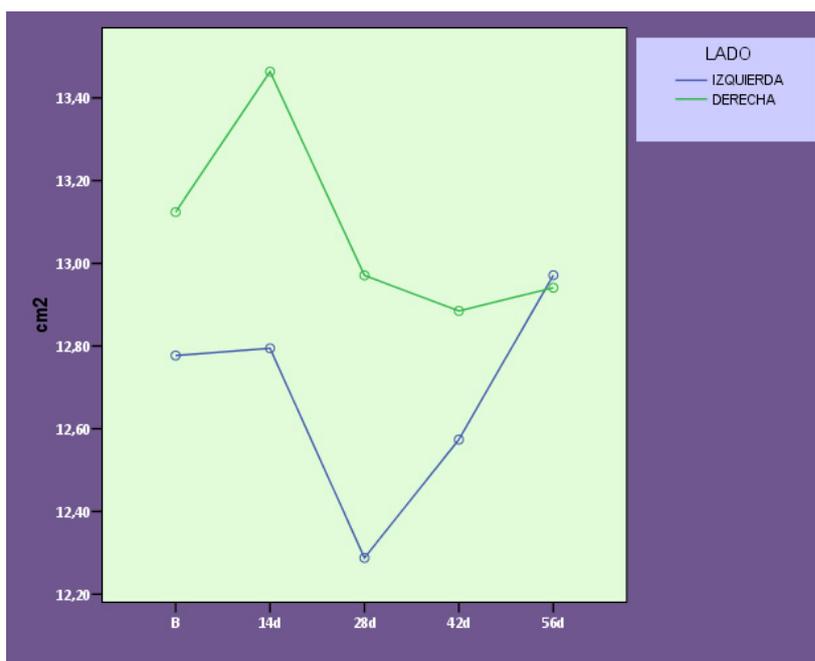
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 58: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,7771	2,45295	10,5085	15,0457	9,15	16,62
14d	7	12,7945	2,77476	10,2283	15,3607	9,06	17,57
28d	7	12,2877	2,84000	9,6612	14,9143	9,18	17,35
42d	7	12,5739	2,80338	9,9812	15,1666	9,29	17,52
56d	7	12,9713	2,65506	10,5157	15,4268	10,24	17,25
Total	35	12,6809	2,55555	11,8030	13,5588	9,06	17,57

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 43: Comparación de la evolución en el tiempo de L4 derecha e izquierda en el lote PCB.



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

A nivel de L5, las medidas musculares evaluadas de cada lado (Tablas 59 y 60), no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 44).

Tabla 59: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,0356	2,64260	10,5916	15,4796	9,48	17,59
14d	7	12,9568	2,30985	10,8206	15,0931	9,46	16,45
28d	7	12,2212	2,63011	9,7887	14,6536	9,03	16,80
42d	7	12,9943	2,49929	10,6828	15,3057	9,67	17,52
56d	7	13,3200	2,43807	11,0652	15,5749	10,14	17,51
Total	35	12,9056	2,38398	12,0867	13,7245	9,03	17,59

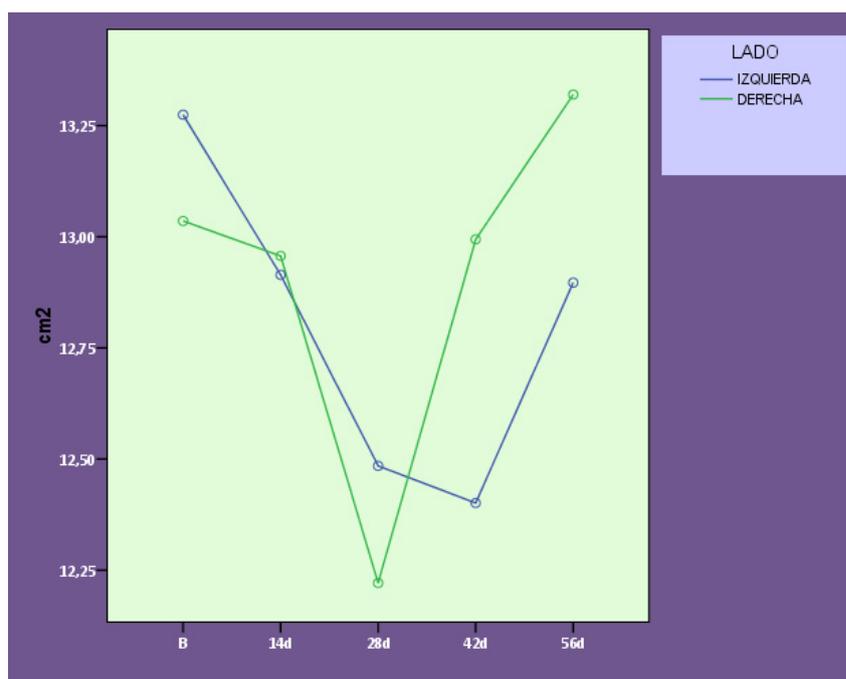
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 60: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,2745	2,61927	10,8521	15,6969	9,24	17,73
14d	7	12,9144	2,68165	10,4343	15,3945	9,56	17,49
28d	7	12,4847	2,50730	10,1658	14,8036	9,46	16,56
42d	7	12,4011	2,47292	10,1141	14,6882	9,05	16,28
56d	7	12,8968	2,56725	10,5225	15,2711	10,01	17,33
Total	35	12,7943	2,43629	11,9574	13,6312	9,05	17,73

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 44: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PCB.



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

En cuanto a L6, no hubo diferencias significativas entre los lados musculares analizados (Tablas 61 y 62), (Figura 45).

Tabla 61: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6407	2,42938	10,3939	14,8875	9,16	16,79
14d	7	12,7347	2,87645	10,0744	15,3949	8,95	17,83
28d	7	12,2520	2,67124	9,7815	14,7225	8,97	16,79
42d	7	12,5562	2,72867	10,0326	15,0798	9,12	17,01
56d	7	12,6526	2,53584	10,3073	14,9978	9,99	16,76
Total	35	12,5672	2,49768	11,7092	13,4252	8,95	17,83

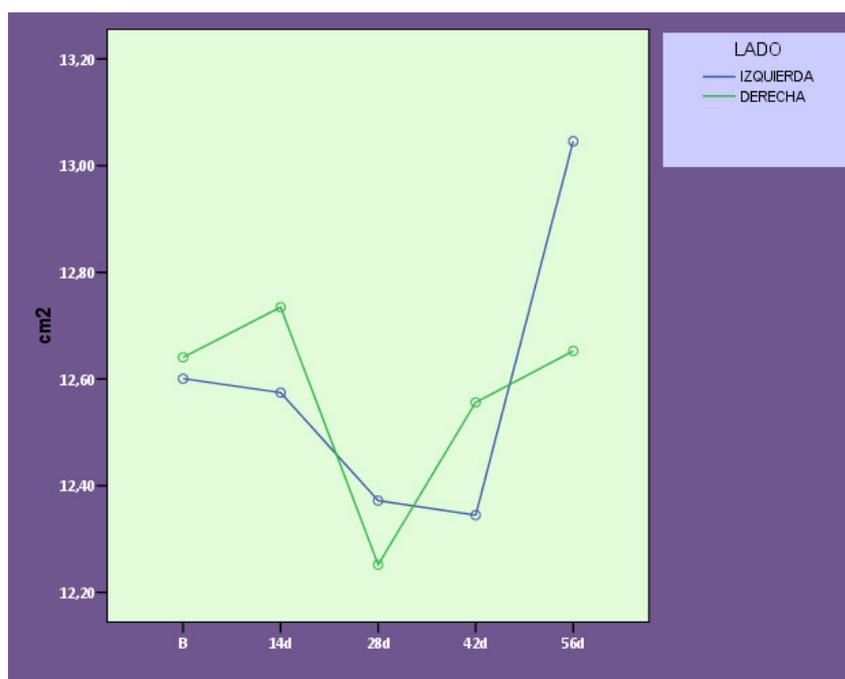
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar

Tabla 62: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PCB en cada uno de los tiempos

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6007	2,30183	10,4719	14,7296	9,64	17,02
14d	7	12,5745	2,48746	10,2740	14,8751	9,54	17,25
28d	7	12,3721	2,51012	10,0506	14,6936	9,46	16,91
42d	7	12,3449	2,86616	9,6941	14,9956	8,95	17,51
56d	7	13,0458	2,54070	10,6961	15,3956	10,10	17,11
Total	35	12,5876	2,40679	11,7609	13,4144	8,95	17,51

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 45: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote PCB.



GRUPO PRGF**MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4**

Al igual que en el lote PCB, en este grupo de estudio no se observaron diferencias significativas entre el tamaño muscular a nivel de L4 de ambos lados (Tablas 63 y 64),(Figura 46).

Tabla 63: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,1380	2,74897	10,5956	15,6804	9,48	15,80
14d	7	12,2920	2,66673	9,8257	14,7583	9,23	15,74
28d	7	12,7182	3,42920	9,5467	15,8897	9,00	17,02
42d	7	12,4905	2,91810	9,7917	15,1893	9,00	15,93
56d	7	12,0121	2,92086	9,3108	14,7135	8,86	15,90
Total	35	12,5302	2,79689	11,5694	13,4909	8,86	17,02

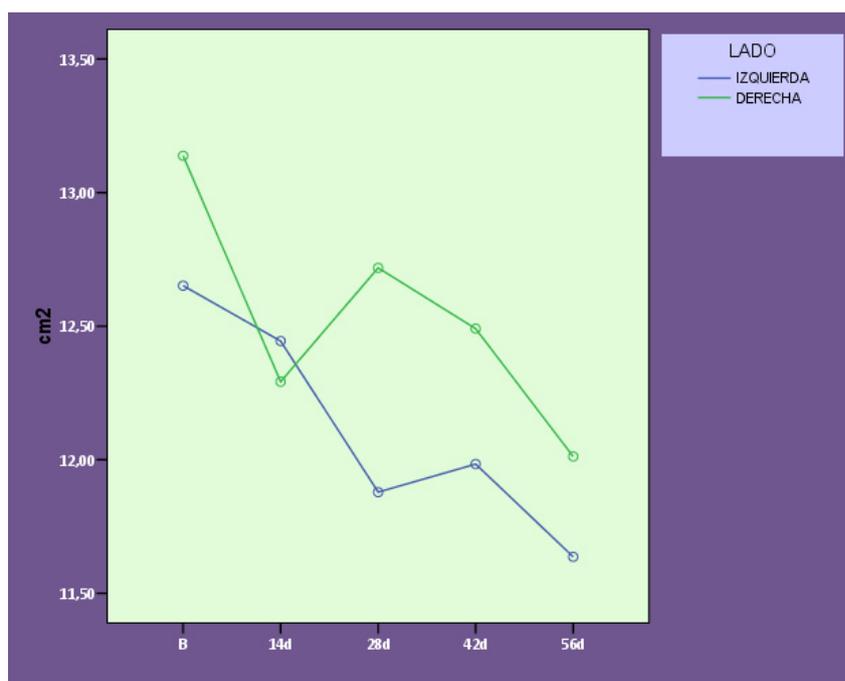
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 64: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6516	2,43676	10,3980	14,9053	9,92	15,19
14d	7	12,4444	2,24656	10,3667	14,5221	9,53	14,80
28d	7	11,8788	2,92539	9,1732	14,5843	8,81	16,45
42d	7	11,9837	2,60425	9,5752	14,3922	8,96	15,21
56d	7	11,6363	2,33271	9,4789	13,7937	8,87	14,79
Total	35	12,1190	2,39784	11,2953	12,9426	8,81	16,45

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 46: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote PRGF.



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

En cuanto a las medidas musculares a nivel de L5 (Tablas 65 y 66), no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el lado derecho e izquierdo (Figura 47).

Tabla 65: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,1600	2,15271	11,1691	15,1509	10,64	15,30
14d	7	12,6148	2,44346	10,3550	14,8746	9,35	15,85
28d	7	12,3980	3,27968	9,3648	15,4312	9,12	16,79
42d	7	11,9006	2,46659	9,6194	14,1818	9,29	15,02
56d	7	11,3035	2,43427	9,0521	13,5548	8,78	14,99
Total	35	12,2754	2,51003	11,4131	13,1376	8,78	16,79

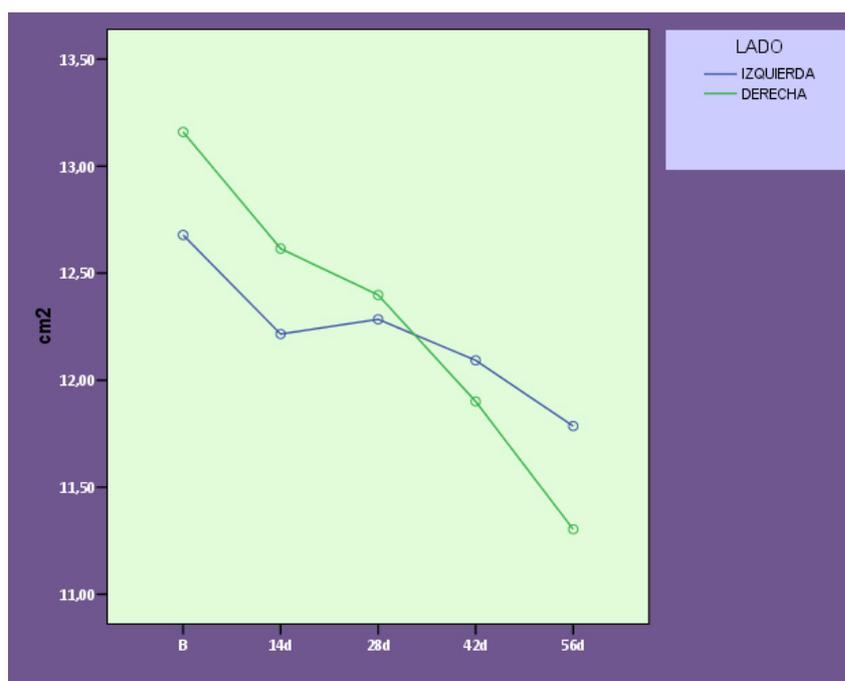
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 66: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6787	2,36996	10,4868	14,8705	9,96	15,22
14d	7	12,2155	2,46025	9,9402	14,4909	9,47	15,14
28d	7	12,2847	3,32585	9,2088	15,3606	9,03	16,89
42d	7	12,0928	2,73163	9,5665	14,6191	8,87	15,63
56d	7	11,7855	2,42558	9,5423	14,0288	9,26	15,14
Total	35	12,2114	2,54021	11,3389	13,0840	8,87	16,89

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 47: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote PRGF.



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

Entre las medidas musculares de ambos lados a nivel de L6 (Tablas 67 y 68), no se detectaron diferencias significativas entre los dos lados evaluados (Figura 48).

Tabla 67: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,2700	2,58053	10,8834	15,6566	10,11	15,87
14d	7	12,4295	2,52305	10,0961	14,7630	9,46	15,79
28d	7	12,2151	3,32941	9,1359	15,2943	8,83	16,79
42d	7	12,0408	2,43982	9,7843	14,2973	8,70	15,20
56d	7	11,6261	2,26380	9,5325	13,7198	9,23	15,24
Total	35	12,3163	2,55250	11,4395	13,1931	8,70	16,79

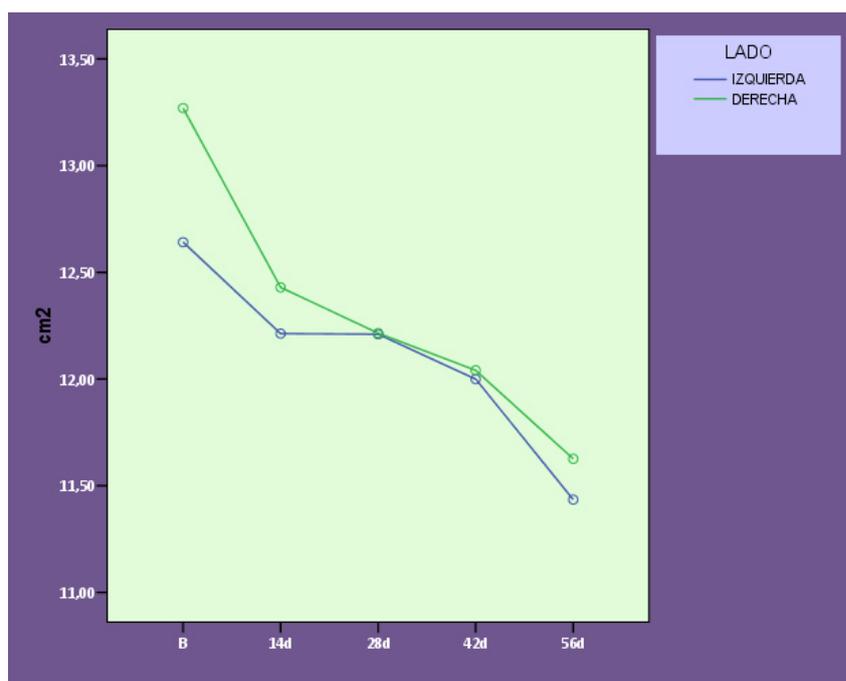
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 68: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote PRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,6415	2,55207	10,2812	15,0017	9,32	15,80
14d	7	12,2128	2,78021	9,6416	14,7841	9,26	16,57
28d	7	12,2099	3,30966	9,1490	15,2709	9,16	17,01
42d	7	11,9997	2,95030	9,2712	14,7283	8,52	15,79
56d	7	11,4349	2,41394	9,2024	13,6674	8,97	15,15
Total	35	12,0998	2,67758	11,1800	13,0196	8,52	17,01

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 48: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote PRGF



GRUPO HPRGF**MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L4**

A nivel de L4, no hubo diferencias significativas entre el tamaño muscular de ambos lados (Tablas 69 y 70),(Figura 49).

Tabla 69: Medidas musculares a nivel de L4 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,0523	2,52375	10,7182	15,3864	9,55	17,46
14d	7	12,8458	2,66286	10,3831	15,3085	9,50	17,13
28d	7	12,8370	2,39769	10,6195	15,0545	9,84	16,78
42d	7	12,9897	2,91273	10,2959	15,6835	8,99	17,56
56d	7	12,4473	2,89259	9,7721	15,1225	8,80	17,37
Total	35	12,8344	2,53164	11,9648	13,7041	8,80	17,56

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 70: Medidas musculares a nivel de L4 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,1903	2,78927	10,6106	15,7699	9,25	17,10
14d	7	13,2542	2,77612	10,6867	15,8217	9,63	17,52
28d	7	12,8368	2,41292	10,6052	15,0684	8,94	16,33
42d	7	13,2850	2,93085	10,5744	15,9956	9,08	17,86
56d	7	12,7486	2,85278	10,1102	15,3870	8,96	16,76
Total	35	13,0630	2,60084	12,1696	13,9564	8,94	17,86

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 49: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 derecha e izquierda en el lote HPRGF



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L5

En cuanto al tamaño muscular a nivel de L5 (Tablas 71 y 72), no se observaron diferencias significativas entre lados (Figura 50).

Tabla 71: Medidas musculares a nivel de L5 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,1201	2,77857	10,5504	15,6899	9,12	16,75
14d	7	13,4938	2,77474	10,9276	16,0600	9,63	17,10
28d	7	13,3746	2,56664	11,0009	15,7484	8,95	16,89
42d	7	13,4408	2,98540	10,6797	16,2018	9,50	17,74
56d	7	12,7955	2,84526	10,1641	15,4270	9,14	16,91
Total	35	13,2450	2,63704	12,3391	14,1508	8,95	17,74

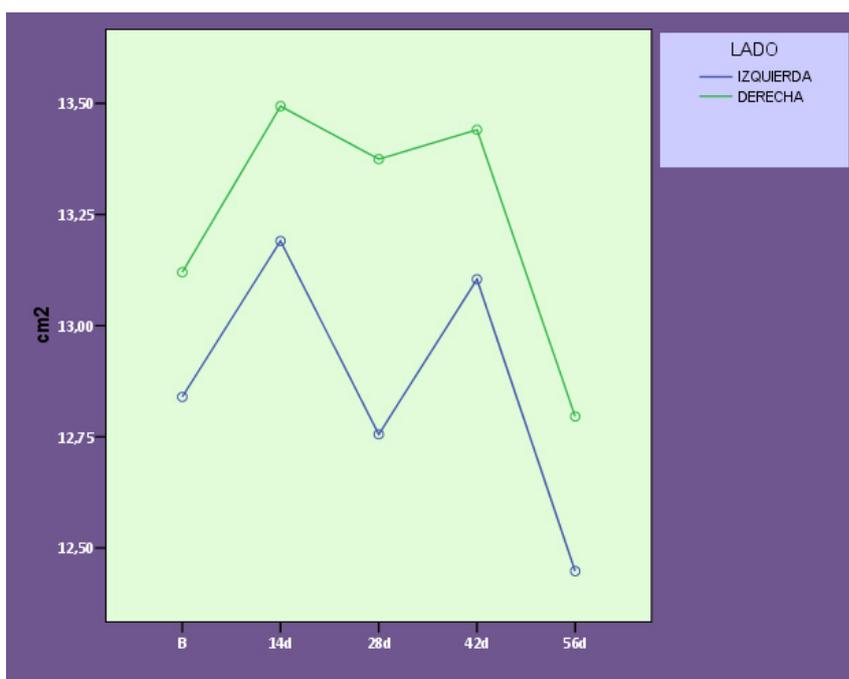
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 72: Medidas musculares a nivel de L5 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,8397	2,87551	10,1803	15,4991	9,03	16,92
14d	7	13,1906	2,81014	10,5916	15,7895	8,99	16,99
28d	7	12,7554	2,57271	10,3760	15,1348	9,14	16,85
42d	7	13,1043	3,05691	10,2772	15,9315	9,16	17,50
56d	7	12,4475	3,12789	9,5547	15,3403	8,96	16,79
Total	35	12,8675	2,73285	11,9287	13,8063	8,96	17,50

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 50: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 derecha e izquierda en el lote HPRGF



MEDIDAS TOMOGRÁFICAS REALIZADAS A NIVEL DE L6

Entre las medidas musculares de L6 no hubo diferencias significativas entre los lados de estudio (Tablas 73 y 74), (Figura 51).

Tabla 73: Medidas musculares a nivel de L6 derecha en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	13,3452	2,72141	10,8284	15,8621	9,21	15,85
14d	7	13,5436	3,15153	10,6289	16,4583	9,06	17,23
28d	7	13,0386	2,24200	10,9651	15,1121	9,58	16,18
42d	7	13,1279	2,78055	10,5563	15,6995	9,60	16,42
56d	7	12,2070	2,79898	9,6183	14,7956	9,03	15,88
Total	35	13,0525	2,62856	12,1495	13,9554	9,03	17,23

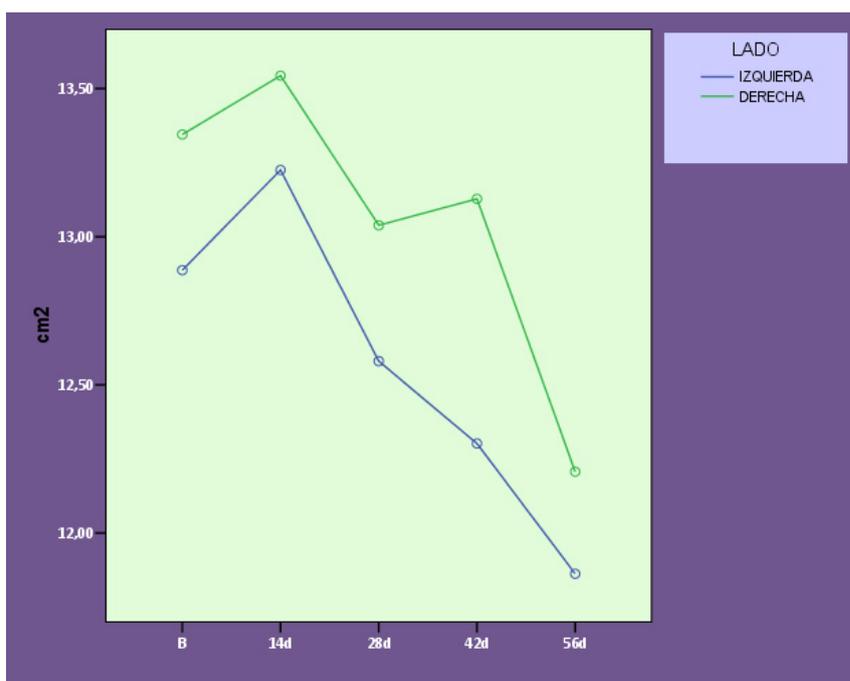
N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Tabla 74: Medidas musculares a nivel de L6 izquierda en el lote HPRGF en cada uno de los tiempos.

Tiempos	N	Media	DE	Intervalo confianza 95%		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
B	7	12,8872	2,94796	10,1608	15,6136	8,90	16,92
14d	7	13,2253	3,01779	10,4343	16,0163	9,13	17,28
28d	7	12,5801	2,86641	9,9291	15,2310	9,12	17,64
42d	7	12,3021	2,90253	9,6178	14,9865	9,04	16,93
56d	7	11,8623	2,76422	9,3058	14,4188	8,96	16,90
Total	35	12,5714	2,76637	11,6211	13,5217	8,90	17,64

N: tamaño de la muestra; DE: desviación estándar.

Figura 51: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 derecha e izquierda en el lote HPRGF



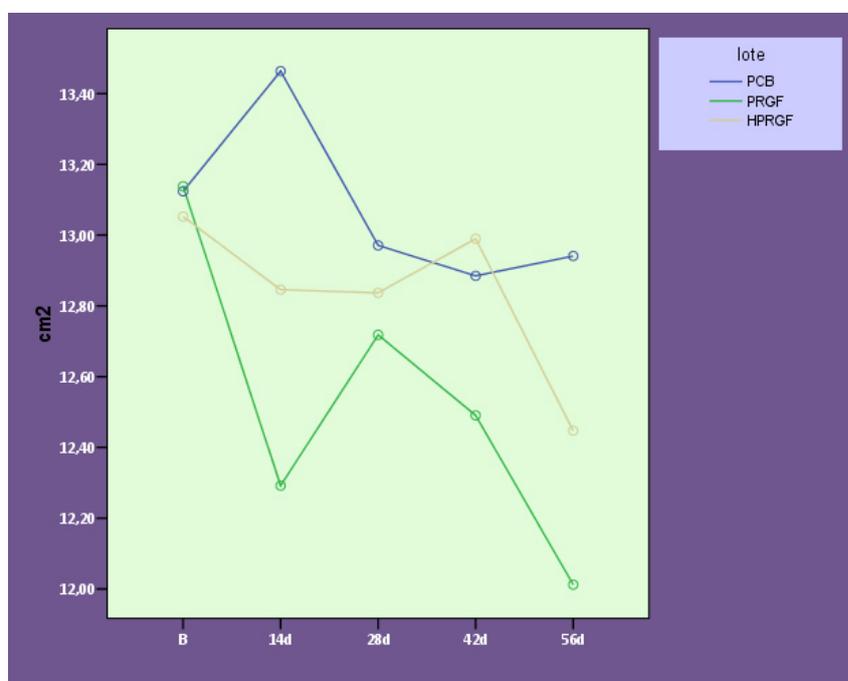
Comparación de las imágenes de la TC entre lotes de estudio

Para evaluar la influencia sobre la musculatura a nivel local de la inyección de PRGF se compararon las diferentes medidas musculares tomadas por tomografía axial computerizada entre los lotes de estudio y su evolución en el tiempo mediante un ANOVA y una prueba posthoc de tukey.

MEDIDAS DE L4 A NIVEL DEL LADO DERECHO

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las medidas de L4 en el lado derecho entre los 3 grupos de estudio (Figura 52).

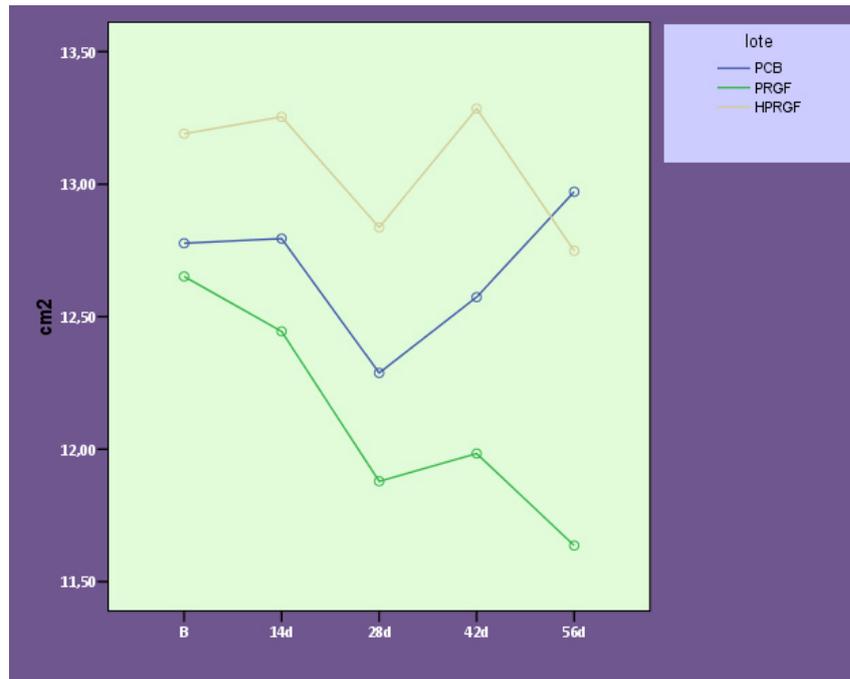
Figura 52: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel derecho entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L4 A NIVEL DEL LADO IZQUIERDO

En cuanto a los resultados de L4 a nivel del lado izquierdo, no hubo diferencias significativas entre los lotes estudiados (Figura 53).

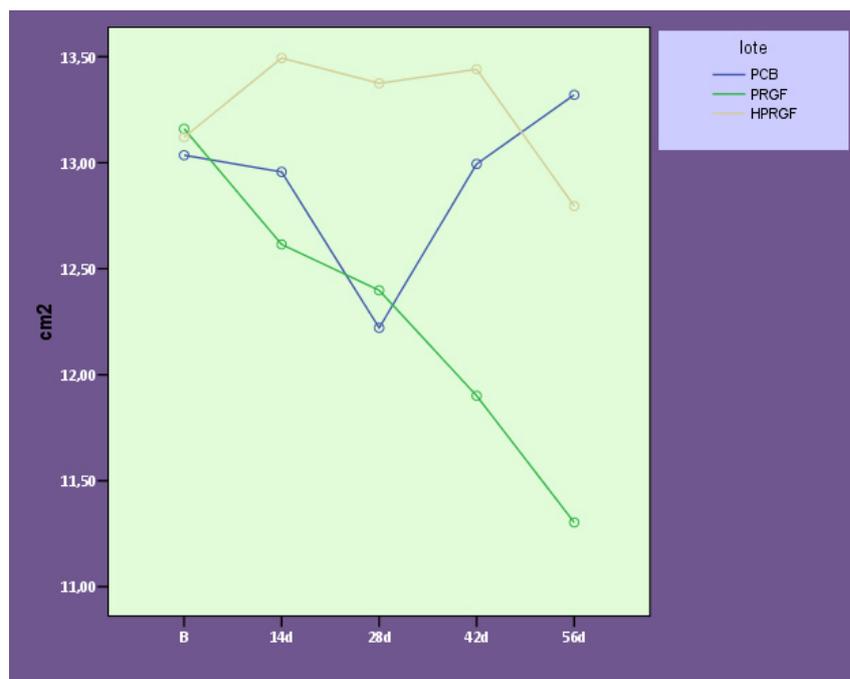
Figura 53: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L4 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L5 A NIVEL DEL LADO DERECHO

Entre los 3 grupos de estudio, no se observaron diferencias significativas entre el tamaño muscular en el lado derecho de L5 (Figura 54).

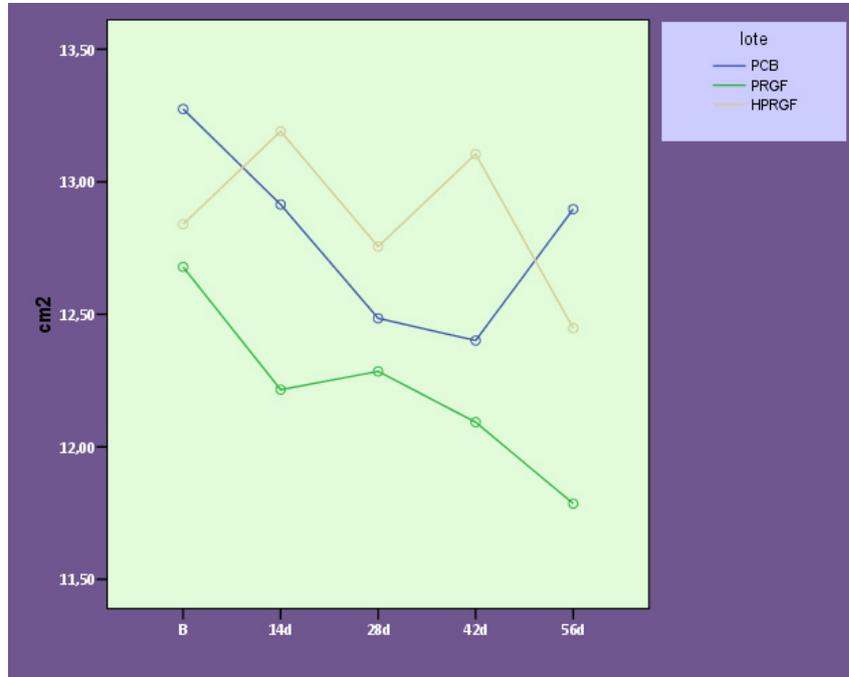
Figura 54: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel derecho entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L5 A NIVEL DEL LADO IZQUIERDO

En este nivel, no hubo diferencias significativas del tamaño muscular entre lotes (Figura 55).

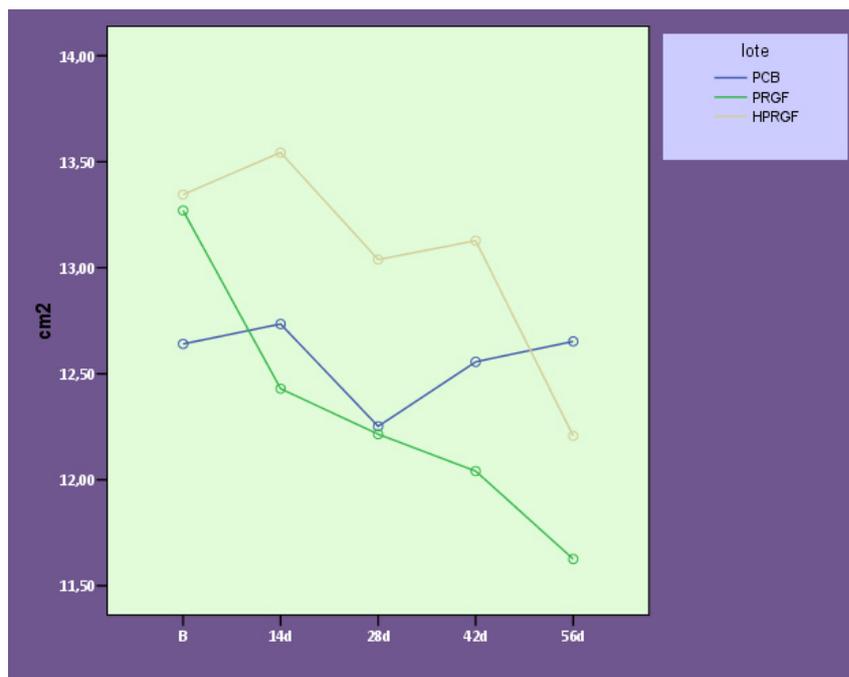
Figura 55: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L5 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L6 A NIVEL DEL LADO DERECHO

A nivel de L6 derecha no se observaron diferencias significativas entre grupos (Figura 56).

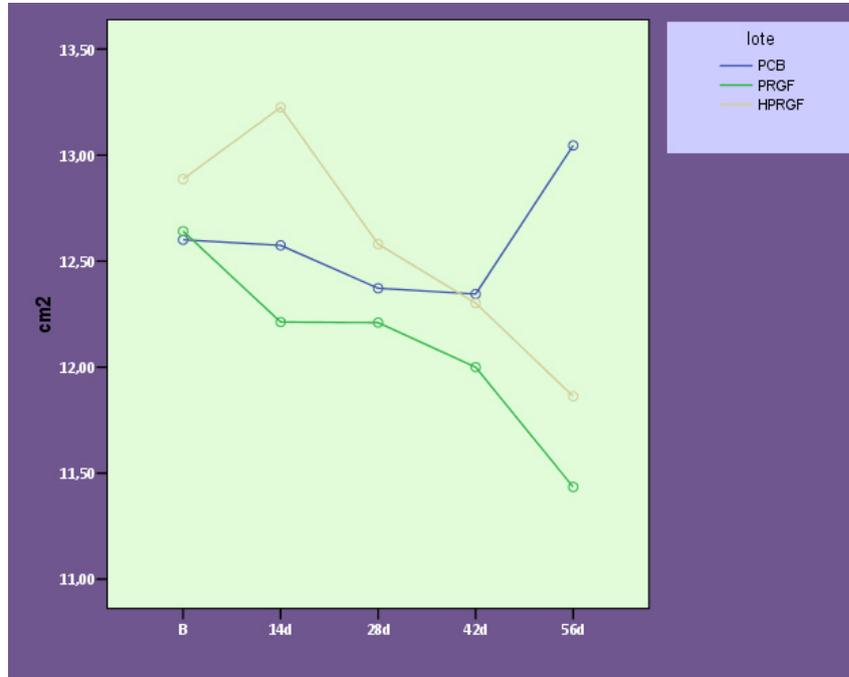
Figura 56: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel derecho entre los 3 lotes.



MEDIDAS DE L6 A NIVEL DEL LADO IZQUIERDO

Entre los 3 grupos de estudio no existieron diferencias significativas a este nivel muscular (Figura 57).

Figura 57: Comparación de la evolución en el tiempo de las medidas de L6 a nivel izquierdo entre los 3 lotes.



Discusión

Discusión

La finalidad de este trabajo ha sido estudiar la influencia de la inyección local en músculo sano de PRP sobre los niveles séricos de IGF-I en la especie canina y su relación con la CRP en el tiempo, así como los factores que pueden influir en los niveles de ambas. Para ello hemos comparado 3 grupos de estudio, formados por los mismos 8 animales, a los que se les inyectó 3 preparaciones distintas a nivel muscular.

Metodología de estudio

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 estudio, alterando de esta manera los resultados obtenidos (Peris 1997; Carrillo, 2002).

En la realización de esta tesis doctoral se han seguido las normas referentes a 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).

Asimismo, los animales eran estabulados de forma individual en una habitación controlada durante los días del estudio y desde 3 días anteriores al mismo para la aclimatación de los mismos. Tenían acceso *ad libitum* al agua y eran alimentados dos veces al día con 150 gr del mismo pienso comercial. Además se sacaban a pasear 3 veces al día, siempre por el mismo personal, con el fin de que se acostumbraran al manejo y facilitar así las manipulaciones necesarias.

En el campo de la experimentación animal, se han utilizado diferentes modelos animales, tanto de mamífero inferior (pequeños roedores y lagomorfos) (Carrillo, 2002; Cullinae *et al.*, 2002; Serra, 2006; Soler, 2006; Farrag *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2010; Bordei, 2011, etc), como de mamífero superior (canino, ovino, equino, etc) (Grageda *et al.*, 2005; Casati *et al.*, 2007; De Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Witte *et al.*, 2011; Choo *et al.*, 2011, etc). En nuestro trabajo el modelo animal elegido fue la especie canina, ya que nos permitió un fácil manejo, tanto en la estabulación como en el desarrollo de la parte experimental del estudio. Trabajos anteriores han demostrado que su utilización como modelo de estudio nos permite obtener un método estandarizable para su posterior empleo en trabajos experimentales sucesivos, siendo además extrapolable para su aplicación directa en medicina veterinaria (Vivo *et al.*, 2005; Gerard *et al.*, 2006; Peris, 2008; Sánchez, 2009).

Zona de estudio

En humana, la gran mayoría de la patología muscular es de origen traumático y está relacionada con la actividad deportiva. Alrededor del 30% de las lesiones en atletas afectan los músculos (Muñoz, 2002).

En humana, durante la práctica de la actividad física hay una gran incidencia de lesiones musculares. Generalmente el tratamiento conservador obtiene resultados funcionales aceptables, aunque las consecuencias de una actuación inadecuada o insuficiente pueden ser muy negativas, ya que retardan la vuelta del atleta a su actividad durante semanas o incluso meses. Por tanto, es importante la realización de una terapia adecuada, ya que la movilización precoz ofrece la ventaja de una rápida regeneración muscular, facilitando la formación de capilares y vasos de pequeño calibre así como de nuevas fibras musculares (Jiménez, 2006).

El empleo terapéutico de factores de crecimiento, proporciona una técnica avanzada y prometedora en el tratamiento de la lesión muscular. Considerando que en el músculo esquelético lesionado, la regeneración de las miofibrillas y la formación de la cicatriz fibrosa de tejido conectivo se producen de manera concomitante (Hurme *et al.*, 1991, Järvinen *et al.*, 1993, Kääriäinen *et al.*, 2000), el efecto estimulador dual de los factores de crecimiento podría conducir no sólo a la rápida regeneración muscular, sino también a la formación de abundante tejido cicatricial en el sitio de la lesión (Huard *et al.*, 2002).

La finalidad de nuestro estudio fue demostrar que la inyección intramuscular de PRGF no aumenta a nivel sistémico los niveles de IGF-I. La zona de inyección y por lo tanto de estudio en nuestro trabajo, fueron los músculos a nivel lumbar, concretamente el multífido lumbar, dorsal largo lumbar e ileocostal lumbar. Se escogió esta zona por: la facilidad de acceso a la misma en nuestro modelo de estudio, por la ausencia de venas y nervios mayores y por la ventaja en la comparación de la zona contralateral a través del estudio por imagen (Popesko, 1998).

La mayoría de estudios sobre la musculatura en el perro analizan técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para el análisis de la composición fibrilar de los mismos. Estos se han llevado a cabo en músculos apendiculares y del tronco (Braund *et al.*, 1978; Snow *et al.*, 1982; Gil, 1986; Diz, 1987; Gil *et al.*, 1987 a y b; Latorre, 1990; Latorre *et al.*, 1993 a, b y c; Smerdu *et al.*, 2005; Acevedo y Rivero, 2006; Strbenc *et al.*, 2006; Maccatrozzo *et al.*, 2007; Toniolo *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2010). En este sentido, nuestro estudio comienza una nueva línea de investigación en la especie canina de la cual podrán salir otros proyectos.

Obtención y activación del PRGF en la especie canina

Existe gran diversidad de estudios que han sido capaces de identificar qué factores de crecimiento podemos encontrar en el PRP. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en plasma humano, aunque también se han realizado en diferentes animales de experimentación animal, como la rata y el ratón, el conejo, la especie porcina y canina (Marx *et al.*, 1998; Landesberg *et al.*, 2000; Anitua *et al.*, 2004; Fuerst *et al.*, 2004; Yazawa *et al.*, 2004; Van Den Dolder *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Peris, 2008).

En cuanto a la cuantificación de estos factores de crecimiento, se han detectado diferencias en la concentración de los mismos según el método de centrifugación y activación utilizado, pero todos coinciden en que debe existir una concentración significativamente mayor que la concentración plasmática (Zimmermann *et al.*, 2001; Appel *et al.*, 2002; Anitua 2007).

Como se ha descrito en la revisión bibliográfica existen 2 métodos de obtención de PRP, los métodos manuales (De Obarrio *et al.*, 2000; Aghaloo *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004; Ouyang Xiang-Ying y Qiao Ying, 2006; De Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2007; Casati *et al.*, 2007; Peris, 2008; Nagala *et al.*, 2010) y los kits comerciales (Grageda *et al.*, 2005; Weibrich *et al.*, 2005; Wehling *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007). Por otro lado, existen 2 protocolos de centrifugación referenciados, una única centrifugación (Anitua y Andía, 2000; DeObarrio *et al.*, 2000; Anitua, 2001; Camargo *et al.*, 2002; Sánchez, 2007; Peris, 2008) o centrifugación doble (Marx, 2001; Aghaloo *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2003; Kawase *et al.*, 2003; Marx y Garg, 2005; García *et al.*, 2005; Ouyang Xiang-ying y Qiao Jing, 2006; De Vasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Casati *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2010).

En nuestro proyecto la obtención del PRGF se llevó a cabo mediante un método manual, que consistió en la extracción de sangre de manera estéril y en una cantidad variable dependiendo del grupo de estudio. Estas muestras se depositaron en tubos de citrato sódico de cristal de 4,5 ml y se llevó a cabo una única centrifugación a 460g durante 8 minutos (Anitua *et al.*, 2004), con el objetivo de disminuir el tiempo de preparación y el riesgo de contaminación del concentrado, desde el momento de la toma de muestra hasta la aplicación terapéutica sobre el paciente. A pesar de que hay algunos autores que afirman que una única centrifugación no produce un verdadero concentrado terapéutico (Marx *et al.*, 1998; Marx, 2001). Centrifugada la muestra obtuvimos 2 fracciones diferentes de plasma, el Plasma Pobre en Factores de Crecimiento (PPGF) y el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) (Anitua *et al.*, 2007).

En concreto en la especie canina se han utilizado como métodos manuales, el de DeVasconcelos Gurgel *et al.* (2007), que consistía en una doble centrifugación (1ª a 200 g/10 minutos y 2ª a 200 g/15minutos), el estudio de Casati *et al.* (2007) que también utilizaba esta doble centrifugación y el de Peris (2008), en el cual el protocolo propuesto fue una única centrifugación (210 g/10 minutos); Peris comparó su protocolo propuesto con el descrito por los 2 autores anteriores y el de Anitua (2004) (460g 8 min), que es el utilizado en esta Tesis Doctoral, de manera que obtuvo mayor concentración de plaquetas (336% con respecto a la sangre periférica) con su protocolo propuesto, en comparación con los otros 2. Otro método reciente para la obtención de este concentrado autólogo de plaquetas en la especie canina, es el descrito por Silva *et al.* (2011), que obtuvieron una concentración de plaquetas alrededor de 1,5 veces (1,28) la concentración en sangre entera utilizando una centrifugación de 191 g/6 minutos. En cuanto a los Kits comerciales, Hauschild *et al.* (2005), resolvieron una luxación traumática de la articulación intertarsal en un perro con una artrodesis parcial. En este caso, utilizaron el kit de humana llamado Curasan AG (Kleinostheim, Germany), que resultó de fácil manejo y ofreció buenos

resultados en condiciones clínicas. Asimismo, Gerard et al. (2006), utilizaron el kit Harvest Smart PreP Processing unit (Plymouth, Mass) en un estudio en la especie canina, obteniendo una concentración plaquetaria de 388%, 344%, 386% y 334%, para animales de 1, 2, 3 y 4 meses respectivamente.

Por otro lado, en veterinaria se comercializa el Kit Quirúrgico de Plasma Rico en Plaquetas de Medivet[®], diseñado como un procedimiento muy práctico y efectivo que se realiza en menos de 1 hora, permitiendo a los veterinarios producir en la propia consulta una solución de PRP, para aplicación tópica. Este PRP es 100% biocompatible e inocuo.

El uso de dispositivos semiatomizados como el SmartPreP 2 system (Thoesen *et al.*, 2006) para concentrar plaquetas caninas son costo prohibitivos en la mayoría de los países del continente.

Es necesario recordar que lo más importante de un método para concentrar plaquetas es que además de concentrar altos números de las mismas permita obtener plaquetas vivas e inactivas (Marx 2004, Carmona *et al.*, 2011).

Para conseguir las ventajas que brinda el plasma rico en plaquetas, éste tiene que activarse, es decir, las plaquetas deben lisarse y/o liberar los gránulos citoplasmáticos, que son los que contienen los factores de crecimiento y los metabolitos activos (Soler, 2006). Para ello, en nuestro trabajo empleamos la adición de otra sustancia, como es el Cloruro Cálcico al 10% (CaCl₂), frente a los otros procesos de activación del PRGF, por:

- La adición de otras sustancias alternativas al CaCl₂ para la activación del PRGF, como la trombina bovina, ha sido utilizada por diversos autores (Hansen *et al.*, 1992; Whitman *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1998). Aunque actualmente su aplicación está contraindicada por el riesgo potencial de desarrollar coagulopatías (formación de anticuerpos antitrombina que induzcan la deficiencia del factor V de coagulación) (Anitua y Andía, 2000; Landesberg *et al.*, 2000; Anitua, 2001; Marx, 2001; Marx y Garg, 2005). Estas complicaciones no se detectan con el empleo de CaCl₂.
- La activación del PRGF requiere reemplazo del calcio y la iniciación de la cascada de coagulación sanguínea (García, 2008). La adición de CaCl₂ produce una activación inmediata de la fracción plasmática, lo que permite su uso a corto plazo en estudios clínicos y experimentales *in vivo* (Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004). Este punto es importante, ya que no es aconsejable almacenar este concentrado durante más de 8 horas, porque 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 y Garg,

2005; Omer Mei-Dan *et al.*, 2011). Por lo tanto la adición de CaCl_2 reduce el riesgo potencial de contaminación y desarrollo de infecciones debido a que no se demora la aplicación de PRGF.

- La activación del concentrado plasmático mediante la técnica de congelación-descongelación (Zimmermann *et al.*, 2001) se descartó por el tiempo que se requiere, impidiendo en muchas ocasiones su aplicación *in vivo* en los procedimientos clínicos, como es nuestro proyecto. A pesar de que la activación mediante este proceso, frente a la activación con CaCl_2 , obtiene valores superiores en la cantidad de FC (Landesberg *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001).
- En cuanto a la sonicación no se contempló, porque requiere de mayor infraestructura, a pesar de que reduce el tiempo de obtención del concentrado frente al método congelación-descongelación (Guillén *et al.*, 2005).

Por lo tanto, en cuanto al método de obtención y activación del PRGF utilizado en nuestro estudio, cabe destacar que fue un método seguro, rápido, fiable, que requiere de una mínima infraestructura y que minimizaba el riesgo de contaminación del concentrado.

En este trabajo, hemos utilizado la tecnología PRGF®-Endoret®, pionera en el desarrollo de protocolos específicos para la regeneración tisular y la primera técnica 100% autóloga del mercado. Optamos por este método por 2 motivos, sus ventajas (Anitua *et al.*, 2007): Biocompatible, versátil y seguro; Control en su activación y utilización; Protocolo sencillo: un solo centrifugado; Protocolo rápido: 8 minutos de centrifugación y 20 minutos de preparación; No contiene leucocitos, por tanto, evita su actividad proinflamatoria; Posee propiedades bacteriostáticas; Gran potencial terapéutico, sin efectos secundarios, reduce notablemente el tiempo de recuperación de fracturas, lesiones musculares, tendinosas e intervenciones quirúrgicas; Aplicable en numerosos campos de la medicina en los que se ha comprobado su alta eficacia en la regeneración de diferentes tejidos: hueso, piel, mucosa oral, tendones, ligamentos, músculos, cartílago, córnea. Abarcando así especialidades médicas tales como: cirugía oral y maxilofacial, ortopedia y medicina deportiva, dermatología, oftalmología, cirugía vascular, cirugía plástica y estética e incluso veterinaria. Por otro lado, al ser un método que se utiliza en atletas de élite en España, podíamos extrapolar nuestros resultados a medicina humana.

Aplicación del PRGF

Tras la activación del PRGF y según sea el tiempo y temperatura empleado podemos obtener desde un líquido para la infiltración hasta un compuesto sólido gelatinoso maleable, útil para

sellar o compactar (gel de plaquetas) (Anitua *et al.*, 2004; Birbe, 2006; Gosens, 2008). La aplicación de una u otra forma, depende del tejido en el que lo vayamos a aplicar y la accesibilidad al mismo (Filardo *et al.*, 2010).

En humana, ante una lesión muscular, se ha demostrado que una única inyección de este concentrado plaquetario disminuye el dolor y mejora la función más que el tratamiento mediante infiltración local de corticoides (Peerbooms *et al.*, 2010). Cuando se daña el músculo, el hematoma se produce rápidamente, su contenido no es sólo hemático, ya que contiene también los restos celulares consecuentes a la necrosis de miofibras. En teoría, sí se procede a la evacuación y aporta PRGF autólogo, podría disminuirse el riesgo de recidiva del hematoma, disminuir, por tanto, “fisiológicamente”, la fase inflamatoria y acelerar y mejorar el proceso regenerativo minimizando la fibrosis (Balius, 2005). Si bajo máximas condiciones asépticas y control ecográfico se practica en medio quirúrgico la evacuación del hematoma y, sin retirar la aguja, se practica la infiltración de un volumen de PRGF proporcionado al grado de la lesión (entre 4 a 8 ml) el beneficio esperable es la disminución de la sintomatología dolorosa y una mejora en la calidad y celeridad del proceso de curación comprobable ecográficamente (Orozco *et al.*, 2010).

En nuestro estudio, al ser la zona de infiltración los músculos situados a nivel lumbar, se decidió aplicar el PRGF en su forma líquida mediante inyección intramuscular. La infiltración líquida se realiza cuando no se puede aplicar el gel, por ejemplo, ante una lesión difusa, en lesiones articulares no quirúrgicas o en aplicaciones postquirúrgicas de las mismas, en roturas tendinosas y musculares (Molloy *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; Sampson y Gerhardt, 2008; Peerbooms *et al.*, 2009; Filardo *et al.*, 2010; Orozco *et al.*, 2010).

Por otro lado, la obtención del PRGF en forma de gel o coágulo es un método sencillo, ya que se produce tras el proceso de activación, de forma espontánea, al dejarlo unos minutos incubando a 37°C (Anitua *et al.*, 2004). En esta forma se puede aplicar, por ejemplo, en reparación intraquirúrgica de defectos óseos, lesiones de cartílago articular o como coadyuvante de otras sustancias como hueso esponjoso o diversas proteínas (Anitua *et al.*, 2004; Oyama *et al.*, 2004; Kovacs *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo la infiltración de PRGF se realizó una única vez en los 2 grupos de estudio (lote 2 y 3) en los que valoramos la inyección intramuscular del mismo a dosis clínicas y dosis supraclínicas. Diversos estudios en los que se aplica el PRGF a nivel intramuscular utilizan diferentes tiempos de infiltración, como el de Wright-Carpenter *et al.* (2004), en el cual se aplicaba este concentrado plasmático cada 2 días. El número de aplicaciones variará en función del tamaño de la lesión y de la sintomatología dolorosa que produzca. Habitualmente las roturas

pequeñas presentan una evolución favorable con una única aplicación de PRGF. Las roturas medianas o grandes pueden precisar dos o tres aplicaciones de PRGF con la frecuencia de una a la semana (Tarragó, 2007). En nuestro estudio no valoramos la posibilidad de repetir la inyección de PRGF, ya que evaluamos los efectos a nivel local y sistémico de una sola infiltración intramuscular a dosis normal (lote 2) y a dosis elevada (lote 3), sobre musculatura sana y la aplicación no tenía fines terapéuticos.

Estudio cualitativo del Plasma Rico en Factores de crecimiento

Concentración de plaquetas, leucocitos, valor hematocrito e IGF-I en sangre, PPGF y PRGF

Para estudiar los resultados obtenidos del PRGF según la metodología seguida en este estudio, se ha comparado la concentración de plaquetas, la presencia de leucocitos y el valor hematocrito, así como la concentración de IGF-I entre sangre entera, plasma rico en factores de crecimiento y plasma pobre en factores de crecimiento, en el día inicial de cada uno de los 3 grupos de estudio.

En cuanto a la concentración de plaquetas, en los 3 grupos de estudio (PCB, PRGF, HPRGF), observamos un aumento en el número de plaquetas entre la sangre, el PPGF y el PRGF. Presentando este último valores de 1,5-2 veces superiores a la concentración en sangre y PPGF. Nuestros resultados coinciden con los de Anitua (2004), que afirma que el PRGF es aquel que posee aproximadamente una concentración de plaquetas 1,5 veces la concentración en sangre entera. Asimismo, en la especie canina, Silva et al. (2011) también obtuvieron una concentración plaquetaria en el PRP de 1,3 veces la concentración en sangre entera. Por otro lado, algunos autores afirman que el PRP terapéutico es el que tiene un promedio de aproximadamente un 400% (4 veces) de aumento en el conteo plaquetario con respecto a la sangre entera (Marx, 2004). Así mismo, otros autores referencian valores superiores a 1000×10^3 o de 4 a 7 veces sobre su cuenta básicamente usual (200.000 plaquetas/ μ l), como valor mínimo para obtener resultados beneficiosos sobre los procesos de reparación/regeneración tisular (Marx et al., 1998; Marx, 2001; Weibrich et al., 2004; Marx y Garg, 2005; Gerard et al., 2006; DeVasconcelos Gurgel et al., 2007; Sampson et al., 2008; Peris, 2008).

Con respecto a la concentración de leucocitos en nuestro trabajo, existen diferencias estadísticamente significativas entre la sangre y el plasma rico y el plasma pobre en factores de crecimiento en los tres grupos del estudio. Estos resultados confirman la ausencia de glóbulos blancos tras la centrifugación de la sangre y la separación de los diferentes tipos de plasma. Resultados que coinciden con los de Anitua (2007), que defiende la ausencia de leucocitos en el

PRGF argumentando que alteran la función de algunos FC, interfieren en la acción antiinflamatoria y en la agregación plaquetaria. Asimismo, en el estudio de Peris (2008), donde comparó la obtención de PRP mediante 3 protocolos de centrifugación distintos, los valores absolutos de glóbulos blancos en el concentrado plasmático eran muy bajos, cercanos a 0 leucocitos/ μ l. En contraposición, otros autores, como el grupo de Harvest (PReP2) alegan que carece de importancia este detalle y además su PRP contiene algunos hematíes. Incluso hay autores que prefieren la inclusión de leucocitos para el tratamiento de las úlceras u otras cirugías, ya que consideran que tiene un efecto antimicrobiano y desinfectante (Trowbridge *et al.*, 2005; Bielecki *et al.*, 2007).

Los rendimientos que se obtienen al centrifugar la sangre para la obtención del PRGF son variables y depende, entre otros, del valor hematocrito del paciente. Si el paciente presenta un hematocrito bajo o si el hematocrito es elevado, los resultados pueden verse afectados; por ello, el volumen del anticoagulante citrato sódico debería ajustarse para contemplar la disminución del volumen plasmático (Woodhams *et al.*, 2001) (Tabla 75)

Tabla 75. Determinación del volumen de anticoagulante según hematocrito para una muestra de 5 ml (modificada de Woodhams *et al.*, 2001)

Hematocrito	Volumen anticoagulante	Volumen sangre
25-55%	0,5 ml	4,5 ml
20%	0,7 ml	4,3 ml
60%	0,4 ml	4,6 ml
70%	0,25 ml	4,75 ml
80%	0,2 ml	4,8 ml

Otra posibilidad es mantener constante el volumen de anticoagulante, por ejemplo, de 0,5 ml y variar el volumen de sangre añadida según el hematocrito. El volumen de sangre a añadir se calcularía según la siguiente fórmula: $60/(100-\text{hematocrito}) \times 4,5$.

En nuestro estudio, los valores de hematocrito en sangre entera y en los 3 grupos evaluados, oscilan entre 45-55%. Por lo que son valores dentro del rango normal en esta especie (37-55%) (Meyer y Harvey, 2000).

En el estudio de la IGF-I en sangre, PP y PR, no existen variaciones significativas en las concentraciones de este FC en las 3 muestras, de manera que, se mantienen los niveles de IGF-I tanto en el plasma rico como en el plasma pobre a unos niveles similares a los de la sangre. Lacoste *et al.* (2003), estudiaron la concentración de factores de crecimiento en sangre completa y en el preparado obtenido mediante el PCCS PRP system[®], observaron que los niveles en sangre y en el plasma eran muy similares. Zimmermann *et al.* (2001), señalan varios factores que influyen

en la medición de los factores de crecimiento finales: la expresión del CD62 que nos indica si ha habido activación plaquetaria, ya que si las plaquetas se activan antes del final de la centrifugación los factores de crecimiento pueden perderse en el plasma sobrenadante, la producción de lactosa y la contaminación por glóbulos blancos, puesto que los leucocitos contienen y producen factores de crecimiento. Hay que tener en cuenta que los factores de crecimiento totales son la suma de los obtenidos a partir de las plaquetas y los leucocitos (Weibrich *et al.*, 2002; Weibrich *et al.*, 2003). Marx (2004), también hace un estudio comparativo de los diversos métodos de obtención del PRP, afirmando que las concentraciones de los FC pueden variar según el método de obtención del preparado, pero que se mantienen en niveles similares a los obtenidos en sangre. Weibrich *et al.* (2005), que estudian distintos métodos de obtención del PRP, obtienen las siguientes diferencias en cuanto a la concentración de factores de crecimiento. La cantidad de TGF- β 1 en el PRP varía de 73,3 ng/ml (Anitua PRGF), y 95,02 ng/ml (Curasan) a 268,65 (bancos de sangre) y 289,5 (PCCS). También encuentra variaciones muy diversas en cuanto al PDGF-AB del PRP, 47,0 ng/ml (Anitua), 133,59 (banco sangre), 156,7 (PCCS) y 233,70 (Curasan). Peris (2008), en su estudio sobre la comparación de 3 protocolos distintos para la obtención de PRP, también observó diferencias en la concentración del TGF- β 1, siendo el protocolo propuesto en su trabajo (centrifugación a 210 g/10 minutos) donde mayores niveles de este FC había en comparación con otro protocolo (1ª centrifugación: 210 g/10 minutos y 2ª centrifugación: 210 g/ 5 minutos) (DeVasconcelos Gurgel *et al.*, 2007; Casati *et al.*, 2007). Aunque no encontraron diferencias en la concentración del TGF- β 1 entre el PRP y el PPP.

Por tanto, las concentraciones de los FC pueden variar según el método de obtención del PRP empleado (Marx, 2004; Weibrich *et al.*, 2005), pero se mantienen en niveles similares a los obtenidos en sangre (Lacoste *et al.*, 2003; Marx, 2004). Además, existe elevada variabilidad entre individuos de una misma especie, con respecto a la concentración de los FCs (Okuda *et al.*, 2003; Weibrich *et al.*, 2005; Casati *et al.*, 2007).

IGF-I

En este trabajo, hemos evaluado la inyección local en músculo sano de PRGF sobre los niveles séricos de IGF-I en la especie canina, para valorar la supuesta hipertrofia muscular, por la que en Enero de 2010 la Asociación Mundial Anti Doping (WADA) prohibió el uso de preparaciones derivadas de plaquetas en inyección intramuscular, principalmente por la presencia de IGF-I.

Para testar el efecto de la aplicación intramuscular de PRGF, hemos valorado la concentración sérica de IGF-I en diferentes tiempos (Basal, 1', 15', 30', 60', 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días) tras la inyección intramuscular de SSF, PRGF o HPRGF, según grupo.

En el estudio comparativo de la concentración de este factor de crecimiento insulínico en los diferentes tiempos no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos. Es decir, que la concentración de IGF-I se mantuvo en valores similares a lo largo de los 56 días de estudio.

La vida media de IGF-I libre es de escasos minutos, mientras que la vida media del complejo IGF-I/IGFBP-3 es de 12-15 horas (Guler *et al.*, 1989; Rigamonti *et al.*, 2009). Cuando se administra IGF-I como factor extrínseco vía subcutánea, la máxima concentración se alcanza a las 7 horas, presentando una vida media de unas 20 horas (Grahnen *et al.*, 1993). Nosotros observamos, en cuanto al lote 1, que el valor medio de IGF-I a las 6h postinyección era de 144 ng/ml y a las 24h de 137 ng/ml y en lote 2 y 3, los valores medios a las 6h eran de 109 ng/ml y 96 ng/ml y a las 24h postinyección de 75 ng/ml y 68 ng/ml, respectivamente; por lo que el valor de este FC a las 6h es mayor que los obtenidos a las 24h en nuestro trabajo, tal y como describe la bibliografía tras su administración subcutánea (Grahnen *et al.*, 1993).

Así mismo, en la comparación de los niveles de IGF-I entre los 3 grupos de estudio observamos que, los valores medios de este FC son mayores en el lote PCB. Esta discrepancia de valores podemos justificarla, ya que el peso medio de los animales en el grupo PCB fue de 17 kg, mientras que, en los grupos PRGF y HPRGGF su peso medio era de 15 kg. En medicina veterinaria, los valores de IGF-I están sometidos a variaciones raciales con una correlación positiva entre el peso y la concentración plasmática de IGF-I (Favier *et al.*, 2001), tal y como hemos podido comprobar en nuestro trabajo. Estudios previos han evaluado las concentraciones de IGF-I en animales jóvenes de diferentes razas, concluyendo que, perros de raza Caniche y Gran Danés, con edades comprendidas entre las 7 y 27 semanas, poseen niveles de IGF-I en plasma similares (Nap *et al.*, 1993); los niveles de IGF-I están correlacionados con el tamaño corporal (Favier *et al.*, 2001). En nuestro estudio los animales tienen un peso que oscila entre los 10 y 24 kg. Los pacientes se pesaban cada día antes de la extracción sanguínea, es decir, en el día 1, a las 24 horas (día 2), a los 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días, observándose variaciones a lo largo del estudio en los 3 grupos. Por lo tanto los animales del grupo PCB tienen mayores niveles de IGF-I por el mayor peso de los mismos durante la realización de esta fase del proyecto. Se han registrado altas concentraciones de IGF-I en perros obesos y la vuelta a niveles normales tras la pérdida de peso (Blanchard *et al.*, 2004). Además, en el estudio de Olazabal y San Martín (2008), concluyeron que, animales con restricción de la alimentación, bien debido a dietas de baja densidad de nutrientes o por reducción del alimento, cuando vuelven a una realimentación aumenta la producción local de IGF-I. Esto se debe a que durante la restricción nutricional el número de receptores de hormona del crecimiento (GH) en el hígado disminuye, resultando en una menor sensibilidad a ésta y esto está seguido por una reducción de la secreción de IGF-I en el hígado. Así, se establecen en animales

restringidos de alimento, bajos niveles circulantes de IGF-I (Hornick *et al.*, 2000). Por otro lado, nuestros resultados coinciden con el estudio de Greer *et al.* (2010) cuando comparaban los cambios en las concentraciones de IGF-I en función del peso en perros, fueron los animales de mayor peso los que presentaron mayores valores de IGF-I.

En humana, en un estudio realizado por Nidl *et al.* (2007), comprobaron que soldados sometidos a un entrenamiento de 9 semanas, con la consiguiente ganancia de masa muscular, tenían aumento de las concentraciones de IGF-I al final del periodo, por lo tanto, el aumento de la masa muscular se plasmaba en un aumento de las concentraciones de IGF-I. En contraposición, no se encontró una relación significativa entre los niveles séricos de IGF-I y el índice de masa muscular en el estudio de Coronado *et al.* (2005). Esto puede deberse a la existencia de distintas isoformas de IGF-I (Yang *et al.*, 1996; Payette *et al.*, 2003): la forma hepática glucosilada, que es el principal componente sérico cuantificado, y algunas formas locales como las expresadas por el sistema músculoesquelético en respuesta a la actividad física o factor de crecimiento mecánico y un proveedor de la forma madura de IGF-I en el músculo o IGF-IEa (Goldspink, 2004; Goldspink y Harridge, 2004). En nuestro estudio, no hubo diferencias significativas en los valores de IGF-I entre grupos tras la inyección intramuscular de SSF/PRGF/HPRGF, observando mayores valores en el grupo PCB.

Los IGF están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción (Hill *et al.*, 1995; Papanicolau *et al.*, 1998), al igual que la testosterona (Pennisi y Jasper, 1985; Lambert *et al.*, 2007). Se sabe que en humana, las mujeres, secretan 2 veces más GH por cada pulso que los hombres. Este hecho repercute en las concentraciones circulantes de IGF-I (Giustina y Veldhuis, 1998; Veldhuis *et al.*, 2005). En este estudio hemos observado valores menores de IGF-I en las hembras que en los machos, resultados que coinciden con el estudio de Greer *et al.* (2010), donde fueron las hembras adultas no castradas las que presentaron menores niveles de IGF-I, esto supone un punto de controversia, ya que éstas han estado expuestas a progesteronemia durante los ciclos estrales transcurridos a lo largo de su vida y esta hormona estimula la producción de la hormona de crecimiento (GH) y por consiguiente el de IGF-I (Corrada y Gobello, 2001). Por otro lado, Waters *et al.* (2009) no encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de IGF-I entre perras esterilizadas y hembras no esterilizadas de 4 años de edad.

En nuestro estudio, sólo uno de los machos estaba castrado, por lo que los 3 restantes presentan niveles de andrógenos, de ahí que en nuestros resultados sean los machos los que mayores niveles de IGF-I presentan. Cabe destacar que otra causa por la que los machos podrían tener mayores niveles de IGF-I es el mayor peso que presentan, sobretudo en el grupo PCB. En

cuanto a las hembras, dos de ellas estaban esterilizadas y dos enteras, y no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de IGF-I entre ellas.

En cuanto a la influencia de la edad, a excepción del grupo PCB, que presentó mayores niveles de IGF-I por el mayor peso, podemos afirmar que son los animales de edad avanzada los que poseen menores concentraciones de IGF-I. Estudios en humana sugieren que, a mayor edad menores niveles de IGF-I (Tovar *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2005). Favier *et al.* (2001), afirman que las concentraciones de IGF-I eran mayores en cachorros de raza Beagle que en adulto, ya que en estos últimos disminuye la liberación pulsátil de GH. Al mismo tiempo Greer *et al.* (2010) demostraron una disminución en los niveles de IGF-I en los perros de edad avanzada.

Elevadas concentraciones de IGF-I están asociadas a resultados positivos en la salud, por ejemplo, buen estado físico, óptima densidad ósea y neurocognición (Adams, 2002; Nindl *et al.*, 2007). En estudios con animales se ha demostrado que el IGF-I mejora la cicatrización de lesiones musculares (Menetry *et al.*, 2000). El IGF-I parece ser un estímulo necesario para la diferenciación y proliferación mioblástica (Engert 1996, Damon 1998).

Hemos podido concluir con el estudio realizado con nuestros pacientes, que IGF-I no aumenta a nivel sistémico tras la inyección local del PRGF, es más, cuando los perros eran sometidos al tratamiento con PRGF (lote 2) o HPRGF (lote 3) los niveles de IGF-I obtenidos eran menores que en el lote 1 (PCB); cabe destacar que la concentración de IGF-I es mayor a las 6h que a las 24h postinfiltración de PRGF, pero sus valores se mantienen a partir de ese momento, que es lo esperado cuando se inyecta IGF-I subcutáneo. Hay una clara relación entre la corpulencia de los animales y los niveles séricos de IGF-I; además en machos, por su mayor peso, las concentraciones de IGF-I son mayores y por otro lado, son los animales de edad avanzada los que presentan menores niveles de este FC.

De manera que, si los niveles sistémicos de IGF-I se mantienen tras la aplicación local de PRGF, los deportistas podrían seguir beneficiándose de las ventajas de estas terapias, con el consiguiente beneficio económico y temporal.

CRP

La CRP es una proteína de fase aguda (PFA) positiva, es decir, se encuentra en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos, aumentando su concentración en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos (Martínez-Subiela *et al.*, 2004).

Existen diversos procesos no considerados infecciosos o patológicos, como es una cirugía, que van a provocar un aumento de las PFA. El incremento de la CRP es mayor cuanto más grave es la

lesión tisular producida en músculo (Conner *et al.*, 1988). Otros procedimientos donde se ha visto un aumento marcado de esta PFA son cirugía ortopédica, ovariectomía, extracción dentaria y escisión de tumores (Yamamoto *et al.*, 1993). Siendo la cirugía ortopédica donde se produce la mayor elevación de la concentración (8 veces superior a los niveles basales).

Para valorar el efecto de la inyección local de PRGF en nuestro trabajo, hemos valorado la concentración sérica de CRP en diferentes tiempos (Basal, 1', 15', 30', 60', 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días) tras la inyección intramuscular de SSF, PRGF o HPRGF, según grupo.

Los niveles normales de CRP en suero de perros sanos son <5 g/L (Caspi *et al.*, 1987). En nuestro trabajo, los valores de CRP obtenidos fueron, en el grupo PCB el valor medio de esta proteína de 10,6 µg/ml, en el lote PRGF de 15,3 µg/ml y en el grupo HPRGF de 7,5 µg/ml. Los resultados del lote 1 (PCB) se aproximan a otro rango de referencia descrito, el de 0-1 mg/dl (Onishi *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2008). En cuanto al lote 3 (HPRGF), los niveles coinciden con otros autores (Yamashita *et al.*, 1994; López *et al.*, 1998; Martínez-Subiela *et al.*, 2004; Goldsack, 2005), quienes describen valores de hasta 7 mg/L en animales sanos. Valores entre 2,2-4,4 mg/L detectaron en un estudio en hembras caninas sanas (Crossley *et al.*, 2010).

En el estudio comparativo de la concentración de esta proteína de fase aguda en los diferentes tiempos no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos. Es decir, que la concentración de CRP se mantuvo en valores similares a lo largo de los 56 días de estudio.

En cuanto a la comparación entre lotes de estudio de la concentración de CRP, observamos que en los grupos PRGF y HPRGF el valor máximo aunque sin diferencias significativas, se alcanzó a los 7 días de la fase experimental, este hallazgo lo justificamos por una dermatitis en la zona del cuello por autolesión de los animales, como consecuencia a la colocación y mantenimiento del catéter central. Para demostrar nuestra hipótesis realizamos un miniensayo con 3 animales, sin catéter central a los que se les tomaron los valores a los 7 días de la inyección, donde no se apreció dicha subida. Resultados que coinciden con Martínez-Subiela *et al.* (2004), que afirman que la CRP está en niveles no detectables o muy bajos en animales sanos, aumentando su concentración en respuesta a procesos inflamatorios o infecciosos. Por otro lado, según Cerón *et al.* (2005), las inflamaciones crónicas generan un menor incremento de PFAs que episodios agudos de inflamación e infección, como es nuestro caso. Se han realizado estudios de esta proteína en hembras de la especie canina con presencia de tumores mamarios, observándose un incremento de la misma como consecuencia a una respuesta sistémica a la inflamación asociada con cambios neoplásicos malignos tempranos (Lithgow y Covington, 2005; Crossley *et al.*, 2010). Asimismo, en estudios en perros con poliartritis idiopática se ha concluido que, la valoración de

los niveles séricos de CRP es útil para valorar la eficiencia de la terapia con corticosteroides, ya que observaron que los animales con esta patología presentaban niveles marcadamente altos de CRP (>1mg/dl) (Onishi *et al.*, 2000), normalizándose a niveles normales después del inicio del tratamiento (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2006; Ohno *et al.*, 2007). Asimismo la inyección de aceite de trementina en perros provoca un incremento de la concentración de CRP en el suero, llegando a un pico a los 2 días después de la inoculación (Hayasi *et al.*, 2001). Por otro lado, en otras especies, se ha observado que, en procesos inflamatorios experimentales mediante la administración intramuscular de aceite de turpentina en équidos las concentraciones de CRP se incrementaban a las 24 horas del estímulo y alcanzaban valores 3-6 veces superiores a los basales a los 3-5 días, estabilizándose a los 14 días (Yamashita *et al.*, 1992). En nuestro estudio, los niveles de CRP se han mantenido estables durante las 8 semanas de estudio en cada uno de los grupos de manera que no ha existido ninguna respuesta inflamatoria como consecuencia de la administración del tratamiento a estudiar.

Se ha demostrado que los niveles de CRP en la especie canina están elevados en condiciones inflamatorias (Nakamura *et al.*, 2008) y esta elevación también se ha registrado en enfermedades infecciosas como la leptospirosis, babesiosis y parvovirus (Ceron *et al.*, 2005); trauma quirúrgico (Conner y Eckersall, 1988); tumores malignos como linfoma y hemangiosarcoma (Tecles *et al.*, 2005; Mischke *et al.*, 2006); piometra (Fransson *et al.*, 2004); pancreatitis aguda (Holm *et al.*, 2004); anemia hemolítica inmunomediada, artritis y glomerulonefritis (Onishi *et al.*, 2000).

En cuanto a la influencia de factores como el peso, el sexo y la edad en los niveles séricos de esta PFA, nuestros resultados fueron: dentro de cada grupo de estudio, eran los animales de mayor peso los que presentaban menores niveles de CRP, al igual que el estudio de Veiga *et al.* (2008), donde los perros obesos mostraron menores concentraciones de esta PFA; siendo estos resultados contrarios a los obtenidos en humana, donde la obesidad está asociada a un aumento de las concentraciones de CRP, presumiblemente porque el tejido adiposo es un lugar idóneo para la producción de Interleuquina-6 (IL-6), importante regulador de la expresión génica de esta PFA (Mohamed-Ali *et al.*, 1997; Das 2001). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la influencia del sexo sobre los niveles séricos de CRP, al igual que en humana donde se ha detectado que no presenta diferencias por sexos ni sus valores se ven afectados por otras condiciones como anemia, policitemia o morfología eritrocitaria (Clyne y Olshaker, 1999). A su vez, comprobamos que los animales más jóvenes tuvieron menores concentraciones de CRP. Esta circunstancia, podría deberse a que en animales sanos los niveles de CRP o no se detectan o son mínimos (Caspi *et al.*, 1987), aumentando su concentración en patologías como la poliartritis, característica de animales de edad avanzada (Ohno *et al.*, 2007). En humana, se ha demostrado

que existe una relación directamente proporcional entre los valores de CRP y la edad, de forma que en el estudio de Prieto et al. (2008) los pacientes con una CRP > 10 mg/dl tenían un promedio de edad mayor, esto es debido a que las personas mayores tienen una Respuesta de Fase Aguda (RFA) alterada con un incremento más rápido de las concentraciones de CRP que los jóvenes (Sierra et al., 2004). Esto probablemente esté influido por condiciones previas, como enfermedad coronaria, hipertensión arterial, osteoartritis, insuficiencia renal, etc., que hacen que las concentraciones basales de CRP sean ligeramente mayores que las de los más jóvenes (Clyne y Olshaker, 1999). En otras especies, como el caballo, la edad es un factor a tener en cuenta en la interpretación de esta proteína. Así, en potros recién nacidos las concentraciones de CRP permanecen en el límite de detección (1 µg/ml) y comienzan a detectarse en suero a los 3 días, debido fundamentalmente a la ingestión de calostro y a la exposición del neonato a estímulos externos (trauma, microorganismos, etc.). Esta proteína aumenta hasta el año de edad y alcanza su valor máximo (14,1 µg/ml). Desde los 18 meses hasta los 4 años de edad los niveles descienden gradualmente (5,4 µg/ml). A partir de los 5 años, las concentraciones medias se mantienen estables dentro del intervalo fisiológico de referencia de esta especie, con valores comprendidos entre 7 y 8 µg/ml (Yamashita et al., 1991).

Correlación existente entre IGF-I y CRP

La CRP aumenta sus niveles en presencia de procesos inflamatorios (Martínez-Subiela et al., 2004; Ceron et al., 2005; Lithgow y Covington, 2005; Icol et al., 2005; Kjelgaard-Hansen et al., 2006; Yilmaz et al., 2006; Ohno et al., 2007; Nakamura et al., 2008; Crossley et al., 2010), mientras que durante la inflamación disminuyen los niveles séricos de IGF-I, a pesar del aumento de la concentración de GH. La disminución de la concentración de IGF-I después de un estímulo inflamatorio-infeccioso, se ha registrado en especies como las ratas, el ratón, el cerdo y los novillos (Frost y Lang, 2004). Este hecho está causado por el efecto inhibitorio de citoquinas proinflamatorias en la expresión hepática de IGF-I (Colson et al., 2003). Así, mientras los niveles séricos de IGF-I aumentan, las concentraciones de CRP disminuyen. Recientemente, se ha demostrado en perros una correlación negativa entre ambas proteínas, siendo considerada IGF-I como una PFA negativa (Tvarijonaviciute et al., 2011). Uno de los objetivos de esta tesis doctoral era evaluar la relación existente entre ambas proteínas, de manera que una vez estudiados los resultados hemos podido comprobar la relación inversa entre ambas proteínas, coincidiendo con el estudio realizado por Tvarijonaviciute y colaboradores (2011). Al encontrarse esta correlación, cuando los animales poseían mayor peso las concentraciones de IGF-I aumentaban mientras que

las de CRP disminuían y fueron los animales de edad avanzada los que presentaron menores niveles de IGF-I, mientras que los animales jóvenes tuvieron una menor concentración de CRP.

Estudio por imagen

El objetivo de nuestro estudio era demostrar que la concentración sérica de IGF-I no aumenta tras la inyección intramuscular de PRGF. Ya que se ha supuesto que IGF-I tiene un efecto anabolizante a nivel muscular (Creaney y Hamilton, 2008), con el consiguiente incremento de la masa muscular. Para evaluar ese posible incremento en el tamaño de las fibras musculares como consecuencia de la infiltración del PRGF llevamos a cabo el estudio por imagen de los músculos infiltrados, comprobando el efecto local de la infiltración y el efecto sistémico de la misma comparándola con la musculatura contralateral (derecha e izquierda). Este estudio se realizó mediante imágenes tomadas por ecografía y tomografía axial computerizada en la musculatura lumbar. Como ya hemos citado en materiales y métodos, se obtuvieron imágenes de la musculatura lumbar (de medial a lateral: multifido lumbar, dorsal largo lumbar e ileocostal lumbar) a nivel de L5, entre L4-L5 (L4) y entre L5-L6 (L6) semanalmente en las ecografías y quincenalmente en el caso de las TC.

En medicina humana, la cuantificación del grado de musculatura tiene interés por su relación con aspectos de la salud como, el estado nutricional (Nair, 1995; Koch, 1998), la independencia funcional (Izquierdo, 1998), la inmunocompetencia (Mariani *et al.*, 1999) y el desarrollo biológico (Roche *et al.*, 1996).

En veterinaria, no existen en la bibliografía estudios que valoren el tamaño muscular tras la infiltración de PRGF, abriendo nuestro trabajo una nueva perspectiva para la realización de sucesivos estudios. En humana, en el estudio de Fernández *et al.* (2000) valoraron las áreas musculares del muslo y la pierna en varones adultos, mediante un método antropométrico y TC, siendo esta última técnica más exacta para la medición del área muscular. En la comparación de las medidas musculares, tanto las obtenidas por ecografía como por TC, entre cada lado valorado (derecho e izquierdo/infiltrado-no infiltrado), en los diferentes niveles (L4, L5, L6) de estudio de la musculatura y dentro de cada grupo de estudio (PCB, PRGF, HPRGF), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es decir, que el tamaño muscular fue similar en ambos lados, tras la inyección intramuscular de SSF/PRGF/HPRGF. Por lo tanto, la infiltración de este concentrado plaquetario no produce un efecto anabólico en el lado infiltrado. Y como todas las medidas se mantuvieron sin modificaciones en cuanto al área muscular a lo largo del tiempo se ha descartado un efecto positivo sobre el aumento de la misma como consecuencia a la administración de PRGF incluso a dosis elevadas del mismo.

La prohibición para las inyecciones intramusculares de PRP se ha eliminado de la lista de prohibiciones de la WADA de 2011, ya que las formulaciones de PRP no aumentan el crecimiento muscular, por lo tanto, su utilización con fines terapéuticos no viola el espíritu del deporte (Omer *et al.*, 2011).

Conclusiones

Conclusiones

De los resultados obtenidos en nuestro estudio y bajo las condiciones establecidas en nuestro trabajo, podemos deducir las siguientes conclusiones:

1. El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) obtenido por la metodología descrita en este estudio ha demostrado obtener unas características similares a las descritas por Anitua (2004) para humana, por lo que su uso puede ser validado para la especie canina.
2. La aplicación local de PRGF en músculo sano no se ve reflejado con 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.
3. Las concentraciones plasmáticas de IGF-I están influenciadas por factores como el sexo, la edad y el peso del paciente, siendo este último factor el que más influye en las concentraciones séricas de la IGF-I, viéndose incrementadas con su aumento.

4. La inyección local de PRGF en músculo sano no produce inflamación, por lo que no interfiere en la utilización clínica de la Proteína de Fase Aguda positiva C-reactiva (CRP) como método diagnóstico y de evolución de las patologías.
5. Los niveles séricos de CRP están influenciados por factores como el peso y la edad, de forma que, cuanto más joven es el animal menores niveles presenta y su concentración disminuye con el aumento de peso.
6. Dada la correlación negativa entre ambas proteínas, IGF-I y CRP, se puede considerar la IGF-I como una PFA negativa, lo que permite plantear su medición clínica como opción diagnóstica y de evolución de patologías musculares.
7. Los estudios de volumen muscular realizados mediante ecografía y TC confirman la ausencia de efecto anabolizante local y/o sistémico de la infiltración de PRGF, siendo una razón más para rechazar estos tratamientos como sustancias dopantes.

Resumen Extendido

Resumen Extendido

En Enero de 2010 la Asociación Mundial Anti Doping (WADA) prohibió el uso de preparaciones derivadas de plaquetas en inyección intramuscular, principalmente por la presencia del Factor de Crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), del que se ha supuesto un efecto anabolizante, pudiendo ejercer un efecto beneficioso y ventajista en el rendimiento muscular del atleta tratado (Creaney y Hamilton, 2008).

En esta Tesis Doctoral hemos evaluado la inyección local en músculo sano de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre los niveles séricos de IGF-I en la especie canina y su relación con la proteína C-reactiva (CRP) en el tiempo, así como los factores que pueden influir en los niveles de ambas y los posibles efectos anabolizantes sobre el músculo infiltrado. Para ello hemos comparado 3 grupos de estudio, formados por los mismos 8 animales sanos, a los que se les

inyectó a nivel muscular lumbar izquierdo, concretamente en los músculos multífido, dorsal largo e iliocostal, 3 preparaciones distintas:

- Lote 1: **PCB**: 8 animales a los que se inyectó, en músculo sano, solución salina (1ml) más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,05 ml).
- Lote 2: **PRGF**: 8 animales a los que se les inyectó una dosis normal (1 ml) de PRGF más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,05ml).
- Lote 3: **HPRGF**: 8 animales a los que inyectamos una dosis exagerada de PRGF (3 ml) más un 5% de Cloruro Cálculo al 10% (0,15 ml).

Los animales incluidos en este proyecto eran perros de raza Beagle procedentes del Núcleo Zoológico Docente e Investigador de la Universidad CEU Cardenal Herrera. La fase experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de esta Universidad, donde los animales eran estabulados de manera individual desde 3 días antes del estudio.

Veinticuatro horas antes de empezar con la obtención de sangre e infiltración de cada uno de los grupos de estudio, y tras un periodo de ayuno sólido de 12 horas y líquido de 2 horas, procedimos a la sedación de los animales con medetomidina, morfina y midazolam a las dosis de 0,01 mg /kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg, respectivamente y vía intramuscular, para la colocación de un catéter central en la vena yugular izquierda en condiciones estrictas de asepsia. Este se mantuvo hasta el día 3 del procedimiento, con el fin de obtener las primeras muestras sanguíneas con el menor trauma posible. A partir del día 7, la recolección de sangre se realizó mediante venopunción yugular, alternando ambas venas yugulares en las diferentes semanas.

Para obtener el PRGF necesario para la inoculación y para el estudio de la calidad del mismo, se extrajo sangre en tubos de citrato sódico de cristal de 4,5 ml y se centrifugaron a 460g durante 8 minutos (Anitua *et al.*, 2004). Una vez preparado el PRGF se almacenó a -20° C una muestra de PP (plasma pobre) y otra de PR (plasma rico) para su posterior estudio en el laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

Para la inyección del producto elegido según el grupo de estudio (SSF/PRGF/HPRGF), se preparó la zona de infiltración de manera aséptica mediante rasurado y desinfección, se mantuvo al animal de pie sobre la mesa de exploración y se inoculó a nivel de la musculatura lumbar (de medial a lateral: **multífido lumbar, dorsal largo lumbar e iliocostal lumbar**) en el lado izquierdo.

La obtención de las muestras para el estudio de los niveles de IGF-I y CRP mediante la extracción sanguínea a los pacientes se realizó en los tiempos: Basal (justo antes de la extracción de la sangre para la preparación del PRGF), y en los siguientes tiempos postinyección del

SSF/PRGF/HPRGF en el músculo sano: 1', 15', 30', 60', 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días. Para ello se emplearon tubos sin anticoagulante de 5 ml y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos (Crossley *et al.*, 2010). Se procedió a la conservación de las muestras en congelación a -20°C en tubos eppendorf y posteriormente se envió al laboratorio.

Para valorar las dimensiones de la musculatura y la respuesta a la infiltración del PRGF se realizaron estudios ecográficos y por tomografía axial computerizada (TC).

Las ecografías se realizaron en cada lote experimental y en los tiempos siguientes: basal (antes de la inyección del SSF/PRGF/HPRGF), 1 minuto, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días tras la inoculación del SSF o preparado rico en plaquetas y después de la obtención de las muestras sanguíneas. En cada uno de los estudios se tomaron 3 imágenes de la musculatura lumbar a nivel medio de L5, entre L4-L5 (L4) y entre L5-L6 (L6), tanto del lado derecho como del izquierdo. Seguidamente y con el fin de obtener una medida del área muscular lo más precisa posible, se procedió al cálculo de la media aritmética de las 3 medidas de cada nivel.

Las TC se llevaron a cabo bajo sedación (medetomidina, morfina y midazolam vía intramuscular a dosis de 0,01 mg /kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente). Se realizaron en basal, a los 14, 28, 42 y 56 días postinfiltración. Las imágenes realizadas fueron, a nivel del espacio articular L4-L5, entre L5 y L6 y en el punto medio entre ellas, obteniendo los valores de ambos lados de una misma imagen.

Para realizar el procesamiento de todas las imágenes obtenidas tanto por ecografía como por TC se empleó el programa informático Image Pro Plus®. Se obtuvieron los resultados de las áreas musculares en píxeles, y posteriormente se convirtieron a cm² según la escala de cada una de las imágenes.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático SPSS 15.0® para Windows. Se presentan como la media \pm error estándar o frecuencias y porcentajes, según las variables. Los resultados de las variables numéricas de cada parámetro se evaluaron con un test no paramétrico de Kolgomorov-Smirnov para comprobar su normalidad. Cuando no eran normales se realizó una transformación logarítmica.

Los resultados de los 3 lotes de estudio se dividieron en diferentes apartados:

- Estudio descriptivo de los pacientes (edad, peso, estado analítico).
- Estudio del PRGF: descriptivo y comparativo entre la sangre entera, el plasma pobre (PP) y el plasma rico (PR).

- Estudio descriptivo y comparativo de IGF-I y CRP. Evaluación de los factores que influyen en las concentraciones de las mismas.
- Estudio de la correlación existente entre IGF-I y CRP.
- Estudio descriptivo y comparativo de las medidas obtenidas mediante las imágenes ecográficas y la TC.

El rango de la edad y el peso de los animales fue de 36-120 meses y de 10 a 24 kg, respectivamente. En cuanto al peso, existen diferencias entre grupo placebo y los otros dos. Se aprecia que el peso de los animales se ha modificado ligeramente a lo largo de los meses del estudio, teniendo los animales mayor peso en el grupo PCB.

En el análisis de las muestras de plasma rico en factores de crecimiento y plasma pobre en factores de crecimiento y su comparación con la sangre entera se observó que, en cuanto a la concentración de plaquetas, en los 3 grupos de estudio (PCB, PRGF, HPRGF), existe un aumento en el número de plaquetas entre la sangre, el PP y el PR. Presentando este último valores de 1,5-2 veces superiores a la concentración en sangre y PP, resultados que coinciden con los de Anitua (2004). Por otro lado, con respecto a la concentración de leucocitos y valor hematocrito se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la sangre y el plasma rico y el plasma pobre en factores de crecimiento en los tres grupos de estudio. Estos resultados confirman la ausencia de glóbulos blancos y hematíes tras la centrifugación de la sangre y la separación de los diferentes tipos de plasma, resultados que coinciden con los de Anitua (2007). Sin embargo, los niveles de IGF-I se mantienen con valores similares a los plasmáticos tanto en el PP como en el PR, ya que este factor de crecimiento se considera un factor plasmático y no varía su concentración en el PRP (Marx, 2004).

Con respecto a la concentración de IGF-I observamos, en el grupo PCB, que el valor medio de IGF-I a las 6h post inyección era de 144 ng/ml y a las 24h de 137 ng/ml y en los grupos PRGF y HPRGF, los valores medios a las 6h eran de 109 ng/ml y 96 ng/ml y a las 24h post inyección de 75 ng/ml y 68 ng/ml, respectivamente. Coincidiendo con otros autores vemos que el valor de IGF-I a las 6h es mayor (aunque no estadísticamente significativo) que los obtenidos a las 24h (Grahnen *et al.*, 1993).

En el estudio comparativo de la concentración de IGF-I en los diferentes tiempos no presentó diferencias significativas, es decir, que la concentración de IGF-I se mantiene en valores similares a lo largo de los 56 días de estudio, en cada uno de los grupos. Así mismo, en la comparación de los niveles de IGF-I entre los 3 grupos de estudio observamos que, los valores medios de este FC son mayores en el lote PCB. Esta discrepancia de valores podríamos justificarla, ya que en el grupo

PCB los animales tenían mayor peso y se ha observado que a mayor peso del animal mayores niveles de IGF-I en sangre (Favier *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2004; Greer *et al.*, 2010).

En este estudio, al igual que en otros, hemos observado valores menores de IGF-I en las hembras con respecto a los machos (Greer *et al.*, 2010). Esto supone un punto de controversia, ya que estas han estado expuestas a progesteronemia durante los ciclos estrales transcurridos a lo largo de su vida y esta hormona estimula la producción de la hormona de crecimiento (GH) y por consiguiente la de IGF-I (Corrada y Gobello, 2001). Asimismo, en nuestro estudio, sólo uno de los machos estaba castrado, por lo que los 3 restantes presentan niveles de andrógenos, y esto podría ser la causa de que en nuestros resultados sean los machos los que mayores niveles de IGF-I presentan. Aunque, cabe destacar que otra causa podría ser el mayor peso que presentaban, sobretodo durante la realización del grupo PCB.

Con respecto a la influencia de la edad, a excepción del grupo PCB, que presentó mayores niveles de IGF-I por el mayor peso, podemos afirmar que son los animales de edad avanzada los que poseen menores concentraciones de IGF-I. Resultados que coinciden con estudios en humana, que sugieren que a mayor edad menores niveles de IGF-I (Tovar *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2005), al igual que en medicina veterinaria (Favier *et al.*, 2001; Greer *et al.*, 2010).

Los niveles normales de CRP en suero de perros sanos son <5 g/L (Caspi *et al.*, 1987). En nuestro trabajo, los valores de CRP obtenidos fueron, en el grupo PCB el valor medio de esta proteína de 10,6 µg/ml, en el lote PRGF de 15,3 µg/ml y en el grupo HPRGF de 7,5 µg/ml. Los resultados del lote 1 (PCB) se aproximan a otro rango de referencia descrito, el de 0-1 mg/dl (Onishi *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2008). En cuanto al lote 3 (HPRGF), los niveles coinciden con otros autores (Yamashita *et al.*, 1994; López *et al.*, 1998; Martínez-Subiela *et al.*, 2004; Goldsack, 2005), quienes describen valores de hasta 7 mg/L en animales sanos, mientras que otros autores describen valores menores (2,2-4,4 mg/L) en hembras caninas sanas (Crossley *et al.*, 2010).

La CRP es una proteína de fase aguda que incrementa sus valores en sangre cuando existe algún proceso inflamatorio y/o neoplásico. Sin embargo, se mantiene en el tiempo sin alteraciones cíclicas siempre y cuando los animales no presenten ninguna alteración clínica (Yamashita *et al.*, 1992; Martínez-Subiela *et al.*, 2004; Ceron *et al.*, 2005; Lithgow y Covington, 2005; Kjølgaard-Hansen *et al.*, 2006; Ohno *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Crossley *et al.*, 2010). De este modo, ya que en el estudio comparativo de la concentración de CRP en los diferentes tiempos no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos a lo largo del tiempo, la concentración de CRP se mantuvo en valores similares a lo largo de los 56 días de estudio. Por otro lado, en cuanto a la comparación de la concentración de esta PFA entre los 3

lotes, observamos que en los grupos PRGF y HPRGF el valor máximo se alcanzó a los 7 días de esta fase experimental aunque no presentó significancia estadística, este hallazgo lo justificamos por una dermatitis en la zona del cuello por autolesión de los animales.

En cuanto a la influencia de factores como el peso, el sexo y la edad en los niveles séricos de esta PFA, nuestros resultados fueron, dentro de cada grupo de estudio: los animales de mayor peso los que presentaban menores niveles de CRP, al igual que el estudio de Veiga et al (2008), donde los perros obesos mostraron menores concentraciones de esta PFA; siendo estos resultados contrarios a los obtenidos en humana, donde la obesidad está asociada a un aumento de las concentraciones de CRP (Mohamed-Ali *et al.*, 1997; Das 2001). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en la influencia del sexo sobre los niveles séricos de CRP, al igual que en humana donde se ha detectado que no presenta diferencias por sexos ni sus valores se ven afectados por otras condiciones como anemia, policitemia o morfología eritrocitaria (Clyne y Olshaker, 1999). A su vez comprobamos que, los animales más jóvenes tuvieron menores concentraciones de CRP. En humana, se ha demostrado que existe una relación directamente proporcional entre los valores de CRP y la edad (Clyne y Olshaker, 1999; Prieto *et al.*, 2008).

En nuestro trabajo, hemos podido comprobar la relación inversa entre ambas proteínas. Así, mientras los niveles séricos de IGF-I aumentan, las concentraciones de CRP disminuyen. Recientemente, se ha demostrado en perros esta correlación negativa entre ambas proteínas, siendo considerada IGF-I como una PFA negativa (Tvarijonaviciute *et al.*, 2011).

En el estudio por imagen, se evaluaron los músculos infiltrados, tanto mediante imágenes ecográficas como por TC. De manera que, valoramos la zona infiltrada y el lado contralateral en cada grupo de estudio y a lo largo del tiempo. Además, se ha comparado la evolución en el tiempo de las medidas musculares, en cada uno de los lados y entre lotes de estudio. En el contraste de las medidas musculares, tanto las obtenidas por ecografía como por TC, entre cada lado valorado (derecho/izquierdo-no infiltrado/infiltrado), en los diferentes niveles (L4, L5, L6) de estudio de la musculatura y dentro de cada grupo de estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Es decir, que el tamaño muscular se mantenía en ambos lados, tras la inyección intramuscular de SSF/PRGF/HPRGF. Por lo tanto, la infiltración de este concentrado plaquetario no produce un efecto anabólico en el lado infiltrado, ni ejerce un efecto sistémico en el lado contralateral.

En la comparación entre lotes de estudio de cada lado muscular evaluado a través de las imágenes tomadas por ecografía y TC, no hubo diferencias significativas. Es decir, el tamaño muscular se mantuvo, en ambos lados, en los 3 grupos de estudio.

Por lo tanto, con todos los resultados obtenidos podemos concluir que, existe una relación inversa entre ambas proteínas estudiadas. Además las concentraciones de IGF-I y CRP no aumentan a nivel sistémico tras la inyección intramuscular de PRGF. Por otro lado, el tamaño muscular se mantiene tras la infiltración de este concentrado plaquetario.

De este modo, los deportistas podrían seguir beneficiándose de las ventajas de estas terapias, con el consiguiente beneficio económico y temporal. Por ello, la WADA retiró la prohibición del uso del PRGF en inyección intramuscular el 1 de Enero de 2011, confirmando de este modo la inocuidad de este tratamiento y confirmando los resultados de nuestro estudio dicha retirada.

Resumen

Resumen

En Enero del 2010 la Asociación Mundial Anti Doping (WADA) prohibió el uso de preparaciones derivadas de plaquetas en inyección intramuscular, principalmente por la presencia del Factor de Crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), del que se ha supuesto un efecto anabolizante, pudiendo ejercer un efecto beneficioso y ventajista en el rendimiento muscular del atleta tratado (Creaney y Hamilton, 2008).

En esta Tesis Doctoral hemos evaluado la inyección local en músculo sano de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) sobre los niveles séricos de IGF-I en la especie canina y su relación con la proteína C-reactiva (CRP) en el tiempo, así como los factores que pueden influir en los niveles de ambas.

Para ello se ha realizado un estudio prospectivo experimental, con 8 perros de raza Beagle, a los que se les inyectó en la musculatura lumbar izquierda (músculos multifido, dorsal largo e iliocostal), 3 preparaciones distintas:

- **PCB (Placebo):** 1 ml de SSF con 0.05 ml Ca₂Cl.
- **PRGF (Plasma Rico en Factores de Crecimiento):** 1 ml de PRGF con 0.05 ml Ca₂Cl.
- **HPRGF (Altas dosis de Plasma Rico en Factores de Crecimiento):** 3 ml of PRGF con 0.15 ml Ca₂Cl.

La extracción sanguínea a los pacientes para la medición de IGF-I y CRP se realizó mediante venopunción yugular, alternando ambas venas yugulares en las diferentes semanas y en los tiempos: Basal (justo antes de la extracción de la sangre para la preparación del PRGF) y 1', 15', 30', 60', 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días pos inyección. Entre el final de un grupo y el comienzo del siguiente los animales tuvieron un mes de descanso.

El IGF-I se analizó mediante un sistema inmunoenzimático automatizado y la concentración de la CRP mediante un sistema de ensayo inmunturbidimétrico automático, previamente validados para su uso óptimo en el perro.

Para valorar las dimensiones de la musculatura y la respuesta a la infiltración de PRGF, llevamos a cabo un estudio mediante imágenes ecográficas y por TC. Las ecografías se realizaron en cada lote experimental y en los tiempos siguientes: basal (antes de la inyección), 1', 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días tras la inoculación y después de la obtención de las muestras sanguíneas. Las TC se llevaron a cabo bajo sedación (medetomidina, morfina y midazolam vía intramuscular a dosis de 0,01 mg /kg, 0,2 mg/kg y 0,2 mg/kg respectivamente) y se realizaron en basal, a los 14, 28, 42 y 56 días pos infiltración. Las imágenes se obtuvieron a nivel del espacio intervertebral L4-L5 (L4), entre L5 y L6 (L6) y en el punto medio entre ellas (L5), realizándose un registro por cada lado (Derecha/Izquierda). De manera que se valoró el efecto de la inyección de PRGF a nivel local midiendo el lado infiltrado, así como su evolución en los tiempos de estudio y a nivel sistémico, comparando el lado infiltrado con la musculatura contralateral.

Para realizar la medición de las imágenes se empleó el programa informático Image Pro Plus[®]. Se obtuvieron los resultados de las áreas musculares en píxeles y posteriormente se convirtieron a cm² según la escala de cada una de las imágenes.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa informático SPSS 15.0[®] para Windows. Los resultados se evaluaron con un test no paramétrico para comprobar su normalidad, realizando una transformación logarítmica en caso necesario. El estudio estadístico se dividió en: estudio

descriptivo de los pacientes, estudio descriptivo y comparativo entre la sangre entera (SE), el plasma pobre (PP) y el plasma rico (PR), estudio descriptivo y comparativo de IGF-I y CRP en el tiempo y evaluación de los factores que influyen en la concentración de las mismas, estudio descriptivo y comparativo de las medidas musculares obtenidas por ecografía y TC.

El rango de edad y peso de los animales fue de 36-120 meses y entre 10 y 24 kg, respectivamente. El peso medio de los animales varió entre los grupos, presentando los pacientes un peso mayor durante el desarrollo del grupo PCB.

En cuanto a la concentración de plaquetas, en los 3 grupos de estudio, existe un aumento en el número de plaquetas en el PR. Presentando este último valores de 1,5-2 veces superiores a la concentración en sangre y PP, resultados que coinciden con los de Anitua (2004). Por otro lado, con respecto a la concentración de leucocitos y valor hematocrito se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la SE y el PR y el PP en los tres grupos de estudio. Estos resultados confirman la ausencia de glóbulos blancos y hematíes tras la centrifugación de la sangre y la separación de los diferentes tipos de plasma, resultados que coinciden con los de Anitua (2007). Sin embargo, los niveles de IGF-I se mantienen con valores similares a los plasmáticos tanto en el PP como en el PR, ya que este factor de crecimiento se considera una factor plasmático y no varía su concentración en el PRP (Marx, 2004).

En el estudio comparativo de la concentración de IGF-I y la CRP en los diferentes tiempos, no hubo diferencias significativas en ninguno de los grupos, existiendo una correlación negativa entre ambas proteínas (Tvarijonavičiute *et al.*, 2011).

Con respecto a la influencia de la edad, sexo y peso sobre los niveles de IGF-I, podemos afirmar que fueron los animales de edad avanzada los que poseían menores concentraciones de IGF-I, igual que en humana (Tovar *et al.*, 2004; Coronado *et al.*, 2005) y en medicina veterinaria (Favier *et al.*, 2001; Greer *et al.*, 2010). Por otro lado, observamos valores menores de IGF-I en las hembras que en los machos (Greer *et al.*, 2010). Fueron los animales de mayor peso los que presentaron mayores niveles de IGF-I (Favier *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2004; Greer *et al.*, 2010)

En este estudio, fueron los animales de mayor peso los que presentaban menores niveles de CRP (Mohamed-Ali *et al.*, 1997; Das 2001; Veiga *et al.*, 2008), no hubo diferencias significativas en la influencia del sexo sobre los niveles séricos de CRP (Clyne y Olshaker, 1999) y los animales más jóvenes tuvieron menores concentraciones de CRP (Clyne y Olshaker, 1999; Prieto *et al.*, 2008).

En la comparación de la musculatura entre el área infiltrada y el área no infiltrada entre los 3 grupos en cada uno de los días de estudio, donde se evaluaba el posible efecto sistémico, no hubo

cambios significativos. Al igual que tampoco los hubo en el estudio local, de este modo, cada uno de los puntos a estudiar mantuvo su tamaño en el tiempo.

Por lo tanto, con todos los resultados obtenidos podemos concluir que, ya que las concentraciones de IGF-I y CRP no aumentan a nivel sistémico tras la inyección intramuscular de PRGF, y manteniéndose el tamaño muscular tras la infiltración de este concentrado plaquetario, no existe ningún efecto anabolizante en el uso de este producto a nivel intramuscular.

De este modo, los deportistas podrían seguir beneficiándose de las ventajas de estas terapias, con el consiguiente beneficio económico y temporal. Estos resultados coinciden con la decisión que tomó la WADA el 1 de Enero de 2011, ya que retiró la prohibición del uso de PRGF en inyección intramuscular, aunque no presentó ningún estudio que confirmara o rechazara sus teorías.

Summary

Summary

The clinical use of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF®) in intramuscular application has been forbidden by the WADA due to the suspicion that these factors can produce systemic effects in Insulin-like growth factor I (IGF-I) concentrations, which can produce a beneficial and advantageous effect in muscular efficiency of the treated athlete. In addition, there is no knowledge about the influence of PRGF administration in the inflammatory status of the organism.

The purpose of this study was to evaluate the influence of local PRGF® injection in healthy muscle on IGF-1 and CRP serum concentrations within time in the canine specie.

A prospective crossover study design was carried out with eight Beagles, which were infiltrated in the middle of the 5th vertebrae on the left lumbar muscle (*multifidus, dorsi and iliocostalis*), with 3 different preparations:

- Group PCB (Placebo): 1 ml of SSF with 0,05 ml Ca₂Cl.
- Group PRGF (Plasma Rich in Growth Factors): 1ml of PRGF® with 0,05 ml Ca₂Cl.
- Group HPRGF (High Plasma Rich in Growth Factor): 3 ml of PRGF® with 0,15 ml Ca₂Cl.

In each of the cases, blood samples were obtained by jugular venipuncture at different time intervals: baseline, 1', 15', 30', 1h, 6h, 12h, 24h, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, and 56 days post injection. Between the end of one group and the beginning of the other, animals had one month off.

The IGF-I was analyzed by an automated immunoassay system and CRP was determined using an immunoturbidimetric assay, both previously validated in dogs.

To assess the muscle dimensions and the response to PRGF infiltration, ultrasound and TC studies were performed. The ultrasounds were done at baseline (before injection) and at 1', 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days after inoculation and after obtaining the blood samples.

The TC study took place under sedation with medetomidine (0,01 mg/kg), morphine (0,2 mg/kg) and midazolam (0,2 mg/kg, intramuscularly and were performed at baseline (before injection) and 14, 28, 42 and 56 days after injection.

The images were taken at the following intervertebral spaces, L4-L5 (L4), L5-L6 (L6) and at the midpoint between them (L5).

PRGF injection was evaluated locally by measuring the infiltrated side and with the evolution during the study time and systemically by comparing the infiltrated side with the contralateral musculature.

Image Pro Plus® program was used to measure the images. Muscle area was measured in pixels, and then turned to cm² according to each of the image scales.

The data was analyzed with the SPSS 15.0 for Windows® program. Normality was assessed and log transformed if necessary. The statistical study was divided in: a descriptive study of the patients; a descriptive and comparative study of whole blood, poor plasma (PP) and rich plasma (PR); a descriptive and comparative study of IGF-I and CRP over time and a descriptive and comparative study of the measurements obtained by the ultrasound and TC images were performed with an ANOVA and Posthoc tuckey test. A study of the factors, which influence the concentrations of the IGF-I and CRP, was performed, and the relationship between them was evaluated with a contingence coefficient and a Pearson correlation.

The range of age and weight of the animals were 36-129 months and 10 to 24 kg, respectively. The mean weight of the animals within the three groups was different, being heavier the animals of the PCB group. Regarding the platelets concentration in the 3 study groups (PCB, PRGF, HPRGF), there was an increase in the number of platelets in the plasma rich in growth factors group. This last group, presented values of 1.5-2 times the concentration in blood and PP, results which are also agreed by Anitua (2004). On the other hand, in the leukocytes concentration and hematocrit value we found statistically significant differences between blood, PP and PR from the three study groups. These results confirm the absence of white blood cells and red blood cells after blood centrifugation and the separation of the different plasma types, resulting once more in agreement with Anitua (2007). IGF-I levels no increases in PP or PR, probably because it is a plasmatic growth factor (Marx, 2004).

When IGF-I and CRP were compared throughout the procedure, there were no differences between times in the three protocols, and there was a significant negative correlation between them (Tvarijonavičiute *et al.*, 2011).

With regard to the influence of age, sex and weight of the animals in IGF-I levels, it was appreciated that older animals had lower IGF-I concentrations, just like in human studies (Tovar *et al.*, 2004, Coronado *et al.*, 2005), as well as in veterinary medicine (Favier *et al.*, 2001; Greer *et al.*, 2010). IGF-I presented lower values in females than in males (Greer *et al.*, 2010) and heavier animals obtained higher levels than thinner ones (Favier *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2004; Greer *et al.*, 2010),

In this study, heavier animals had higher CRP levels (Mohamed-Ali *et al.*, 1997; Das 2001; Veiga, 2008), there were no significant influence of gender on serum CRP levels (Clyne y Olshaker, 1999) and younger animals had CRP lower concentrations (Clyne y Olshaker, 1999; Prieto *et al.*, 2008).

Comparing the muscle area between the infiltrated and non- infiltrated sides of the three groups in the days of study, there were no significant changes in muscle size on both sides, after intramuscular injection. When compared the time evolution of the muscle area, in each of the sides (right/not infiltrated and left/infiltrated) and between the study groups over time, there were no statistically significant differences.

IGF-I and CRP do not increase at a systemic level after local injection of PRGF[®], there is an inverse relationship between the two proteins and muscle size remained without increase after PRGF[®] intramuscular injection. So, no anabolic effect exists after PRGF injection, and therefore

athletes could still benefit from the advantages of its use, resulting in an economical and a temporary beneficial therapeutic.

As a result, with all the obtained data, we can conclude that as IGF-I and CRP concentrations do not increase at a systemic level after intramuscular injection of PRGF, and the muscular area keeps constant, without increasing in size. There is no anabolic effect with the use of this product intramuscularly. This way, athletes would be able to continue benefiting from the advantages of this therapeutics, with the subsequent economical and temporal benefits. These results were the same as the ones decided by the WADA the 1st of January of 2011, as they removed the prohibition of the intramuscular use of PRGF, although there was no studies presented which confirmed or rejected their theories.

Bibliografía

Bibliografía

- Acevedo LM, Rivero JLL. New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tiss Res.* 2006. 323: 283-303.
- Adams GR. Autocrine/Paracrine IGF-1 and skeletal muscle adaption. *J Appl Physiol.* 2002. 93 (3): 1159-1167.
- Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller. et al. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002. 60 (10): 1176-1181.
- Alio JL, Colecha JR, Pastor S. et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 2008. 39 (3): 124-129.

- Allen GM, Wilson DJ. Ultrasound in sports medicine-a critical evaluation. *Eur J Radiol.* 2007. 62(1): 79-85.
- Allin K, Bojesen S, Nordestgaard B. Baseline C-reactive protein is associated with incident cancer and survival in patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2009. 27: 2217-2224.
- Alsemgeest SPM, Gruys E, Van Der Kolk JH. et al. The plasma concentration of bovine SAA in health and disease, after surgery and endotoxin administration. Resúmenes Vth. *Congreso de ISACB.* Parma. Italia. 1992. 121-123.
- Alsemgeest SPM, Jonker FH, Taverne MAM. et al. SAA and Hp plasma concentrations in newborn calves. *Theriogenology.* 1995. 43(2): 381-387.
- Alsemgeest SPM, Taverne MAM, Van Der Weyden BC. et al. Peripartum acute phase protein SAA concentration in plasma of cows and fetuses. *Am J Vet Res.* 1993. 54: 164-167.
- Alsemgeest SPM. Blood concentrations of acute phase proteins in cattle as markers for disease. Thesis Department of pathology. Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht University. Netherlands. 1994. 39-53.
- Amory J, Mackenzie AM, Pearce GP. et al. The effect of respiratory disease on serum haptoglobin and major acute phase protein levels in the slaughter pig. Resúmenes de I *European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins.* Glasgow. 2000: 4.
- Anderson IJ, Read JW. *Atlas of imaging in sports medicine.* 2nd ed. McGraw-Hill. Sydney. 2008. 222-230.
- Andrades JA, Han B, Becerra J. et al. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res.* 1999. 250(2): 485-498.
- Andrades JA, Wu LT, Hall FL. et al. Engineering, expression and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. *Growth factors.* 2001. 18(4): 261-275.
- Andreopoulos FM, Persaud I. Delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) from photoresponsive hydrogel scaffolds. *Biomaterials.* 2006. 27(11):2468–2476.
- Anitua E, Andia I, Ardanza B. et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Throm Haemost.* 2004. 91 (1): 4-15.
- Anitua E, Andia I. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). En: *Un nuevo enfoque en la regeneración ósea.* Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). Anitua E, Andia I, editores. Vitoria. 2000. 13-55.

- Anitua E, Sánchez M, De la Fuente M. et al. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011.
- Anitua E, Sánchez M, Orive G. et al. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci.* 2008. 29(1): 37-41.
- Anitua E, Sánchez M, Orive G. et al. The Potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials.* 2007. 28 (31): 4551-4560.
- Anitua E. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). *Gaceta Dental.* España. 2001. 123: 50-54.
- Antoniades H, Stathakos D, Scher C. Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci.* USA. 1975. 72: 2635.
- Antoniades HN, Calanopoulos T, Neville-Golden J, et al. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci.* USA. 1991. 88: 565-569.
- Appel T, Potzsch B, Muller J. et al. Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Impl Res.* 2002. 13: 522-528.
- Arnás M, Ballester JF, Molinos JR. et al. Factores de crecimiento: estado del conocimiento actual. *Odontoestomatología de implantes.* 2002. 10: 202-208.
- Arquero P. Plasma rico en plaquetas en cirugía estética. *Cir Estet Plas.* 2009. 5 (9): 42-48.
- Arrick BA, López AR, Elfman F. et al. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta-1. *J Cell Biol.* 1992. 118(3): 715-726.
- Arthington JD, Corah LR y Blecha F. The effect of molybdenum-induced copper deficiency on acute-phase protein concentrations, superoxide dismutase activity, leukocyte numbers, and lymphocyte proliferation in beef heifers inoculated with bovine herpesvirus-1. *J Anim Sci.* 1996. 74: 211-217.
- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A. et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2002. 159 (1): 123-134.
- Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA. et al. Transforming growth factor in human platelets. *J Biol Chem.* 1986. 258(11): 7155-7160.

- Atri SS, Misra J, Bisht D. et al. Use of homologous platelet factors in achieving total healing of recalcitrant skin ulcers. *Surgery*. 1990. 108: 508-512.
- Auer DE, Thompson HL, Inglis S. et al. Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localized tissue injury. *Vet Rec*. 1989. 124: 235-239.
- Aziz N, Fahey J, Detels R. et al. Analytical performance of a highly sensitive C-reactive protein based immunoassay and the effects of laboratory variables on levels of protein in blood. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003. 10: 652-657.
- Balius R. Diagnóstico por ecografía: ventajas e inconvenientes. *Jornada monográfica sobre la lesión muscular*. Consell Català de l' Esport. Barcelona. 2011.
- Balius R. *Patología Muscular en el Deporte*. Ed Masson. Barcelona. 2005. 185-190.
- Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC. et al. Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of Bone Mineral Research*. 1999. 14: 1805-1815.
- Bava ED, Barber FA. Platelet-rich plasma products in sports medicine. *Phys Sportsmed*. 2011. 39(3): 94-99.
- Baxter RC, Martin IL, Baniac BA. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. *J Biol Chem*. 1989. 261: 1813-1818.
- Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet neutrophil interactions. Possible relevance in the pathogenesis of thrombosis and inflammation. *Haematologica*. 1991. 76: 491-499.
- Beca T, Hernández G, Morante S. et al. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Avances en periodoncia*. Madrid. 2007. 19: 1.
- Belo L, Santos-Silva A, Rocha S. et al. Fluctuations in C-reactive protein concentration and neutrophil activation during normal human pregnancy. *Europ J Obst Gynecol Reprod Biol*. 2005. 123: 46-51.
- Benassar LJ, Trippel SB. Interaction of epidermal growth factor and insulin-like growth factor in the regulation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res*. 1997. 234: 1-6.
- Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing. Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg*. 1993b. 166(1): 74-81.
- Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing; biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*. 1993a. 165 (6): 728-737.

- Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM. et al. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*. 2003. 90(2): 133-146.
- Berg LC, Jacobsen S, Thomsen PD. Local production of serum amyloid A in equine articular cartilage and cultured chondrocytes. *Int J Exp Pathol*. 2007. 88(4): 58-59.
- Berg U, Bang P. Exercise and circulating insulin-like growth factor-1. *Horm Res*. 2004. 62(1): 50-58.
- Bergsten E, Uutela M; Li X. et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF receptor. *Nature Cell Biol*. 2001. 3: 512-516.
- Bertoni G, Trevisi E, Han X. et al. Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2008. 91(9): 3300-3310.
- Bhanot S, Alex JC. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg*. 2002. 18: 27-33.
- Bianchi S, Martinoli C, Abdelwahab IF. Ultrasound of tendon tears. Part 1: general considerations and upper extremity. *Skeletal Radiol*. 2005. 34(9): 500-512.
- Bianchi S, Poletti PA, Martinoli C. et al. Ultrasound appearance of tendon tears. Part 2: Lower extremity and myotendinous tears. *Skeletal Radiol*. 2006. 35(2): 63-77.
- Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J. et al. Antibacterial effect of platelet gels enriched with growth factors and other active substances. *J Bone Joint Surg Br*. 2007. 89(3): 417-420.
- Bierie B, Moses HL. TGF- β and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006. 17(1-2): 29-40.
- Birbe M. Regeneración ósea. Plasma rico en plaquetas. *Odontología online: www.dentalxp.com* 1. 2006.
- Blanchard G, Nguyen P, Gayet C. et al. Rapid weight loss with high-protein low-energy diet allows the recovery of ideal body composition and insulin sensitivity in obese dogs. *J Nutr*. 2004. 134: 2148S-2150S.
- Bloomberg MS. Muscles and tendons. En: Slatter D: *Textbook of small animal surgery*. 2^a ed. Philadelphia Saunders Co. 1993. 234-246.
- Bloomberg MS. Tendon, muscle and ligament injuries and surgery. En: Olmstead ML. *Small animals orthopedics*. Ed. Mosby. St. Louis. 1995. 140-155.

- Boccia FO, Brusa MC. Aspectos clínicos de las afecciones musculares del perro. 1999. 7 (4): 1-8. www.seleccionesveterinarias.com
- Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res.* 1990. 250: 261-276.
- Bordei P. Locally applied platelet-derived growth factor accelerates fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2011. 93(12): 1653-1659.
- Bornfeldt K, Raines E, Nakano T. et al. Insuline like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induced directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest.* 1994. 93: 1266-1274.
- Borwn G. Enhancement of Epidermal regeneration by biosynthetic EGF. *J Exp Med.* 1986: 163:1319-1324.
- Braund KG, Hoff EJ, Richardson KE. Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. *Am J Vet Res.* 1978. 39: 561-565.
- Breur GJ, Blevins WE. Traumatic injury of the iliopsoas muscle. *Veterinary Surgery.* 1994. 23(5): 421-422.
- Brewitt B, Clark J. Growth and transparency in the lens, and epithelial tissue, stimulated by pulses of PDFG. *Science.* 1988. 242: 777-779.
- Bruce WJ, Spencer S, Miller A. Teres minor myopathy as a cause of lameness in a dog. *Journal Small Animal Practice.* 1997. 38: 74-77.
- Brunner G, Blakytyn R. Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. *Thromb Haemost.* 2004. 92: 253-261.
- Buck BE, Malinin TI. Human Bone and tissue allografts preparation and safety. *Clin Orthop.* 1994. 303: 8-17.
- Buckwalter KA. Current concepts and advances: computerised tomography in sports medicine. *Sports Med Arthrosc.* 2009. 17(1): 13-20.
- Burgess AW. Epidermal growth factor and transforming growth factor A. *Br Med Bull.* 1989. 45(2): 401-424.
- Burnstock G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* 2002. 33: 364-373.

- Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004. 15(1):1-11.
- Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M. et al. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defect in humans. *J Clin Periodontol Res.* 2002. 37: 300-306.
- Campbell SE, Ronald A, Sofka C. Ultrasound of Muscle Abnormalities. *Ultrasound Quarterly.* 2005. 2: 87-94.
- Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest.* 1988. 81(2): 277-281.
- Capilla AC. Concentraciones de Amiloide sérico tipo A, Haptoglobina y Proteína C-reactiva en yeguas pura raza española: influencia del ciclo estral y la gestación. *Diploma de estudios avanzados.* 2010.
- Carmeliet P, Collen D: Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999. 237: 133-158.
- Carmeliet P, Mackman N, Moons L. et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996. 383: 73-75.
- Carmona JU, Arguelles D, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2007. 27: 167-170.
- Carmona JU, Lopez C, Giraldo CE. Uso de concentrados autologos de plaquetas como terapia regenerativa de enfermedades crónicas del aparato musculoesqueletico. *Arch Med Vet .* 2011. 43: 1-10.
- Carpenter G, Cohen S. EGF Receptor in interactions and the stimulation of cell growth. En: *Sevies B Receptor regulation.* Icfkowitz. De: Champan and Hall. 1981(13):41.
- Carrillo JM. *Estudio experimental de la utilización de implantes de poliamida en la resolución de fracturas oblicuas de fémur en conejo.* Tesis Doctoral. Universidad Cardenal Herrera CEU. Valencia. 2002.
- Casati MZ, De Vasconcelos Gurgel BC. et al. Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defects: a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007. 36 (2): 132-136.

- Caspi D, Snel FW, Batt Bennet D. et al. C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res.* 1987. 48: 919-921.
- Centella T, Oliva E, García JC. et al. Tratamiento de las heridas infectadas tras cirugía cardíaca con la utilización de plasma rico en factores de crecimiento: resultados preliminares. *Anales de Cirugía Cardíaca y Vascul.* 2005. 11(4): 208-213.
- Centrella M, Massagué J, Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor- β stimulates parameters of bone growth in fetal rat. *Endoc.* 1986. 119: 2306-2312.
- Ceron JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute Phase Proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 2005. 34(2): 85-99.
- Chang HC, Yang IR, Wang PS. et al. Effects of insulin-like growth factor 1 on muscle atrophy and motor function in rats with brain ischemia. *Chin J Physiol.* 2010. 53(5):337-348.
- Chargé SBP y Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004. 84: 209–238.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science.* 2002. 296: 474-475.
- Cheville NF. Pathogenesis of Acute Inflammation. En: *Introduction to Veterinary Pathology.* Iowa State University Press. USA. 1988: 309-329.
- Cho JK, Kim YH, Park IY. et al. Polymorphism of haptoglobin in patients with premature rupture of membrane. *Yonsei Med J.* 2009. 50(1): 132-136.
- Choo T, Marino V, Mark Bartold P. Effect of PDGF-BB and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) on bone formation around dental implants: a pilot study in sheep. *Clin Oral implants Res.* 2011.
- Chopra R, Anastassiades T. 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. *J Rheumatol.* 1998. 25(8): 1578-1584.
- Chuma H, Mizuta H, Kudo S. et al. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis & Cartilage.* 2004. 12(10): 834-845.
- Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med.* 1999.17: 1019-1025.
- Cmolik BL, Spero JA, Magovern GJ. Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V deficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993. 195: 222.

- Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor. Eruption and eye opening in the newborn animal. *J Biol Chem.* 1962. 237:1555-1562.
- Cohens CG. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 1975. 72:1317-1320.
- Colson A, Williems B, Thissen JP. Inhibition of TNF-alpha production by pentoxifylline does not prevent endotoxins-induced decrease in serum IGF-I. *J Endocrinol.* 2003. 178: 101-109.
- Concannon P, Gimpel P, Goldsmith LT. Post-implantation elevation of plasma fibrinogen as a pregnancy test in dogs. *Biol. Reprod.* 1995. 52 (Suppl): 182.
- Conner JG, Eckersall PD, Doherty M. et al. Acute phase response and mastitis in the cow. *Res Vet Sci.* 1986. 41: 126-128.
- Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J. et al. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci.* 1988. 45: 107-110.
- Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A. et al. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res Vet Sci.* 1989. 47: 203-207.
- Cooper EH. Acute phase reactant proteins. *Immunol Ser.* 1990. 53: 521-536.
- Coronado R, Diez MP, Chávez D. et al. Correlación de edad, niveles séricos de IGF-I e índice de masa muscular, y su influencia como determinantes de las variables isocinéticas en pacientes con osteoporosis. *Cir Ciruj.* 2005. 73: 457-463.
- Creaney L, Hamilton B. Growth factor delivery methods in the management of sports injuries: the state of play. *Br J Sports Med.* 2008. 42: 314-320.
- Crisman MV, Sacarratt WK, Zimmerman KL. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin Equine.* 2008. 24: 285-297.
- Crossley R, Coloma A, Ríos C. et al. Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. *Arch Med Vet.* 2010. 42: 101-105.
- Cugat R, Carrillo JM, Sopena JJ. et al. Treatment results of chondral lesions using plasma rich in growth factors and other substances. Electronical poster in *ISAKOS Bi-annual Congress.* Hollywood. 2005.
- Cugat R, Wang-Saegusa A, Ares O. et al. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010. 1167-1173.

- Cullinae AB, O'Callaghan P, McDermott K. et al. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healing in an animal model. *Graef Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2002. 240: 35-41.
- D'Ercole AJ. *Modern concepts of insulin-like growth factors*. En: Spencer EM editor. Elsevier. Nueva York . 1991. 9-24.
- D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM. et al. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res*. 2000. 86: 312-318.
- Damon SE. Retrovirally mediated over-expression of insulin-like growth factor binding protein 4: evidence that insulin-like growth factor is required for skeletal muscle differentiation. *J Cell Physiol*. 1998. 175: 109-120.
- Das UN. Is obesity an inflammatory condition?. *Nutrition*. 2001. 17: 953-963.
- Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L. et al. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2006. 8(4): 124.
- De Boer HN. History of bone grafts. *Clin Orthop*. 1988. 226: 292-298.
- De Obarrio JJ, Araúz-Dutari JI, Chamberlain TM. et al. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology-case reports. *Int J Periodontics Rest Dent*. 2000. 20: 487-497.
- De Vasconcelos Gurgel BC, Gonçalves PF, Pimentel SP. et al. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007. 18 (5): 649-654.
- De Vos RJ, Weir A, Van Schie HT. et al. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010. 13(303): 144-149.
- Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J. Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001. 235-247.
- Delee JC, Drez D. *Orthopedic Sports Medicine*. Ed Saunders. Philadelphia. 1993. 85-115.
- Deuel TF, Huang JS, Proffit RT. et al. Human platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*. 1981. 256(17): 8896-8899.
- Dickson RB, Lippman ME. Growth factor in breast cancer. *Endocrine Rev*. 1995. 16: 559-589.
- Dinarello CA. Pathogenesis of fever during hemodialysis. *Contr Nephrol*. 1983. 36: 90-99.

- Ding H, Wu X, Nagy A. Mice with Cre Recombinase Activatable PDGF-C Expression. *Genesis*. 2002. 32: 181-183.
- Diz A. Diferenciación histoquímica y estudio morfométrico sobre algunos músculos de perros en razas de diferentes aptitudes dinámicas. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 1987.
- Domínguez J, Fernández JA. *Aplicación y experiencia de los Factores de Crecimiento en roturas de tendón*. Comunicación Oral. 1^{er} Congreso Nacional sobre Factores de Crecimiento. INVASA. Valencia.
- Driver VR, Hanft J, Fylling CP. et al. A prospective, randomized, controlled trial of autologous platelet-rich plasma for the treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage*. 2006. 52(6): 68-70.
- Duan C. Beyond carrier proteins. Specifying the cellular responses to IGF signal: roles of IGF-binding proteins. *J Endoc*. 2002. 175: 41-54.
- Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. Leukocytes: Veterinary Laboratory Medicine. En: *Clinical Pathology*. Eds. Duncan JR, Prasse KW, Mahaffey EA. University Press. Iowa State. 1994. 37-62.
- Dvorak HF: Angiogenesis. *J Thromb Haemost*. 2005. 3: 1835-1842.
- Echevarría JM, Redondo SP, Gómez GJ. Experiencia clínica en el empleo de factores de crecimiento autólogos obtenidos de plasma rico en plaquetas. *Cir plast iberolatinoam*. 2007. 33(3): 155-162.
- Eckersall PD, Conner JG. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*. 1988. 12: 169-178.
- Eckersall PD, Duthie S, Toussaint MJ. et al. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv Vet Med*. 1999. 41: 643-655.
- Eckersall PD, Harvey MJA, Ferguson JM. et al. Acute phase proteins in canine pregnancy (canis familiaris). *J Reprod Fert Suppl*. 1993. 47: 159-164.
- Eckersall PD, Saini PK, Mc Comb C. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha 1 acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein in the pig. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996. 51: 377-385.
- Eckersall PD, Young FJ, Mc Comb C. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec*. 2001. 148: 35-41.

- Eckersall PD. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Com Haematol Int.* 1995. 5: 93-97.
- Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev Med Vet.* 2000. 151: 577-578.
- Eckersall PD. The time is right for acute phase protein assays. *Vet J.* 2004. 168: 3-5.
- Edelman ER, Mathiowitz E, Langer R. et al. bFGF regulation of smooth muscle cell proliferation and angiogenesis is linked in the perivascular space of injured blood vessels. *Biomaterials.* 1991. 12: 619-626.
- El-Khoury GY, Brandser EA, Kathol MH. et al. Imaging of muscle injuries. *Skeletal Radiol.* 1996. 25: 3-11.
- Elson EC. Quantitative determination of serum haptoglobin: a simple and rapid method. *Am J Clin Pathol.* 1984. 62: 655-663.
- Engert JC. Proliferation precedes differentiation in IGF-1 stimulated myogenesis. *J Cell Biol.* 1996. 135: 431-440.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J: "Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing". *Plast Reconstr Surg.* 2004. 114(6): 1502.
- Erlandsson A, Enarsson M, Forsberg-Nilsson K. Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor. 2001. *The Journal of Neuroscience.* 21 (10): 3483-3491.
- Eurell TE, Bane DP, Hall WF. et al. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can J Vet Res.* 1992. 56: 6-9.
- Eurell TE, Eurell JC, Bane DP. et al. Serum haptoglobin is associated with experimentally induced atrophic rhinitis in swine. Resúmenes 11th Congr. *International Pig Veterinary Society.* Lausanne. Switzerland. 1990: 65.
- Everts PAM, Devilee RJJ, Brown-Mahoney Ch. et al. Platelet gel and fibrin sealant reduce allogenic blood transfusions and in total knee arthroplasty. *Acta Anaesth Scand.* 2006. 50: 593-599.
- Fan Z, Larson PJ, Bognacki J. et al. Tissue factor regulates plasminogen binding and activation. *Blood.* 1998. 91: 1987-1998.
- Farrag TY, Lehar M, Verhaegen P. et al. Effect of platelet rich plasma and fibrin sealant on facial nerve regeneration in a rat model. *Laryngoscope.* 2007. 117(1): 157-165.

- Favier RP, Mol JA, Kooistra HS. et al. Large body size in the dog is associated with transient GH excess at a young age. *J Endocrinol.* 2001. 170: 479-484.
- Fernández JA, Álvarez JA, Williams L. Áreas musculares del muslo y la pierna estimadas por antropometría y tomografía axial computerizada en varones adultos. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 2000. 14(2): 109-113.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003. 9(6): 669-676.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002. 29: 10-14.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M. et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science.* 1998. 279: 1528.
- Ferrari M, Zia S, Valbonesi M. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *Int J Artif Organs.* 1987. 10: 47-50.
- Filardo G, Kon E, Della Villa S. et al. Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's Knee. *Int Orthop.* 2010. 34: 909-915.
- Filardo G, Presti ML, Kon E. et al. Nonoperative biological treatment approach for partial Achilles tendon lesion. *Orthopedics.* 2010. 1(33): 120-123.
- Fitch RB, Montgomery RD, Jaffe MH. Muscle injuries in dogs. *Continuing Education.* 1997. 19(8): 947-956.
- Floryan K, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *Aorn J.* 2004. 80 (4): 668-674.
- Folkman J. Angiogenesis. In: Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Jameson J, Kasper D. *Principles of Internal Medicine.* Vol 1. 5ªed. McGraw-Hill. USA. 2001. 517-530.
- Fragoso LR. Papel fisiológico y fisiopatológico del factor de crecimiento del hepatocito. *Rev Invest Clin.* 1998. 50(4): 355-367.
- Franklin DG, Blynch J. Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing plastic and reconstructive surgery. *Surgery.* 1979: 64:766-770.
- Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A. et al. C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2004. 40: 391-399.

- Frechette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasma: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res*. 2005. 84(5): 434-439.
- Freudenberg U, Hermann A, Welzel PB. et al. A star-PEG-heparin hydrogel platform to aid cell replacement therapies for neurodegenerative diseases. *Biomaterials*. 2009. 30(28):5049–5060.
- Frost RA, Lang CH. Alteration of somatotropic function by proinflammatory cytokines. *J Anim Sci*. 2004. 82: 100-109.
- Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osteointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. *Int J Periodont Rest Dent*. 2002. 22: 45-53.
- Fuerst G, Reinhard G, Tangl S. et al. Effect of platelet-released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects. A pilot study in mini pigs. *J Clin Periodont*. 2004. 31: 784-790.
- Fukada, S. Miyagoe-Suzuki, Tsukihara H. et al. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J. Cell Sci*. 2002. 115: 1285–1293.
- Furll M, Furll B, Hadrich G. et al. Relevance of acute phase proteins (Hp) for the early diagnosis of fertility disorders. In: Proceedings of 10th Annual Congress of the European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP) and the 8th Biennial Congress of the International Society for Animal Clinical Pathology (ISACP). Abstracts. Barcelona. 2008. 197-198.
- Furst G, Donath K, Tangl ST. Sinus augmentation in minipigs using autogenous platelet-rich plasma (PRP) and xenogenic hydroxyapatite. *Clin Oral Impl Res*. 2001. 12: 393-421.
- Fuzio P, Ditunno P, Monica R. et al. Regulation of TGF-β1 expression by Androgen Deprivation Therapy of prostate cancer. *Cancer Lett*. 2011.
- Gabay C, Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999. 340: 448-454.
- Galli R, Borello U, Gritti A. et al. *Nature Neuroscience*. 2000. 3: 986-991.
- Galliani MG, Arrascue VM. Histological study to compare bone healing between experimental mandibular bone defects filled with and without platelet rich plasma: an experimental study in rabbits. *J Dent Res*. 2000. 81: 288.

- Gallin JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. Raven Press. New York. 1989: 721-733.
- Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA. A role for Smad in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature Gen*. 2000. 24: 171-174.
- García LA, Garrido ME, Pinchevski R. Determinación del número de plaquetas según cuatro protocolos de obtención de PRP. *X Congreso Internacional de Periodontología*. Centro Médico Docente la Trinidad. Caracas-Venezuela. Sociedad Venezolana de Periodontología. 2005.
- García LA. Estudio Comparativo de 4 Protocolos para la obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP). www.fundacioncarraro.org. Caracas. 2008.
- García M, Coma C. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc*. 2000. 1(2): 8-12.
- Gard A, Burrell L, Pfeiffer S. et al. Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development*. 1995. 121: 2187-2197.
- Gear AR, Camerini D. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation and host defense. *Microcirculation*. 2003. 10: 335-350.
- Gehring S, Hoerauf H, Laqua H. et al. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999. 39: 144-148.
- Genese F. *Histología*. 2ª ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 1994. 35-40.
- Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE. et al. Effects of PRP on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006. 64 (3): 443-451.
- Giacobini M, Alstrom S, Funa K. et al. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on dopamine neurons in vivo. *Neuroscience*. 1993. 57: 923-929.
- Gil F, Vázquez JM, Moreno F. Algunas consideraciones sobre los aspectos histoquímicos y morfométricos de las fibras "b de Wohlfart" en el músculo del perro. *Anat Vet*. Murcia. 1987 a. 2: 51-60.
- Gil F, Vázquez JM, Moreno F. Contribución al estudio histoquímico y morfométrico de las fibras tipo IIb en el músculo esquelético del perro. *Anat Vet*. Murcia. 1987 b. 2: 61-66.
- Gil F. Diferenciación postnatal de los tipos de miofibrillas de algunos músculos del perro. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 1986.

- Gilsanz F, Escalante F, Auray C. et al. Treatment of leg ulcers in β -thalassemia intermedia: use of platelet-derived wound healing factors from the patients own platelets. *Br J Haematol*. 2001. 115: 170.
- Giustina A, Veldhuis JD. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev*. 1998. 19: 717-797.
- Givens M, H Stockdale, Zhang S. et al. The Role of Albumin and Fluids in the Body. 2005. 65-80.
- Glass E. Acute phase protein response to tropical theileriosis in cattle. Resúmenes de *European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins*. Glasgow. 2000.
- Gleizes PE, Munger JS, Nunes I. et al. TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells*. 1997. 15(3): 190-197.
- Godson DL, Campos M, Ata-Poku SK. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory diseases. *Vet Immunol Immunopathol*. 1996. 51: 277-292.
- Goldberg VM, Stevenson S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*. 1989. 225: 7-16.
- Goldsack A. Determinación de proteína C-reactiva pre y post quirúrgica en hembras caninas sometidas a ovariectomía. *Memoria de título*. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Santo Tomás. Santiago (Chile). 2005
- Goldspink G, Harridge SD. Growth factors and muscle ageing. *Exp Gerontol*. 2004. 39(10): 1433-1438.
- Goldspink G. Age-related muscle loss and progressive dysfunction in mechanosensitive growth factor signaling. *Ann NY Acad Sci*. 2004. 1019: 294-298.
- Gómez N. Ecografía de lesiones musculares. *IV Simposio Internacional de actualización de ciencias aplicadas al deporte*. 1991. 445-449.
- Goodsell D. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*. 2003. 21: 118-119.
- Gordon EM, Skotzko M, Kundu RK. et al. Capture and expansion of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with a transforming growth factor-beta1-von willebrand's factor fusion protein for retrovirus-mediated delivery of coagulation factor IX. *Hum Gene Ther*. 1997. 8(11): 1385-1394.

- Gosens S. Prospective randomized study of effect of autologous platelets injection in lateral epicondylitis compared to corticosteroid injection. Poster presentation al *ESSKA Congress*. Porto. 2008.
- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Fibroblast Growth Factor: structure and biological properties. *J Cell physiol*. 1987. 15-26.
- Goviden R, Bhoola KD. Genealogy, expression and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003. 98(2): 257-265.
- Grageda E, Lozada JL, Boyne PJ. et al. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J Oral Implantol*. 2005. 31 (1): 2-17.
- Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft material: a review and standardized research protocol. *Implant Dentistry*. 2004. 13(4): 301-309.
- Grahnen A, Kastrup K, Heinrich U. et al. Pharmacokinetics of recombinant human insulin-like growth factor I given subcutaneously to healthy volunteers and to patients with growth hormone receptor deficiency. *Acta Paediatr Suppl*. 1993. 82: 9-13.
- Greer KA, Hughes LM, Masternak MM. Connecting serum IGF-I, body size, and age in the domestic dog. *Age (Dordr)*. 2011. 33(3): 475-483.
- Gronlund U, Hallén Sandgren C, Persson W. et al. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic subclinical mastitis. *Vet Res*. 2005. 36(2): 191-198.
- Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*. 1994. 64: 109-118.
- Gruys E, Toussaint MJM, Landman WJM. et al. Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins. In: *Production diseases in farm animals*. 2^a Ed. Wensing T. The Netherlands. 1999: 72-87.
- Guerne P, Sublet A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1994. 158: 476-484.
- Guillén MI, Mirabet V, Sopena J. et al. Chondrocyte redifferentiation within platelet factors rich plasma for articular chondroplasty. *Pat Ap Loc*. 2005. 3 (1): 13-23.
- Guler HP, Zapf J, Schmid G. et al. Insulin-like growth factors I and II in healthy man estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol*. 1989. 121: 753-758.

- Guyton AC, Hall J. Hemostasia y coagulación sanguínea. En: Guyton AC, Hall J, editores. *Tratado de Fisiología Médica*. 10ª Ed Interamericana McGraw-Hill. México. 2001. 509-522.
- Hagedorn M, Zilberberg L, Witing J. et al. Domain swapping in a COOH- terminal fragment of platelet factor 4 generates potent angiogenesis inhibitors. *Cancer Res*. 2002. 62: 6884-6890.
- Hahn KA, Freeman KP, Barnhill MA. et al. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. *J Am Vet Med Assoc*. 1999. 214: 1023-1025.
- Hall WF, Eurell TE, Hansen RD. et al. Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Am Vet Med Assoc*. 1992. 201: 1730-1733.
- Hamada T, Ui-Tei K, Imaki J. et al. Molecular cloning of SCDGF-B, a novel growth factor homologous to SCDGF/PDGF-C/fallotin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001. 280: 733-737.
- Hamada T, Ui-Tei K, Miyata Y. A novel gene derived from developing spinal cords, SCDGF, is a unique member of the PDGF/VEGF family. *FEBS Lett*. 2000. 475: 97-102.
- Hansen L, Langvoll D, Wik T, et al. Blood platelets stimulate the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in human monocytes. *Blood*. 1992. 80(4): 1058-1065.
- Hart AH. A rapid accurate in house pregnancy test for dogs. *Vet Forum*. 1997. 40-43.
- Harvey JW y West CL. Prednisone-induced increases in serum alpha2-globulin and haptoglobin concentrations in dogs. *Vet Pathol*. 1987. 24: 90-92.
- Hauschild G, Merten HA, Bader A. et al. Bioartificial bone grafting: tarsal joint fusion in a dog using bioartificial composite bone graft consisting of beta-tricalciumphosphate and PRP: a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2005. 18 (1): 52-54.
- Hauschka PW, Mavrakos AE, Lafrati MD. et al. Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem*. 1986. 261(27): 1266-1274.
- Hayasi S, Jinbo T, Iguchi K. et al. A comparison of the concentrations of C reactive protein and alpha 1 acid glycoprotein in the serum of young adult dogs with acute inflammation. *Vet Res Commun*. 2001. 25: 117-126.
- Heegard PMH, Godson DL, Toussaint MJM. et al. Haptoglobin and SAA responses in cattle following experimental infection with BRSV. Resúmenes del *I European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins*. Glasgow. 2000.

- Heegard PMH, McDonald T, Weber A. et al. Pig serum amyloid A protein as an acute phase reactant after experimental aerosol infection with several serotypes of *Actinobacillus Pleuropneumoniae*. Resúmenes del *II European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins*. Bonn. 2001. 5.
- Heinrich PC, Castell JV, Andus T. IL-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990. 265(3): 621-636.
- Heldin C, Ostman A, Eriksson U. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Archives of Biochem and Biophysics*. 2002. 398: 284-290.
- Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclasts formation and function. *Endocrinology*. 1995. 136: 124-131.
- Hirvonen J, Pyorala S. Acute phase response in dairy cows with surgically treated abdominal disorders. *Vet J*. 1998. 155: 53-61.
- Hofner MC, Fosbery MW, Eckersall PD. et al. Haptoglobin response of cattle infected with foot and mouth disease virus. *Res Vet Sci*. 1994. 57: 125-128.
- Holm JL, Rozanski EL, Freeman LM. et al. C-reactive protein concentrations in acute pancreatitis. *J Vet Em Crit Care*. 2004. 14: 183-186.
- Holt R, Sonksen PH. Growth hormone, IGF-I and insulin and their abuse in sport. *British Journal of Pharmacology*. 2008. 154: 542-556.
- Hom DB, Linzie BM, Huang TC. The healing effects of autologous platelet gel on acute human skin wounds. *Arch Facial Plast Surg*. 2007. 9(3): 174-183.
- Hood AG. Perioperative autologous sequestration III: A new physiologic glue with wound healing properties. *Proceedings of the American Academy Cardiovascular Perfusion*. 1993. 14: 126.
- Horadagoda A, Eckersall PD, Hodgson JC. et al. Immediate responses in serum TNF α and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. *Res Vet Sci*. 1994. 57: 129-132.
- Hornick JL, Van Eenaeme O, Gérard I. et al. Mechanism of reduced compensatory growth. *Domest Anim Endocrinol*. 2000. 19: 121-132.
- Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*. 2002. 84: 822-832.

- Huges SE. Differential expression of the fibroblastic growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem.* 1997. 45: 1005-1019.
- Hultén C, Sandgren B, Skioldebrand E. et al. The acute phase protein SSA as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand.* 1999. 40: 323-333.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M. et al. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports.* 1991. 23: 801-810.
- Husebekk A, Husby E, Sletten K. et al. Characterization of amyloid protein AA and its serum precursor SAA in the horse. *Scand J Immunol.* 1986. 23(6): 703-709.
- Icol YO, Yilmaz Z, Ulus IH. Endotoxin alters serum-free choline and phospholipid bound choline concentrations, and choline administration attenuates endotoxin-induced organ injury in dogs. *Shock.* 2005. 24(3): 288-293.
- Inui H, Kitami Y, Tani M. et al. Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) and a receptors in vascular smooth muscle cells: PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1994. 269: 30546-30552.
- Ito N, Claesson-Welsh L. Dual effects of heparin on VEGF binding to VEGF receptor-1 and transduction of biological responses. *Angiogenesis.* 1999. 3(2): 159-166.
- Itoh H, Tamura K, Izumi M. et al. The influence of age and health status and the serum alpha-1 acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen free pigs. *Can J Vet Res/Rev Can Rech Vet.* 1992. 57: 74-78.
- Izquierdo M, Aguado X. Efectos del envejecimiento sobre el sistema neuromuscular. *Arch Med Dep.* 1998. 25:299-306.
- Jackse N, Lorenzini M, Eskici A. PRP's influence in bone regeneration: an experimental study in sheep. *European Association for Osteointegration.* Oral presentation. Brusseles. 2002.
- Jacobsen S, Andersen PH. The acute phase protein SAA as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet Educ.* 2007. 19(1): 38-46.
- Jacobsen S, Kjelgaard-Hansen M, Petersen HH. et al. Evaluation of commercially available human SAA turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet J.* 2006. 172: 315-319.
- Jacobsen S, Nielsen JV, Kjelgaard-Hansen M. et al. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet Surgery.* 2009. 38(6): 762-769.

- Jain NC. Acute phase proteins. En: *Current veterinary Therapy: Small animal practice*. Eds: Kirk RW, W B Saunders. Philadelphia. 1989. 468-471.
- Jain NC. The plasma proteins, dysproteinemias, and immune deficiency disorders. En: *Essentials of Veterinary Haematology*. Lea & Febiger. Philadelphia. 1993. 347-379.
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. et al. Muscle derived stem cells. *Hum Gene Ther*. 2002. 9(10): 642-647.
- Järvinen M, Lehto MUK. The effect of early mobilization and immobilization on the healing process following muscle injuries. *Sports Med*. 1993. 15: 78–89.
- Järvinen TA, Kääriäinen M, Järvinen M. et al. Muscle strain injuries. *Curr Opin Rheumatol*. 2000. 12:155-161.
- Jensen LE, Whitehead AS. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response. *Biochem J*. 1998. 334: 489-503.
- Jensen SS, Pinholt EM, Horting-Hansen E. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996. 11: 55-66.
- Jergens AE, Schereiner CA, Frank DE. et al. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med*. 2003. 17: 291-297.
- Jiménez JF. Lesiones musculares en el deporte. *Int J Sci*. 2006. 2: 55-67.
- Jiménez JF. Lesiones musculares en el deporte. *International Journal of Sport Science*. 2006. 3: 55-67.
- Jobling AI, Nguyen M, Gentle A. et al. Isoform-specific changes in scleral transforming growth factor-beta expression and the regulation of collagen synthesis during myopia progression. *J Biol Chem*. 2004. 279(18): 18121-18126.
- Kääriäinen M, Järvinen TAH, Järvinen M. et al. Adhesion and regeneration of myofibers in injured skeletal muscle. *Scand J Med Sci*. 2000. 10: 332–337.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Serum proteins and the dysproteinemias. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press. San Diego. 1997: 117-138.
- Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*. 2000. 71 (10): 1654-1661.

- Kathleen ML, Dardik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 2010. 83: 1-9.
- Katoh N, Nagakawa H. Detection of haptoglobin in the high density lipoprotein and the very high density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver. *J Vet Med Sci*. 1999. 61: 119-124.
- Kawamura M, Urist MR. Growth factors, mitogens, cytokines and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture. *Dev Biol*. 1998. 130: 435-442.
- Kawase T, Okuda K, Saito Y. et al. "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". *J Periodontol*. 2005. 76 (5): 760-767.
- Kawase T, Okuda K, Wolff LF. et al. "Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro". *J Periodontol*. 2003. 74 (6): 858-864.
- Kelm RJ, Swords NA, Orfeo T. et al. Osteonectin in matrix remodeling. A plasminogen-osteonectin-collagen complex. *J Biol Chem*. 1994. 269: 30147-30153.
- Kent JE, Goodall J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Vet J*. 1991. 23: 59-66.
- Kent JE, Whiwell KE. Serum protein values in spontaneously aborted foetuses. Resúmenes *Vth International Conference on Equine Infectious Diseases*. Cambridge. 1991.
- Kevy SV, Jacobson MS. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *J Extra Corpor Technol*. 2004. 36(1):28-35.
- Khoury MA. Lesiones musculares: anatomía y fisiología del daño y la reparación. *IV Simposio Internacional de actualización en ciencias aplicadas al deporte*. 1991. 443-444.
- Kim SG, Chung CH, Kim YK. et al. Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002a. 17(1): 86-94.
- Kim SG, Kim WK, Park JC. et al. A comparative study of osteointegration of Avana implants in a demineralized freeze-dried bone alone or with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002b. 60(9): 1018-1025.
- Kimura M, Toth LA, Agortini H. et al. Comparasion of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysacharide and double-stranded RNA. *Am J Physiol*. 1995. 36: 1596-1605.

- Kitazawa T. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990. 31(9): 1773-1777.
- Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Houser GA. et al. Use of serum C-reactive protein as an early marker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2006. 48(9): 1-4.
- Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen A. Evaluation of commercially available human C reactive protein turbidimetric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol.* 2003. 32: 81-87.
- Klinger MH. Platelets and Inflammation. *Anatomical Embryology.* Berlín. 1997. 1: 196.
- Koch J. The role of body composition measurements in wasting syndromes. *Semin Oncol.* 1998. 25(6): 12-19.
- Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys.* 1996. 1317: 84-94.
- Kon E, Filardo G, Delcogliano M. et al. Platelet-rich plasma: new clinical application. A pilot study for treatment of jumper's Knee. *Injury.* 2009. 40: 598-603.
- Kovács K, Velich N, Huszár T. et al. Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of beta-tricalcium phosphate in beagle dogs. *J Craniofac Surg.* 2005. 16(1): 150-154.
- Kristensen K, Wide-Swensson D, Lindstrom V. et al. Serum amyloid A protein and C-reactive protein in normal pregnancy and preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2009. 67: 275-280.
- Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M. et al. Determination of serum CRP in healthy Beagle dogs of various age and pregnant Beagle dogs. *Exp Anim.* 2003. 52(5): 387-390.
- Kushner I, Gewurz H, Benson MD. C-reactive protein and the acute phase response. *J Lab Clin Med.* 1981. 97: 739-749.
- Kushner I, Mackiewicz A. The acute phase response: an overview. En Mackiewicz A; Kushner I; Baumann H: Acute phase proteins molecular biology, biochemistry and clinical applications. *CRC Press.* 1993. 3-19.
- La Torre R, Gil F, Ramírez G. et al. Postnatal development of semitendinosus muscle in the dog. *Anat Embryol.* 1993 c. 188: 401-407.
- La Torre R, Gil F, Vázquez JM. et al. Morphological and histochemical characteristics of muscle fibre types in flexor *carpi radialis* of the dog. *J Anat.* 1993 a. 182: 313-320.

- La Torre R, Gil F, Vázquez JM. et al. Skeletal muscle fiber types in the dog. *J Anat.* 1993 b. 182: 329-337.
- La Torre R. Organización morfológica e histoquímica de los distintos tipos de fibras que integran el músculo flexor carporradial del perro. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. 1990.
- LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002. 111:589–601.
- Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. *J Periodontol.* 2003. 74: 1498-1507.
- Lambert CP, Bopp MM, Johnson LE. et al. Resistance training and testosterone replacement induced changes in body composition, free testosterone, IGF-I, IGF-I/IGFBP3 in the frail elderly. *JEPonline.* 2007. 10(1): 48-56.
- Landesberg R, Roy M, Glickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000. 58 (3): 297-300.
- Landesberg R. Risk of using platelet-rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998. 56: 116-117.
- Landsown AB. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen.* 2002. 10: 271-285.
- Langford KS, Miell JP. The insuline-like growth factor-I/binding protein axis: phisyology, pathophysiology and therapeutic manipulation. *Eur J Clin Invest.* 1993. 23: 503-516.
- Langhans W. Bacterial products and the control of ingestive behavior: clinical implications. *Nutrition.* 1996. 12(5): 303-315.
- Lariviere B, Rouleau M, Picard S. et al. Human plasma fibronectin potentiates the mitogenic activity of platelet-derived growth factor and complements its wound healing effects. *Wound Repair Regen.* 2003. 11: 79-89.
- LaRochelle W, Jeffers M, McDonald W. et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature Cell Biol.* 2001. 3: 517-521.
- Larsen GL, Herison PM. Mediators of inflammation. *Ann Rev Inmunol.* 1983: 335.
- Laurell CB, Gronvall C. Haptoglobins. *Adv Clin Chem.* 1962. 5: 135-173.
- Lawrence DA. Latent TGF-beta: an overview. *Moll Cell Biochem.* 2001. 219(1-2): 163-170.
- Ledent E, Wasteson A, Berlin G. Growth factor release during preparation and storage of platelets concentrates. *Vox Sang.* 1995. 68: 205-209.

- Lefebure C, Pourcelot L. *Ecografía Musculotendinosa*. Masson S.A. 1991. 38-50.
- Leon C, Alex M, Klocke A. et al. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*. 2004. 103(2): 594-600.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of neurotrophins. *An Rev Neurosci*. 1996. 19: 289-317.
- Lewis DD, Shelton DG, Piras A. et al. Gracilis or semitendinosus myopathy in 18 dogs. *Journal Am An Hosp Assoc*. 1997. 33: 177-178.
- Li NY, Chen LQ, Chen T. et al. Effect of platelet rich plasma on vascularization of tissue-engineered bone. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2007. 42(7): 436-437.
- Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDFG-C and PDFG-D. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003. 14: 91-98.
- Li X, Ponten A, Aase K. et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha receptor. *Nat Cell Biol*. 2000. 302-309.
- Li Y, Huard J. Differentiation of Muscle-derived cells into myofibroblast in injured skeletal muscle. *American Journal of Pathology*. 2002. 161: 895-907.
- Lind M, Schumacker B, Soballe K. et al. Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand*. 1993. 64(5): 553-556.
- Lithgow D, Covington C. Chronic inflammation and breast pathology: a theoretical model. *Biol Res Nurs*. 2005. 7: 118-129.
- Liu Z, Zhang CH, Naghadara D. et al. Blockade of Nuclear Factor of Activated T cells activation signaling suppresses balloon injury-induced neointima formation in a rat carotid artery model. *J Biol Chem*. 2005. 280 (15): 14700-14708.
- Lobetti RG, Mohr AJ, Dippenaar T. et al. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc*. 2000. 71: 38-42.
- López J, Islas A, Merino V. et al. Efecto de estímulos inflamatorios locales y sistémicos en la proteína C-reactiva, fibrinógeno y leucograma de caninos. *Agro-Ciencia*. 1998. 14: 121-126.
- Lowery GL, Kulkarni S, Pennisi AE. Use of autologous growth factors in lumbar spinal fusion. 1999. *Bone* 25: 47-50.
- Lubinis M, Meier K, Smith E. et al. Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994. 269: 9822-9825.

- Luces G, García LA. *Uso del PRP para la regeneración tisular en la terapia periodontal*. Universidad Central de Venezuela. Tesis Monográfica. Caracas. 2006.
- Lumsden JH, Valli VE, McSherry BJ. et al. The kinetics of hematopoiesis in the light horse III. The hematologic response to hemolytic anemia. *Can J Comp Med*. 1975. 39: 332-339.
- Maccatrozzo L, Caliaro F, Toniolo L. et al. The sarcomeric myosin heavy chain gene family in the dog: Analysis of isoform diversity and comparison with other mammalian species. *Genomics*. 2007. 89: 224-236.
- Madonna R, Cevik C, Nasser M. et al. Hepatocyte growth factor: Molecular biomarker and player in cardioprotection and cardiovascular regeneration. *Thromb Haemost*. 2012. 107(4).
- Makimura S, Suzuki N. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Jpn J Vet Sci*. 1982. 44: 15-21.
- Male DK, Champion B, Cooke A. et al. Cell traffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. 2ª ed. Ed Gower London. New York. 1991. 75-90.
- Man D, Plosker H, Windland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (plasma gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001. 107: 229-237.
- Maniscalco P, Gambera D, Lunati A. et al. The "Cascade" membrane: a new PRP device for tendon ruptures. Description and case report on rotator cuff tendon. *Acta Biomed*. 2008. 79: 223-226.
- Mariani E, Ravaglia G, Forti P. et al. Vitamin D, thyroid hormones and muscle mass influence natural killer (NK) innate immunity in healthy nonagenarians and centenarians. *Clin Exp Immunol*. 1999. 116: 19-27.
- Martínez-González JM, Cano-Sánchez J, Gonzalo-Lafuente JC. et al. Do ambulatory use PRP concentrates present risks?. *Med Oral*. 2002. 7(5): 375-390.
- Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Cerón JJ. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am. J Vet Res*. 2003. 64:1021-1026.
- Martínez-Subiela S, Cerón J. Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C-reactiva y Amiloide A sérico en caninos. *Arch Med Vet*. 2005. 37: 61-66.
- Martínez-Subiela S, Ginel P, Cerón J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec*. 2004. 154: 814-817.

- Martínez-Subiela S, Parra ND, Cerón JJ. Principales aplicaciones de las proteínas de fase aguda en la clínica canina. *An Vet.* 2004. Murcia. 20: 75-86.
- Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD. et al. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2002. 150: 241–244.
- Martínez-Subiela S, Tecles F, Parra MD. et al. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Ann Vet.* Murcia. 2001. 17: 97-114.
- Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solá I. et al. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion.* 2009. 49: 144-156.
- Marx R, Garg A. The Biology of Platelets and the Mechanism of Platelet Rich Plasma. En: Marx R, Garg A, editors. *Dental and Craniofacial Applications of PRP.* Quintessence Publishing Co, Inc. Chicago. 2005. 3-65.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg.* 1998. 85: 638-646.
- Marx RE. Platelet Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004. 62: 489-496.
- Marx RE. Platelet-Rich Plasma (PRP): What is PRP and What is Not PRP?. *Implant Dentistry.* 2001. 4: 225-228.
- Massagué J. TGF- β -signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998. 67: 753-791.
- Massagué J. The Transforming Growth Factor β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990. 6: 597-641.
- Matheny RW, Nindl BC. Loss of IGF-IEa or IGF-IEb impairs myogenic differentiation. *Endocrinology.* 2011. 152(5): 1923-1934.
- Matijatko V, Kucer N, Baric-Rafaj RG. et al. CRP concentration in dogs with uncomplicated babesiosis. *Resúmenes III Eur Coll on Acute Phase Proteins.* Doorn. 2002: 55.
- Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001. 112(21): 1-17.
- Mattoon JS, Nyland TG. Ultrasonographics evaluation musculoskeletal injuries. In Nyland TG and Mattoon JS: *Veterinary diagnostic ultrasound.* WB Saunders. Philadelphia. 1995. 110-135.

- May AE, Kalsch T, Massberg S. et al. Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (α IIb β 3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells. *Circulation*. 2002. 106: 2111-2117.
- Mazzaferro E, Martin L. Albúmina. *Emergency and Critical Care*. Symposium 2010.
- McCarthy TL, Casinghino S, Centrella M. et al. Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandyn E2, growth hormones, and insulin-like growth factors. *J Cell Physiol*. 1994. 160: 163-175.
- McDonald TL, Larson MA, Mack DR. et al. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrums. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001. 83(3-4): 202-211.
- Mcgrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK. et al. Haptoglobin concentrations in canine hospital population. *Vet Rec*. 2003. 152: 562-564.
- Mcguire TC, Henson JB, Quist SE. Viral-induced hemolysis in equine infectious anemia. *Am J Vet Res*. 1969. 30: 2091-2097.
- Mcllwraith CW. Enfermedades de las articulaciones, los tendones, los ligamentos y las estructuras relacionadas. En Stashak TS. *Claudicación en el Caballo*. 5ª Ed. Intermédica. Buenos Aires. 2004. 469-684.
- McSherry BJ, Horney FD, Degroot JJ. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can J Comp Med*. 1970. 34: 191-197.
- Megliola A, Eutropi F, Scorzelli A. et al. Ultrasound and magnetic resonance imaging in sports-related muscle injuries. *Radiol Med*. 2006. 111(6): 836-845.
- Mehta S, Watson T. Platelet Rich Concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma*. 2008. 22(6): 432-438.
- Mei-Dan O, Carmont M, Kots E. et al. Early return top lay following complete rupture of the medial colateral ligament of the elbow using preparation rich in growth factors: a case report. *J Shoulder Elbow Surg*. 2010. 19(5): e1-e5.
- Menetry J, Kasemkijwattana C, Day CS. et al. Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg*. 2000. 82B: 131-137.
- Mercado M, Pajot S, Paticelli A. Recuperación y Rehabilitación Fisioterápicas. 1ra parte. *Revista Pet's*. 1997. 13(71): 255-266.

- Mesa MG, Alfonso CC. Características estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc.* 2000. 1 (2):132-141.
- Meyer DJ, Harvey JW. El laboratorio en medicina veterinaria: interpretación y diagnóstico. 2ªEd. Intermédica. 2000. 20-25.
- Mignatti P, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism. *J Cell Biochem.* 1991. 47: 201-207.
- Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P. et al. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial Cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Investigative Ophthalmology and visual science.* 2003. 44: 1211-1220.
- Miller RE, Grodzinsky AJ, Cummings K. et al. Intraarticular injection of heparin-binding insulin-like growth factor 1 sustains delivery of insulin-like growth factor 1 to cartilage through binding to chondroitin sulfate. *Arthritis Rheum.* 2010. 62(12): 3686-3694.
- Mingo C, Pombo M, Larrabe L. Plasma rico en plaquetas en cirugía ortopédica y traumatológica. *Artrosc.* Buenos Aires. 2007. 14(2): 145-151.
- Minor KH, Peterson CB. PAI-1 Promotes the Self-Association of Vibronectin into Complexes Exhibiting Altered Incorporation into the Extracellular Matrix. *J Biol Chem.* 2002. 277: 10337-10345.
- Mischke R, Waterston M, Eckersall PD. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *Vet J.* 2007. 174(1): 188-192.
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006. 34(11): 1774-1778.
- Mizuta H, Kudo S, Nakamura E. et al. Active proliferation of mesenchymal cells prior to chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis & Cartilage.* 2004. 12: 586-596.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A. et al. El tejido adiposo subcutáneo humano libera IL-6, pero no el TNF- α in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997. 82: 4196-4200.
- Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop Rel Res.* 1991. 263: 30-43.
- Molloy T, Wang Y, Murrell GAC. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003. 33(5): 381-394.

- Monshouwer M, Witkamp RF, Nijmeijer SM. et al. A lipopolysaccharide induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. *J Vet Pharmacol.* 1996. 19(5): 382-388.
- Morrey BF. Ligament injury and the use of hinged external fixators at the elbow. *Instr Course Lect.* 2012. 61: 215-225.
- Mosnier LO, Buijenhuis P, Marx PF. et al. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood.* 2003. 101: 4844-4846.
- Muñoz CS. Lesiones Musculares Deportivas: Diagnóstico por Imágenes. *Revista Chilena de Radiología.* 2002. 82(3): 259-272.
- Muntean W, Zenz W, Finding K. Inhibitor to factor V after exposure to fibrin sealant during cardiac surgery in a two-year old child. *Act Paediat.* 1994. 83-84.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004. 168(1): 28-40.
- Nagata MJH, Messoria MR, Furlaneto FAC. et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *European Journal of Dentistry.* 2010. 4: 395-402.
- Nagy JA, Vasile E, Feng D. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2002. 196: 1497-1506.
- Nair KS. Muscle protein turnover: methodological issues and the effect of aging. *J Gerontol.* 1995. 50: 107-112.
- Nakagawa T, Sakamoto T, Hiraumi H. et al. Topical insulin-like growth factor 1 treatment using gelatin hydrogels for glucocorticoid-resistant sudden sensorineural hearing loss: a prospective clinical trial. *BMC Med.* 2010. 25(8): 76.
- Nakamura M, Takahashi M, Ohno K. et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci.* 2008. 70(2): 127-131.
- Nakayama T, Sonada S, Urano T. et al. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem.* 1993. 39: 293-297.
- Nap RC, Mol JA, Hazewinkel HAW. Age related plasma concentration of growth hormone (GH) and insulin like growth factor (IGF-I) in Great Dane pups fed different dietary levels of protein. *Domestic Animal Endocrinology.* 1993. 10: 237-247.

- Ndung'u JM, Eckersall PD, Jennings FW. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta trop*. 1991. 49:77-86.
- Nielsen FR, Bek KM, Rasmussen PE. et al. C-reactive protein during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1990. 53: 23-27.
- Nindl BC, Alemany JA, Kellogg MD. et al. Utility of circulating IGF-1 as a biomarker for assessing body composition changes in men during periods of high physical activity superimposed upon energy and sleep restriction. *J Appl physiol*. 2007. 103 (1): 340-346.
- Nofsinger C, Konin JG. Diagnostic ultrasound in sports medicine: current concepts and advances. *Sports Med Arthrosc*. 2009. 17(1): 25-30.
- Nunokawa Y, Fujinaga T, Taira T. et al. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *J Vet Med Sci*. 1993. 55(6): 1011-1016.
- Nurden AT, Nurden P, Sánchez M. et al. Platelets and wound healing. *Frontiers in Bioscience*. 2008. 13: 3532-3548.
- Nurden P, Poujol C, Durrieu-Jais C. et al. Labeling of the internal pool of GPIIb-IIIa in platelets of patients receiving c7E3 Fab fragments: flow and endocytic mechanisms contribute to the transport. *Blood*. 1999. 93: 1622-1633.
- Ogilvie GK, Walters LM, Greeley SG. et al. Concentration of alpha 1 acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*. 1993. 203: 1144-1146.
- Ohno K, Yokoyama Y, Nakashima K. et al. C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci*. 2007. 68: 1275-1279.
- Okuda K, Kawase T, Momose M. et al. "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". *J Periodontol*. 2003. 74 (6): 849-57.
- Okumura M, Fujinawa T, Yamashita K. et al. Isolation, characterization and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses. *Am J Vet Res*. 1991. 52: 1979-1985.
- Olazábal J, San Martín H. Crecimiento Compensatorio. *SIRIVS*. 2008. 1-9.
- Omer Mei-Dan MD, Lippi G, Sánchez M. et al. Autologous Platelet Rich Plasma: a revolution in soft tissue sports injury management?. *The Physician Sports Medicine*. 2011. 38(4): 127-135.
- Onishi T, Inokuma H, Ohno K. et al. C-reactive protein concentrations in normal and diseased dogs; measured by laser nephelometric immunoassay. *J Jpn Vet Med Assoc*. 2000. 53: 595-601.

- Orozco L, Soler R, Querol S. Factores de Crecimiento y Células madre. *Jornada precongreso SETRADE*. 2010.
- Ouyang XY, Qiao J. Effect of platelet-rich plasma in the treatment of periodontal intrabony defects in humans. *Chin Med J*. 2006. 119 (18): 1511-1521.
- Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T. et al. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004. 62 (5): 555-558.
- Paltrinieri S. The feline acute phase reaction. *Vet J*. 2008. 177(1): 26-35.
- Pannen BHJ, Robotham JL. The acute-phase response. *New Horiz*. 1995. 3: 183-197.
- Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech*. 2001. 55: 108-121.
- Pathak KM, Gaur SN. Changes in serum enzyme activities in pigs naturally infected with metacestodes of *Taenia solium*. *Vet Res Commun*. 1985. 9: 143-146.
- Payette H, Roubenoff R, Jacques PF. et al. Insuline-like growth factor-I and interleukin 6 predict sarcopenia in very old community-living men and women: The Framingham Heart Study. *J Am Geriatr Soc*. 2003. 51. 1237-1243.
- Pecorino L. Células Madre para terapias celulares. *Actionbioscience*. 2001. 6-15.
- Peerbooms J, Sluimer J, Brujin D. et al. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sport Med*. 2009. 38(2): 255-262.
- Pelletier JP, Pelletier M. Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-I in the physiopathology of osteoarthritis. *Rev Rhum Ed Fr*. 1994. 61(9): 103-108.
- Peñarrocha M, Sanchis JM, Martínez JM. Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia*. 2001. 11(3): 205-216.
- Peng H, Huard J. Stem cells in the treatment of muscle and connective tissue diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2003. 3: 329-333.
- Pennisi, P, Jasper H. La testosterona produce aumentos en Iso niveles séricos de IGF-I e IGFBP3 en pacientes prepuberales. *JCEM*. 1985. 60: 910.
- Pepys MB, Baltz ML, Tennent GA. et al. Serum Amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet J*. 1989. 21: 106-109.

- Peris I. *Determinación de la concentración plaquetaria y del factor de crecimiento transformante (TGF-β1) en el PRP de la especie canina*. Trabajo de investigación tutelado. Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad Cardenal Herrera. Valencia. 2008.
- Peris JL. *Caracterización biomecánica del proceso de consolidación de fracturas: validación de técnicas de registro en la rigidez in vivo mediante análisis histomorfométrico del callo de fractura*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 1997.
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. Application of acute phase protein measurement veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 2004. 35: 163-187.
- Phillippou A, Maridaki M, Halapas A. et al. The role of insuline-like Growth factor 1 (IGF-1) in skeletal muscle physiology. *In vivo*. 2007. 21: 45-54.
- Piercy DWT. Acute phase responses to experimental Salmonellosis in calves and Collibacilosis in chickens: serum iron and ceruloplasin. *J Cop Path*. 1979. 89: 309-319.
- Piermattei DL. *Atlas de abordajes quirúrgicos de huesos y articulaciones. Perros y gatos*. 3ª ed. Ed. Interamericana. México. 1996. 180-250.
- Pietrzak E, Eppley B. Scientific foundations platelet rich plasma: biology and new technology. *J Craniofac Surg*. 2005. 16 (6): 1043-1054.
- Piñeiro M, Alava MA, Lorenzo E. et al. Characterisation of the acute phase protein response in pig affected by transport related stress. Resúmenes del *II European Colloquium of Animal Acute Phase Proteins*. Bonn. 2001: 5.
- Pinelli E. *Protective Immune responses against Leishmania in dogs*. PhD Thesis. Utrecht University. Netherlands. 1996.
- Playford RJ, Macdonald CI. Growth factors in spit. *The Lancet*. 1997. 350(9074): 369.
- Popesko P. *Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos*. Tomo II. Ed Masson. 1998. 325-350.
- Prieto MF, Kilstein J, Bagilet D. et al. Proteína C reactiva como factor pronóstico de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos. *Med Intensiva*. 2008. 32(9): 424-430.
- Prisk V, Huard J. Muscle injuries and repair: The role of prostaglandines and inflammation. *Histol Histopathol*. 2003. 18: 1243-1256.
- Promega. *Protocols and Applications Guide*. 2ª Edition. 1991: 271-279.

- Putnam FW. Haptoglobin. En: Putnam FW (Ed). *The plasma proteins: structure, function, and genetic control*. 2ªEd. Academic Press. New York. 1975. 1-51.
- Radice F, Yanez R, Gutierrez V. et al. Comparison of magnetic resonance imaging findings in anterior cruciate ligaments grafts with and without autologous platelet-derived growth factors. *Arthroscopy*. 2010. 26(1): 50-57.
- Rai B, Teoh SH, Ho KH. An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet-rich plasma. *J Control Release*. 2005. 107(2): 330-342.
- Raines E. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. Review. *Br Heart J*. 1993. 60(1): 30-37.
- Randelli P, Arrigoni P, Cabitza P. et al. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil*. 2008. 30: 1584-1589.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ. et al. Wound macrophages express TGF α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*. 1988. 247: 708-712.
- Rebelo I, Carvalho-Guerra F, Pereira-Leite L. et al. Lactoferrin as a sensitive blood marker of neutrophil activation in normal pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995. 62(2): 189-194.
- Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanism of platelet exocytosis: insight into the secretory life of thrombocytes. *Blood*. 2000. 96(10): 3334-3342.
- Reed GL. Platelet Secretion. En: Reed GL. *Platelets*. AD Michelson. Elsevier Science. San Diego. 2002. 181-195.
- Regassa F, Noakes DE. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and presence of intrauterine bacteria. *Vet Rec*. 1999. 144: 502-506.
- Reichardt LF, Farinás I. Neurotrophic factors and their receptors. En: Cowan WL, Jessell TM, Zipursky SL. *Molecular and cellular approaches to neural development*. New York: Oxford University Press. 1997. 220-263.
- Reina M. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/fraccionamiento.htm>. 2005.
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: Granules Constituents, secretion and function. *Platelets*. 2001. 12: 261-273.
- Renström P. Muscle injuries. Prevention and management of sports injuries. 1981. 413-430.

- Ribault D, Khatib AM, Panasyuk A. et al. Mitogenic and metabolic actions of epidermal growth factor on rat articular chondrocytes: modulation by fetal calf serum, transforming growth factor beta, and tyrphostin. *Arch Biochem Biophys*. 1997. 337: 149-158.
- Rieman P. Platelet rich plasma reduces bleeding, speeds healing. *Cosmetic Surgery Times*. 2000. 36.
- Rigamonti AE, Locatelli L, Cella SG. et al. Muscle Expressions of MGF, IGF-IEa, and Myostatin in Intact and Hypophysectomized Rats: Effects of rhGH and Testosterone Alone or Combined. *Horm Metab Res*. 2009. 41(1): 23-29.
- Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I. et al. C-reactive protein and a1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. *J Clin Micro*. 1994. 32: 912-917.
- Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor beta. In: Roberts AB, Sporn MB eds. *Peptide growths factors and their receptors*. I New York: Springer-Verlag. 1990. 419-472.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner Electrolyte Metab*. 1998. 24(2-3): 111-119.
- Roche AF, Wellens R, Guo SS. Relationship of skeletal age to limb composition during prepubescence. *Am J Hum Bio*. I 1996. 6: 673-679.
- Rochler M. Insuline-like growth factor binding proteins. *Vit Horm*. 1993. 47: 1-114.
- Roit IM, Brostoff J, Male DK. *Inmunología*. 2ª ed. Salvat. Barcelona. 1992. 75-90.
- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F. et al. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunology*. 2004. 25: 201-209.
- Ross G, Vogel A. The platelet-derived growth factor. *Cell*. 1978. 14: 203-210.
- Ross R, Masuda J, Raines E. et al. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of arteriosclerosis. *Science*. 1990. 248: 1009-1012.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. Biology of platelet-derived growth factor. *Cell*. 1986. 46: 155-169.
- Rybak LT, Torriani M. Magnetic Resonance Imaging of Sports Related. Muscle Injuries. *Top Magn Reson Imaging*. 2003. 14: 209-220.
- Sacks G, Seyani L, Lavery S. et al. Maternal C-reactive protein levels are raised at 4 weeks gestation. *Hum Reprod*. 2004. 19(4): 1025-1030.

- Salemi S, Rinaldi C, Manna F. et al. Reconstruction of lower leg skin ulcer with autologous adipose tissue and platelet-rich plasma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008. 61 (12): 1565-1567.
- Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008. 1: 165-174.
- Sánchez C. *Estudio histoquímico e inmunohistoquímico de los músculos de la lengua, paladar y faringe en el perro*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia. 2009.
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J. et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007. 35 (2): 245-251.
- Sánchez M, Anitua E, Azofra J. et al. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*. 2008. 26(5): 910-913.
- Sánchez M, Anitua E, Orive G. et al. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med*. 2009. 39(5): 345-354.
- Sánchez M, Azofra J, Anitua E. et al. Use autologous plasma rich in growth factors in the treatment of a large non-traumatic avulsion of articular cartilage: a case report. *Medicine Science Sport Exer*. 2003. 10: 1648-1652.
- Sato Y, Asada Y, Marutka K. et al. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *J Thromb Haemost*. 1996. 75: 389-392.
- Savage CR, Inigami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1972. 247:7612-621.
- Schaer R. *Medicina clínica del perro y el gato*. Masson. 2006. Barcelona. 60-80.
- Scher EL, Day RB, Speight PM. New bone formation after a sinus lift procedure using demineralized freeze-dried bone and tricalcium phosphate. *Implant Dent*. 1999. 8(1): 49-53.
- Schindler R, Mancilla J, Endres S. et al. Correlations and interactions in the production of IL-6, IL-1 and TNF in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990. 75: 40-47.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001. 59(9): 1119-1121.

- Schober A, Manka D, Von Hundelshausen P. et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002. 106: 1523-1529.
- Segura AA, Gálvez FJ, Álvarez A. et al. Factor de crecimiento hepatocítico (HGF) y sus aplicaciones terapéuticas. *Rev Gastroenterol Mex*. 2004. 69(4): 243-250.
- Serra CI. *Análisis Biomecánico e Histológico del Tejido de Reparación en defectos Condrales de Espesor Completo tras la aplicación de PRP autólogo*. Estudio Experimental. Tesis Doctoral. Valencia. 2006.
- Sevelius E, Anderson M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. *Vet Rec*. 1995. 137: 663-667.
- Shanaman R, Filstein MR, Danesh-Mayer MJ. Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case report. *Int J Periodont Rest Dent*. 2001. 21: 345-355.
- Shavlakadze T, Winn N, Rosenthal N. et al. Reconciling data from transgenic mice that overexpress IGF-I specifically in skeletal muscle. *Growth Hormone*. 2005. 15: 4-18.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft A. et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec*. 2001. 148: 172-175.
- Shellock FG, Fleckenstein JL. Magnetic resonance imaging of muscle injuries. En: *Magnetic resonance imaging in orthopaedics and sports medicine*. 2nd edition. Ed Stoller DW. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. 1997. 1341-1360.
- Sherwood ER. Current concepts of the inflammatory response. *ASA Refresher Courses in Anesthesiology*. 2002. 30 (1): 169-184.
- Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the trk neurotrophin receptor family in human nonneuronal tissues. *Am J Pathol*. 1996. 148: 1807-1818.
- Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* . 2001. 26: 25-35.
- Shimada T, Ishida Y, Shimizu M. et al. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun*. 2002. 26: 171-177.
- Shin MK, Lee JH, Lee SJ. et al. Platelet-rich plasma combined with fractional laser therapy for skin rejuvenation. *Dermatol Surg*. 2012.
- Shrodl W, Kruger M, Hien TT. et al. C-reactive protein as a new parameter of mastitis. *Tierärztl Prax*. 1995. 23: 337-341.

- Siegbahn A, Hammacher A, Westermark B. et al. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest.* 1990. 85: 916-920.
- Sierra R, Rello J, Bailén MA. et al. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med.* 2004. 30:2038-2045.
- Silva A, Sampaio R. Anatomic ACL reconstruction: does the platelet-rich plasma accelerate tendon healing?. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2009. 17: 676-682.
- Silva RF, Rezende CMF, Paes.Leme FO. et al. Evaluación del método de tubo para concentrar plaquetas caninas: estudio celular. *Arch Med Vet.* 2011. 43: 95-98.
- Sink CA, Feldman BF. *Urianálisis y hematología de laboratorio.* Grupo Asís Biomedica SL. Zaragoza. 2009. 35-60.
- Sipe JD, Colten HR, Goldberger G. et al. SAA: biosynthesis and postsynthetic processing of preSAA and structural variants defined by complementary DNA. *Biochemistry.* 1985. 24(12): 2931-2936.
- Sitaras NM, Sariban E, Pantazis P. et al. Human iliac afferent endothelial cells express both genes encoding the chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and synthesize PDGF-like mitogen. *J Cell Physiol.* 1987. 132: 376-380.
- Skromne-Kadlubik G, Ibarra CF. Uso del factor de crecimiento del hepatocito en el hígado senil. www.imagenmedica.com. 2010.
- Smerdu V, Strbenc M, Meznaric-Petrusa M. et al. Identification of myosin heavy chain I, IIa and IIx in canine skeletal muscles by an electrophoretic and immunoblotting study. *Cells Tiss Org.* 2005. 180: 106-116.
- Snow D, Billeter F, Mascarello F. et al. No classical IIB fibers in dog skeletal muscle. *Histochem.* 1982. 75: 53-65.
- Solter PF, Hoffmann WE, Hungerford LL. et al. Haptoglobin and Ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am J Vet Res.* 1991. 52: 1738-1742.
- Sorrells AD, Eicher SD, Harris MJ. et al. Periparturient cortisol , acute phase cytokine and acute phase protein profiles and gilts housed in groups or stalls during gestation. *J Anim Sci.* 2007. 85: 1750-1757.

- Sosolik RC, Theil KS, Brandt JT. Clinical pathology rounds, anti-bovine thrombin antibody. *Lab Med*. 1995. 27: 651.
- Soto J, Salazar LV. Clasificación ecográfica de los desgarros musculares. *Anales de Radiología*. 2008. 2: 121-128.
- Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE. et al. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. 2004. *Vet Surg*. 33(6): 565-578.
- Souza P, Kuliszewski M, Wang J. et al. PDGF-AA and its receptor influence early lung branching via an epithelial-mesenchymal interaction. *Development*. 1995. 121: 2559-2567.
- Stahl C, Wacker C, Weber U. et al. MRI features of gastrocnemius musculotendinopathy in herding dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2010. 51(4): 380-385.
- Steenfos HH. Growth factors and wound healing. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1994. 28(2): 95-105.
- Stone DK. Receptors: structure and function. *Am J Med*. 1998. 105(3): 244-250.
- Stoneham SJ, Palmer L, Cash R. et al. Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet J*. 2001. 33(6): 559-603.
- Strbenc M, Smerdu V, Pogacnik A. et al. Myosin heavy chain isoform transitions in canine skeletal muscles during postnatal growth. *J Anat*. 2006. 209: 149-163.
- Suffredini AF, Fantuzzi G, Badolato R. et al. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol*. 1999. 19(4): 203-214.
- Sulpice E, Bryckaert M, Lacour J. et al. Platelet factor 4 inhibits EGF-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-related kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Blood*. 2002. 100: 3087-3094.
- Sutton RH, Hobman B. The value of plasma fibrinogen estimations in cattle: a comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *N Z Vet J*. 1975. 23: 21-27.
- Szabó G, Suba Z, Hrabák K. et al. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001. 16(5): 681-692.
- Taira T, Fujinaga T, Tamura K. et al. Isolation, characterization of AGP from horses and its evaluation as an acute phase reactive protein in horses. *Am J Vet Res*. 1992. 53: 961-965.

- Takikawa M, Nakamura S, Ishirara M. et al. Enhanced effect of platelet rich plasma containing a new carrier on hair growth. *Dermatol Surg.* 2011. 37(12): 1721-1729.
- Tamura K, Yatsu T, Itoh H. et al. Isolation, characterization and quantitative measurement of serum alpha1-acid glycoprotein in cattle. *Jpn. J Vet Sci.* 1989. 51: 987-994.
- Tarragó A. Estudio Clínico con Factores de Crecimiento (III). En: Revista *Argos.* 2007. 89: 38-42.
- Tarroni G, Tessarin C, De Silvestro L. Local therapy with platelet-derived growth factors for chronic diabetic ulcers in haemodialysis patient. *Ital Nefrol.* 2002. 19: 630-633.
- Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB. et al. Autologous Fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg.* 1994. 52: 161-166.
- Taylor RA. Patologías quirúrgicas del músculo esquelético. En Bojrab JM: *Fisiopatología y clínica quirúrgica en animales pequeños.* 2ª ed. Intermédica. Buenos Aires. 1996. 130-160.
- Tecles F, Martínez-Subiela S, Parra MD. et al. Use of acute phase proteins for monitoring treatment evolution in dogs with different pathologic conditions. En resúmenes del 14 th *ECVIM-CA Congress.* En prensa. 2004.
- Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U. et al. Preliminary studies of serum acute phase proteins concentration in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *J Vet Intern Med.* 2005. 19: 865-870.
- Tedeschi D, Pellegrini-Masini A, Lubas G. et al. Haptoglobin: a marker of hemolysis in horses. Resúmenes III Congr. *ESVCP.* Edinburgo. 2001: 47.
- Thoesen MS, Vander-Berg-Foels WS, Stokol T. et al. Used of a centrifugation based, point-of-care device for production of canine autologous bone marrow and platelet concentrates. *Am J Vet Res.* 2006. 67: 1655-1661.
- Thougard AV, Hellmen E, Pedersen HD. et al. Correlation between alpha1-acid glycoprotein and total sialic acid in serum from dogs with tumours. *J Vet Med A.* 1999. 46: 231-237.
- Tischler M. Platelet rich plasma. Utilizing autologous growth factors for dental surgery to enhance bone and soft tissue grafts. *NY State Dent J.* 2002. 68: 22-24.
- Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y. et al. Latent TGF-beta binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005. 37(1): 38-41.

- Toniolo L, Maccatrozzo L, Patruno M. et al. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J physiol.* 2007. 292: 1915-1926.
- Tosa N, Morimatsu M, Nakagawa M. et al. Purification and identification of a serum protein increased by anthelmintic drugs for *Dirofilaria immitis* in dogs. *J Vet Med Sci.* 1993. 55: 27-31.
- Toussaint M. Acute phase protein in different species measured as a tool to assess animal health. Resúmenes de *I European Colloquium of Animal Acute.* 2000.
- Tovar JT, Diez P, Chávez D. et al. Correlación del IGF-I y la densidad ósea en pacientes mayores de 50 años del sexo femenino. *Rev Mex Med Fis Rehas.* 2004. 16: 48-52.
- Trejo JL, Piriz J, Llorens-Martin MV. et al. Central actions of liver-derived insulin-like growth factor I underlying its precognitive effects. *Molecular Psychiatry.* 2007. 12: 1118-1128.
- Trowbridge CC, Stammers AH, Woods E. et al. Use of platelet gel and its effects on infection in cardiac surgery. *Journal of extracorporeal technology.* 2005. 37 (4): 381-386.
- Tsai Y, Lee R, Lin S. et al. Identification of a novel platelet-derived growth factor-like gene, fallotein, in the human reproductive tract. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1492: 196-202.
- Turmezei TD, Yu D, Kerslake RW. The role of imaging in sports medicine. *European Musculoskeletal Review.* 2010. 5(1): 82-88.
- Tvarijonaviciute A, Martinez S, Gutierrez A. et al. Serum acute phase proteins concentrations in dogs during experimentally short-term induced overweight. A preliminary study. *Res Vet Sci.* 2011. 90(1): 31-34.
- Tvedten H. Leukocyte disorders. En: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods.* Eds. Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH. Saunders. USA. 1989. 57-85.
- Uchida E, Katoh N, Takahashi K. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *J Vet Med Sci.* 1993. 55(5): 893-894.
- Uhlin-Hansen L, Langvoll D, Wik T. et al. Blood platelets stimulate the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in human monocytes. *Blood.* 1992. 80(4): 1058-1065.
- Ulutas PA, Musal B, Kiral F. et al. Acute phase proteins levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Vet Sci.* 2009. 86: 373-376.
- Valbonesi M, Gianni G, Migliori F. et al. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *Iny J Artif Organs.* 2002. 25(4): 334-338.

- Van Den Dolder J, Mooren R, Vloon AP. et al. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Eng.* 2006. 12(11): 3067-3073.
- Van Gelder KN, Bilkei G. The course of acute phase proteins and serum cortisol in mastitis metritis agalactia (MMA) of the sow and sow performance. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2005. 130(2): 38-41.
- Van Miert. Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* type D. *Vet Res Can Rech Vet.* 1996. 60: 222-227.
- Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M. Bronchoalveolar interferon-alpha, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans?. *J Infect Dis.* 1998. 177(4): 1076-1079.
- Van Wuijckhuise-Sjouke LA. Plasma fibrinogen concentrations as an indicator of the presence of severity of inflammatory disease in horses and cattle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde.* 1984. 109: 869-872.
- Vannuchi CI, Mirandola RM, Oliveira CM. Acute phase protein profile during gestation and diestrus: proposal for an early pregnancy test in bitches. *Anim Reprod Sci.* 2002. 74: 87-99.
- Vega JA, García-Suárez O, Martínez-Almagro A. Cartílago articular y factores de crecimiento. *Mapfre Medicina.* 2000. 11: 212-225.
- Veiga A, Price CA, De Oliveira ST. et al. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *J Vet Diagn Invest.* 2008. 20: 224-228.
- Veikkola T, Karkkainen M, Cleasson-Welsh L. et al. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000. 60: 203-212.
- Veldhuis JD, Farhy LF, Welfman AL. et al. Gender modulates sequential suppression and recovery of pulsatile growth hormone secretion by physiological feedback signals in young adults. *J Clin Endocr Metab.* 2005. 90: 2874-2881.
- Verdugo P, Antonio M. Clasificación Ultrasonográfica de los Desgarros Musculares. *Revista Chilena de Radiología.* 2004. 10(2): 53-57.
- Vivo J, Morales JL, Diz A. et al. Estudio morfológico y morfométrico del músculo oblicuo dorsal del perro. *Arch Med Vet.* 2005. 17(1): 49-54.

- Vonversen-Hoeynck FM, Hubel CA, Gallaher MJ. et al. Plasma levels of inflammatory markers neopterin, sialic acid, and C-reactive protein in pregnancy and preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2009. 22(6): 687-692.
- Wallace JL, Dicay M, McKnight W. et al. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor. *Br J Pharmacol.* 2006. 148(3): 274-278.
- Wang W, Huang XR, Li AG. et al. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2005. 16: 1371-1383.
- Webel DM, Finck BN, Baker DH. et al. Time course of increased plasma cytokines, cortisol and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J Anim Sci.* 1997. 75: 1514-1520.
- Weibrich G, Hansen T, Kleis W. et al. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004. 34 (4): 665-671.
- Weibrich G, Kleis WKG, Buch R. et al. The Harvest Smart PRPePTM system versus the Friadent-Schutze platelet-rich plasma kit. Comparison of a semiautomatic method with a more complex method for the preparation of platelet concentrates. *Clin Oral Impl Res.* 2003. 14: 233-239.
- Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G. et al. Growth factors levels in PRP and correlation with donor age, sex, and platelet count. *Journal of Cran-Max. Surgery.* 2002. 30: 97-102.
- Weibrich G, Kleis WKG, Hitzler WE. et al. Comparison of the platelet concentrate collection system with the PRGF kit to produce PRP: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005. 20 (1): 118-123.
- Weibrich G, Kleis WKG, Hitzler WE. et al. Growth Factor Levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan-type PRP kit versus PCCS PRP system. *The Int Journ of Oral and Maxillofacial Implants.* 2002. 17(2): 184-190.
- Weibrich G, Kleis WKG. Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clin Oral Impl Res.* 2002. 13: 437-443.
- Welles EG, Williams MA, Tyler JW. et al. Hemostasis in cows with endotoxin-induced mastitis. *Am J Vet Res.* 1993. 54: 1230-1234.
- Werling D, Sutter F, Arnold M. et al. Characterisation of the acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res Vet Sci.* 1996. 61: 252-257.

- Weyrich AS, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelets, endothelial cells, inflammatory chemokines and restenosis. Complex signaling in the vascular play book. *Circulation*. 2002. 106: 1433-1435.
- Weyrich AS, Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends in Immunology*. 2004. 25: 489-495.
- Whicher JT, Westacott CI. The acute phase response. En: *Biochemistry of Inflammation*. Eds.: Wicher JT. y Evans S. W. Kluwer Academic. 1992. Londres. 243-271.
- White G, Escolar G. EDTA-induced changes in platelet structure and function: adhesion and spreading. *Platelets* . 2000. 11: 56-61.
- Wilkens BE, Mac Donald DE, Hulse DA. Utilization of dynamic stifle flexion apparatus in preventing recurrence of quadriceps contracture: A clinical report. *Veterinary Comparative Orthopedic Traumatology*. 1993. 6: 219-223.
- Wironen JF, Jaw RY, Fox WC. Platelet-rich plasma is not osteoinductive in a nude rat assay. Presented at the *International Conference of Bone Substitutes*. Davos. 2000.
- Withman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997. 55: 1294.
- Witte TH, Yeager AE, Nixon AJ. Intralesional injection of insulin-like growth factor-I for treatment of superficial digital flexor tendonitis in Thoroughbred racehorses: 40 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc*. 2011. 239(7): 992-997.
- Wolswijk G. Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain*. 2002. 125(2): 338-349.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ. et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001. 12: 229-236.
- Wright-Carpenter T, Klein P, Schaferhoff P. et al. Treatment of muscle injuries by local administration of autologous conditioned serum: a pilot study on sportsmen with muscle strains. *Int J Sports Med*. 2004. 25(8): 588-593.
- Yamada Y, Ueda M, Hibi H. et al. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology. A clinical case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006. 26(4): 363-369.
- Yamamoto M, Sobue G, Yamamoto K. et al. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NFG, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult

- human peripheral nervous system and nonneuronal tissues. *Neurochem Res.* 1996. 21: 929-938.
- Yamamoto S, Shida T, Honda M. et al. Serum C-reactive protein and immuneresponses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (phase-i cells). *Vet Res Comm.* 1994. 18: 347-357.
 - Yamamoto S, Shida T, Miyaji H. et al. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Comm.* 1993. 17: 85-93.
 - Yamamoto T, Watikani S, Imoto K. et al. Fibroblast growth Factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis & Cartilage.* 2004. 1: 1-6.
 - Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T. et al. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci.* 1994. 56: 487-492.
 - Yamashita K, Fujinaga T, Okumura M. et al. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. *J Vet Med Sci.* 1991. 53(6): 1019-1024.
 - Yamashita K, Okumura M, Mizuno S. Isolation and characterization of alpha1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute phase reactive protein from horses. *Am J Vet Res.* 1992. 53: 961-965.
 - Yang SY, Alnaqeeb M, Simpson AH. et al. Cloning and characterization of an IGF-I isoform expressed in skeletal muscle subjected to stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1996. 17: 487-495.
 - Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2011. 107(4): 409-417.
 - Yazawa M, Ogata H, Kimura A. et al. Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craneofac Surg.* 2004. 15(3): 439-446.
 - Ye-Rang Y, Jong W, Eunyi J. et al. Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *J Tissue Eng.* 2010. 1-18.
 - Yilmaz Z, Icol YO, Torun S. et al. Intravenous administration of choline or cdp-choline improves platelet count and platelet closure times in endotoxin-treated dos. *Shock.* 2006. 25(1): 73-79.
 - Yule TD, Roth MB, Dreier K. et al. Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine.* 1997. 15: 720-729.

- Zanati H, Faure R, Cominches GD. El factor de crecimiento epidérmico (EGF): su aplicación en la córnea. *Rev Cubana Oftalmol.* 1997. 10(1-2): 39-44.
- Zechner W, Tangl S, Tepper G. et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003. 18(1): 15-22.
- Zhang Q, Peyruchaud O, French KJ. et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates fibronectin matrix assembly through a rho-dependent signal pathway. *Blood.* 1999. 93: 2984-2990.
- Zhou YQ, Chen YQ, Fisher JH. et al. Activation of the RON receptor tyrosine kinase by macrophage stimulating protein inhibits inducible cyclooxygenase-2 expression in murine macrophages. *J Biol Chem.* 2002. 277(41): 38104-38110.
- Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M. et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001. 41: 1217-1224.